



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**  
**BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**POTENCIAL ANTILEUCÉMICO DE ANÁLOGOS DEL 12-  
FENILACETILRINVANIL.**

**T E S I S**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**PRESENTA:**

**QFB. LUIS ANTONIO MARTINEZ JIMENEZ**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Edelmiro Santiago Osorio**  
**FES Zaragoza. UNAM**

**COMITÉ TUTOR: Dra. María Gloria Soldevila Melgarejo**  
**Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM**

**COMITÉ TUTOR: Dr. José Ignacio Regla Contreras**  
**FES Zaragoza. UNAM**

**CIUDAD DE MÉXICO.**

**SEPTIEMBRE, 2017**



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.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**  
**BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**POTENCIAL ANTILEUCÉMICO DE ANÁLOGOS DEL 12-  
FENILACETILRINVANIL.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**PRESENTA:**

**QFB. LUIS ANTONIO MARTINEZ JIMENEZ**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr Edelmiro Santiago Osorio**  
**FES Zaragoza. UNAM**

**COMITÉ TUTOR: Dra María Gloria Soldevila Melgarejo**  
**Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM**

**COMITÉ TUTOR: Dr José Ignacio Regla Contreras**  
**FES Zaragoza. UNAM**

**CIUDAD DE MÉXICO.**

**SEPTIEMBRE, 2017**

Lic. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que el subcomité de Biología Experimental y Biomedicina, del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 12 de junio de 2017, aprobó el siguiente jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno, **MARTÍNEZ JIMÉNEZ LUIS ANTONIO** con número de cuenta **406074463** con la tesis titulada "**POTENCIAL ANTILEUCÉMICO DE ANÁLOGOS DEL 12-FENILACETILRINVANIL**", bajo la dirección del Tutor Principal, **DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO**:

Presidente: DR. MARIO AGUSTÍN ALTAMIRANO LOZANO

Vocal: DR. ALBERTO MONROY GARCÍA

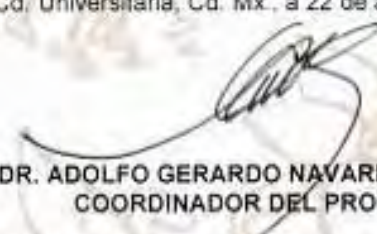
Secretario: DR. JOSÉ IGNACIO REGLA CONTRERAS

Suplente: DR. JUAN JOSÉ MONTESINOS MONTESINOS

Suplente: DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 22 de agosto de 2017.

  
**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**  
**COORDINADOR DEL PROGRAMA**



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

## **AGRADECIMIENTOS**

Al posgrado en ciencias biológicas de la UNAM, por el apoyo para mi formación académica

Al programa de Becas para Estudios de Posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo con número de registro 270115.

Al apoyo del proyecto PAPIIT con número de registro IN221017.

Al Doctor Edelmiro Santiago Osorio

A la Doctora Gloria Soldevila Melgarejo

Al Doctor José Ignacio Regla

## AGRADECIMIENTOS

De manera muy especial quiero agradecer a mis padres, por ser los principales promotores de mis sueños, gracias por creer en mi cuando yo mismo no lo hice.

A mis hermanos, a mi familia y a los amigos que con el paso de los años se han convertido en familia por todo el apoyo, les agradezco no solo por estar presentes, sino por toda la felicidad que me han dado.

Al Dr. Edemiro por su tiempo y paciencia, a Lupita, Chio, Itzen, Sandra, Edgar y demás miembros del laboratorio 8 PB de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza, por toda su ayuda para realizar este trabajo y sobre todo, por su amistad.

*“TODAVÍA NO SOY NI LA MITAD DE LA PERSONA QUE DESEO SER... AÚN TENGO QUE TRABAJAR MUCHO EN MÍ. SOY MI PROYECTO MÁS IMPORTANTE”*

## INDICE

RESUMEN

ABSTRAC

1. INTRODUCCION .....	1
1.1 Hematopoyesis y Leucemia .....	1
1.2 Leucemia mieloide crónica y su tratamiento .....	3
1.3 Capsaicina en el tratamiento de cáncer .....	6
1.3.1 Análogos sintéticos de capsaicina .....	7
1.4 Endocannabinoides en el tratamiento del cáncer .....	8
1.4.1 Anadamida .....	9
1.5 Desarrollo de fenilacetilricinoleidamidas .....	9
1.6 Muerte celular .....	11
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	14
3. HIPÓTESIS .....	15
4. OBJETIVO .....	15
4.1 Objetivo general .....	15
4.2 Objetivos particulares.....	15
5. METODO .....	16
5.1 Cultivo celular .....	16
5.2 Derivados del ácido 12-fenilacetil ricinoleico .....	16
5.3 Ensayo de proliferación .....	16
5.4 Aislamiento y cultivo de linfocitos de sangre periférica.....	17
5.5 Evaluación del ciclo celular .....	17
5.6 Inducción de la formación de cuerpos apoptóticos .....	17
5.7 Detección de apoptosis por PE-ANEXINA V y 7AAD .....	18
5.8 Tratamiento estadístico.....	18
6. RESULTADOS.....	19
6.1 Confirmación del efecto antiproliferativo de 12-FAR y evaluación del efecto de sus análogos sobre la proliferación de las células WEHI-3 y K562 .....	19
6.2 Evaluación del efecto los análogos (3) y (5) en el ciclo celular de línea leucémica humana K562 .....	23



6.3 Los compuestos (3) y (5) Inducen la formación de cuerpos apoptóticos en la línea celular K562 .....	24
6.4 Los compuestos 3 y 5 inducen translocación de fosfatidilserina y la incorporación de 7AAD en la línea celular K562 .....	26
7. DISCUSIÓN.....	28
8. CONCLUSIÓN .....	33
9. BIBLIOGRAFÍA .....	34

## RESUMEN

La Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA) aprobó el uso del Imatinib para tratar la leucemia mieloide crónica (LMC) en 2001 y ha sido la primera opción quimioterapéutica para este tipo de cáncer, sin embargo, el fármaco no es curativo y por tanto se debe administrar durante toda la vida, con el riesgo de deterioro significativo de la calidad de vida de los pacientes. En la búsqueda de nuevas opciones, nuestro grupo de investigación ha demostrado que el 12-Fenilacetilrinvanil (12-FAR; análogo sintético de la capsaicina) y tres de sus análogos, al igual que imatinib, inhiben la proliferación de células leucémicas murinas WEHI-3, pero se desconoce si también lo hacen en la línea de células de leucemia mieloide crónica humana K562. En este trabajo se evaluó el efecto del 12-FAR y seis de sus análogos (12-Fenilacetilricinoleiamida (1), N-Hidroxietyl-12-Fenilacetilricinoleiamida (2), N-(NN-dimetiletilamina)-12-Fenilacetilricinoleiamida (3), Fenilacetilato de (1*R*,3*Z*)-1-hexil-12-(4*N*-metilpiperazina)-12-oxo-dodecenil (4), Fenilacetilato de (1*R*,3*Z*)-1-hexil-12-[(1*S*,4*S*)-2-hidroxietyl-2,5-diazabicyclo[2.2.1]Heptan]-12-oxo-dodecenil (5) y Fenilacetilato de (1*R*,3*Z*)-1-hexil-12-[(1*S*,4*S*)-2-bencil-2,5-diazabicyclo[2.2.1]Heptan]-12-oxo-dodecenil (6)) en el modelo de leucemia mieloide crónica humana K562. A pesar de que el 12-FAR y sus seis análogos inhiben la proliferación de la línea celular leucémica murina WEHI-3, solo los compuestos (3) y (5) demostraron la capacidad de inhibir la proliferación de K562, así como de inducir la formación de cuerpos apoptóticos y la translocación de fosfatidilserina a la capa externa de la membrana plasmática de la célula como indicadores de muerte celular por apoptosis. Finalmente, en linfocitos normales el compuesto (5) requirió del doble de concentración para alcanzar la  $IC_{50}$ , respecto a las células leucémicas, lo que sugiere un daño selectivo hacia las células tumorales. Estos resultados sugieren que los compuestos (3) y (5) poseen potencial antileucémico para células humanas.

## ABSTRAC

The Food and Drug Administration (FDA) approved the use of Imatinib to treat chronic myeloid leukemia (CML) in 2001 and has been the first chemotherapeutic option for this type of cancer, however, the drug is not curative. Both should be administered throughout life, with the risk of significant deterioration in the quality of life of patients. In the search for new options, our research group has shown that 12-Phenylacetylricinvanil (12-FAR, synthetic analogue of capsaicin) and tree of its analogues, inhibit the proliferation of murine leukemic cells WEHI-3, but is also known in the human chronic myeloid leukemia cell line K562. In this work the effect of 12-FAR and six of its analogues (12-Phenylacetylricinoleiamide (1), N-Hydroxyethyl-12-Phenylacetylricinoylamide (2), N- (NN-dimethylethylamine) phenyleneacetylate (1R, 3Z) - 1-hexyl-12- (4N-methylpiperazine) -12-oxo-dodecenyl (4), (1R, 3Z) -1-hexyl-12 - [(1S, 4S) -2-hydroxyethyl-5-diazabicyclo [2.2.1] heptan] -12-oxo-dodecenyl (5) and (1R, 3Z) -1-hexyl-12 - [(1S, 4S) -2-benzyl-2,5-diazabicyclo [2.2.1] heptan] -12-oxo-dodecenyl (6)) in the human chronic myeloid leukemia model K562. Although 12-FAR and its six analogs inhibit the proliferation of the WEHI-3 cell line, only compounds (3) and (5) demonstrated the ability to inhibit K562 proliferation, as well as to induce the formation of apoptotic bodies and the translocation of phosphatidylserine to the outer layer of the plasma membrane of the cell as indicative of cell death by apoptosis. Finally, in normal lymphocytes, compound (5) required twice the concentration to reach IC 50, compared to leukemic cells, suggesting selective damage to tumor cells. These results suggest that compounds (3) and (5) have antileukemic potential for human cells.

## **1. INTRODUCCIÓN.**

La Organización Mundial de la Salud (OMS) señala que, en el año 2008, se registraron 7.6 millones de muertes por cáncer y se estima que para el año 2030 lleguen a 13.1 millones. México presenta una tendencia similar, con una tasa de defunción por cáncer que aumentó de 57.7 a 66.7 % en un periodo de 10 años, entre 1998 y 2008; se contemplan estrategias integrales para el control del cáncer, las cuales incluyen la información de los factores de riesgo conductuales y dietéticos, inmunización contra agentes promotores de cáncer (VPH, Hepatitis B y C), diagnóstico oportuno y tratamiento adecuado. Sin embargo, aún queda mucho por hacer para lograr una lucha integral contra esta enfermedad (INEGI, 2014) que aún no tiene cura.

Uno de los principales problemas para el desarrollo de un tratamiento para el cáncer es que no es una sola enfermedad con un agente etiológico, sino que es un conjunto de enfermedades con múltiples orígenes que comparten características. El cáncer se produce por la proliferación anormal de cualquiera de los diferentes tipos de células del cuerpo (Cooper et al., 2008), las células cancerosas comparten tres propiedades características: disminución o ausencia del control del crecimiento, invasión de tejidos locales y dispersión o metástasis, a otras partes del cuerpo (Murray et al., 2001); el cáncer se puede clasificar de acuerdo con el tejido y el tipo celular en el cual se originan: Carcinomas, que derivan de células epiteliales; Sarcomas, que derivan de tejido conjuntivo o de fibra muscular y las leucemias, que derivan de células hematopoyéticas (Alberts et al., 2009).

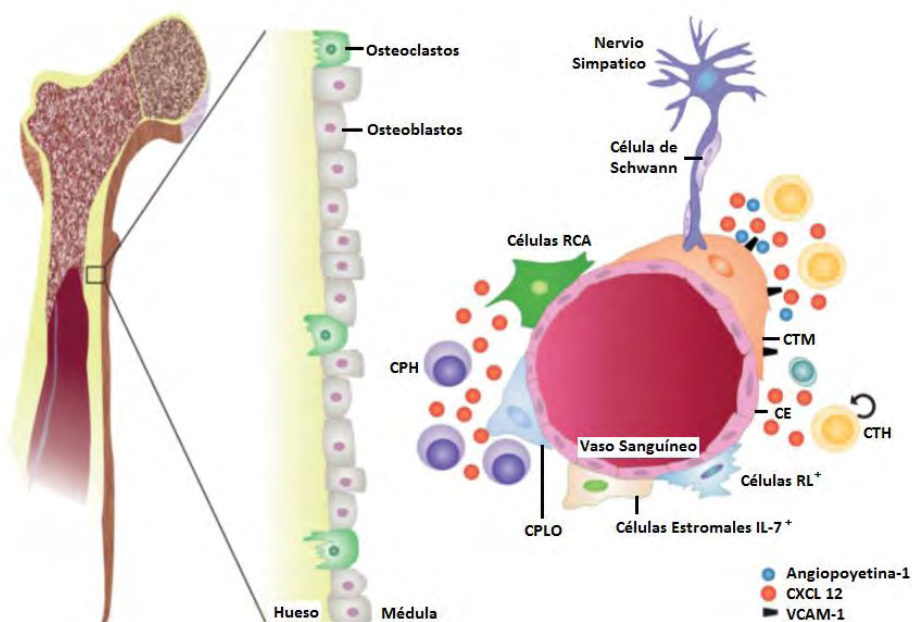
En México las neoplasias que predominan entre los pacientes menores de 20 años son en órganos hematopoyéticos y la leucemia representa el 99,8% de ellas (INEGI, 2014). Una tendencia similar se presenta en pacientes de entre 20 y 39 años, debido a que la mayor morbilidad es producida por cáncer en órganos hematopoyéticos (INEGI, 2015). Esto significa un problema no solo de salud pública, sino que también social ya que afecta a la población en edad productiva, destacando la importancia del desarrollo de estrategias no solo de prevención sino también para el tratamiento de esta enfermedad. En esta tesis se analiza el efecto de análogos del 12-FAR en la eliminación de células de la línea leucémica humana K562, como modelo de estudio en el tratamiento de la leucemia mieloide crónica.

### **1.1. Hematopoyesis y Leucemia**

Durante el tiempo de vida, las células de la sangre se encuentran en constante producción por medio de la hematopoyesis. La célula troncal hematopoyética (CTH) es una célula necesaria y suficiente para sustentar el sistema sanguíneo de forma vitalicia, posee la capacidad de auto-renovación y producen progenitores con limitada o nula capacidad de autorenovación y estos progenitores se diferencian a células sanguíneas maduras de todos los linajes (Lawal & Calvin, 2011). El control de la proliferación y diferenciación de las CTH y los progenitores es complejo, mantenido en un balance homeostático el cual depende de señales reguladas genéticamente y señales extrínsecas del microambiente (Hoggat & Pelus, 2013).

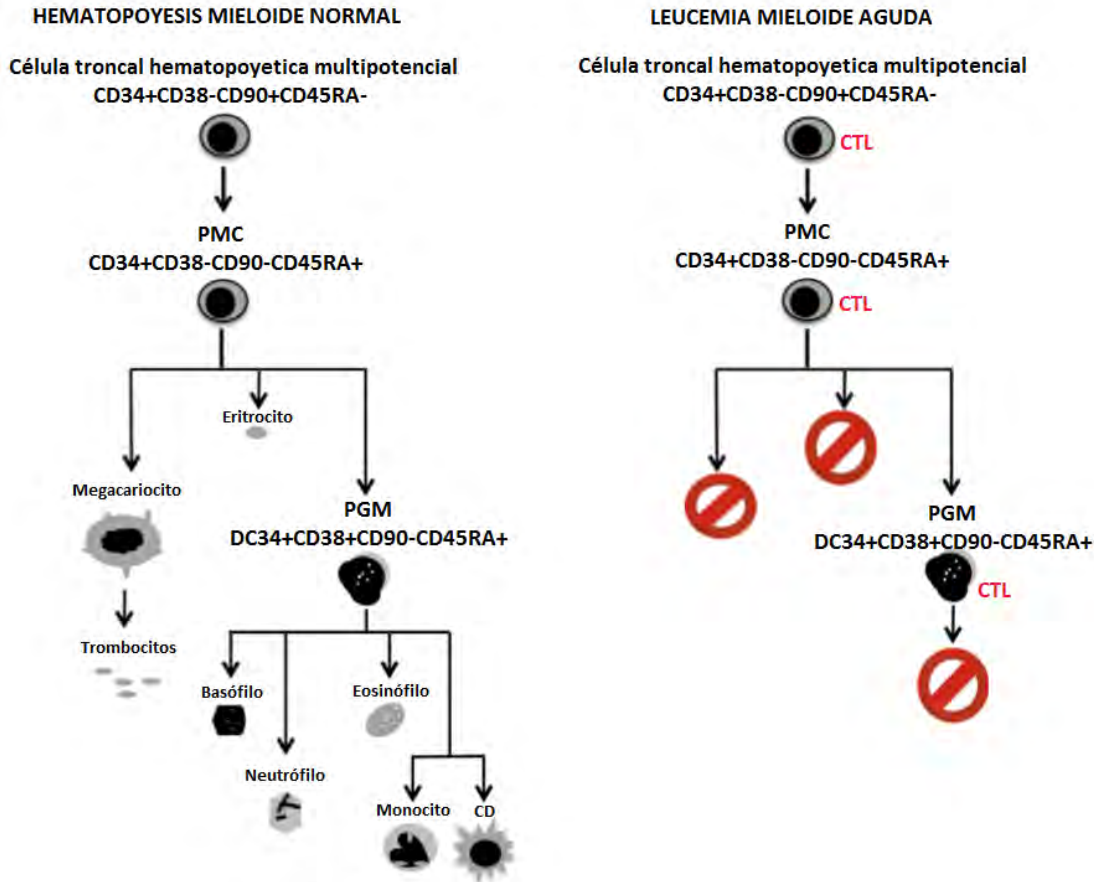
El concepto de nicho es el de una entidad física donde se incorporan y transmiten las señales exógenas hacia las células troncales (Bianco, 2011), el nicho incluye factores y células que mantienen a las células troncales en un estado de diferenciación restringida (Lawal & Calvin, 2011).

En un mamífero adulto la medula ósea es el sitio de hematopoyesis normal, sin embargo, el microambiente de la medula ósea está formada por células productoras de matriz, células de formación y reabsorción del hueso, tejido duro y células endoteliales, así como las células hematopoyéticas (Figura 1). Los huesos están bajo constante reparación y remodelación por lo que el nicho hematopoyético está en constante remodelación y es fisiológicamente activo (Lawal & Calvin, 2011).



**Figura 1:** En la medula ósea se encuentra el nicho hematopoyético, el cual está formado por diversos tipos celulares como: la célula troncal hematopoyética (CTH), célula troncal mesenquimal (CTM), células epiteliales (CE) células progenitoras de linaje osteoblastico (CPLO), células positivas al receptor de leptina (RL<sup>+</sup>) y células reticulares CXCL-12 abundantes (RCA). Tomado y modificado de (Riether et al., 2015).

Similar a las células hematopoyéticas, la leucemia se genera de una célula troncal leucémica (Figura 2), pero a diferencia de estas cuentan con un gran potencial proliferativo, un bloqueo de la diferenciación terminal y los mecanismos de apoptosis y de senescencia defectuosos, lo que lleva a su acumulación en el nicho hematopoyético (Riether et al., 2015).



**Figura 2:** Comparación de la hematopoyesis normal mieloide y la hematopoyesis leucémica mieloide con la presencia de la célula troncal leucémica (CTL), en ambos procesos se observan células de tipo: Progenitor mieloide común (PMC) y el progenitor granulocito macrófago (PGM). Tomado y modificado de Mariani & Calabretta 2014.

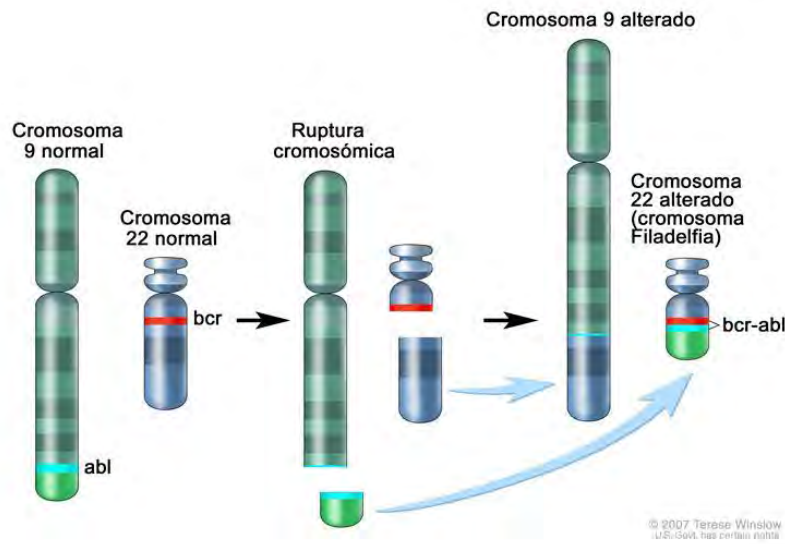
Debido a que la leucemia tiene su origen en las células hematopoyéticas, la clasificación de las leucemias depende del linaje celular hematopoyético donde se originan (Linfoide o Mieloide) (Jaffe, 2001) y las leucemias agudas se diferencian de las crónicas por las fases de desarrollo de la enfermedad, de acuerdo con lo anterior podemos clasificar a las leucemias como:

- Leucemia mieloide aguda (LMA).
- Leucemia linfóide aguda (LLA).
- Leucemia mieloide crónica (LMC).
- Leucemia linfóide crónica (LLC).

### 1.2. Leucemia mieloide crónica y su tratamiento.

La Organización Mundial de la Salud (OMS; WHO por sus siglas en inglés) reconoce siete tipos de enfermedades mieloproliferativas crónicas. La leucemia mieloide crónica se reconoce por estar siempre asociada a la anomalía cromosómica conocida como cromosoma Filadelfia o el gen de fusión BCR-ABL (Valdiman, Harris & Brunning, 2002); Se trata de la translocación cromosómica recíproca t(9; 22)(q34;q11) (Figura 2), con esta mutación descubierta en 1960 se vinculó la hipótesis del origen genético del cáncer y el avance en el conocimiento de la LMC marco el inicio

de la biología molecular y sub-celular del origen de los fenómenos oncogénicos y generando nuevos enfoques terapéuticos (Cervera et al., 2009). Las dos secuencias genéticas fusionadas producen el oncogén híbrido (BCR-ABL), que codifica para una nueva oncoproteína con una descontrolada actividad quinas activa, esto desencadena una proliferación excesiva y la reducción de la apoptosis en las células de LMC (Cortez, Kadlec & Pendergast, 1995; Deininger et al., 2000).



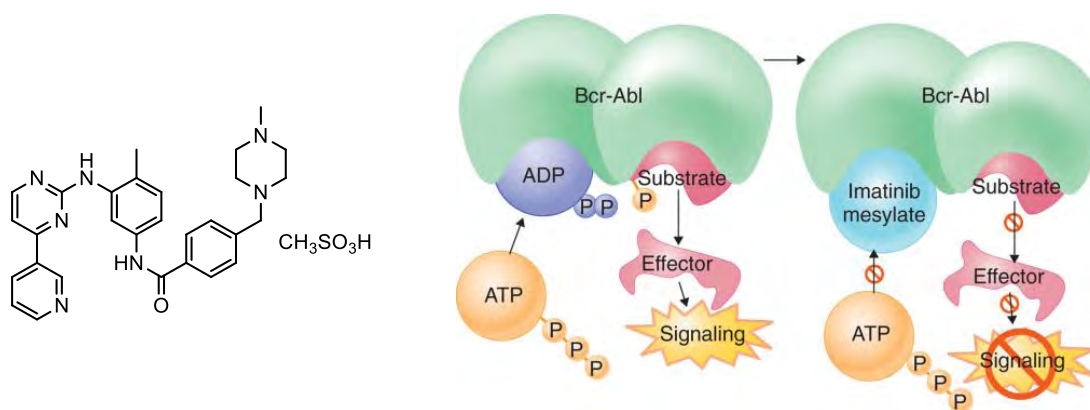
**Figura 3.** El cromosoma Filadelfia, el punto de corte en la banda q34 del cromosoma 9 resulta en la translocación del oncogen ABL1 (previamente c-Abl) a una región del cromosoma 22 que codifica la región cluster de punto de ruptura (BCR por sus siglas en inglés “breakpoint cluster región”).

La oncoproteína producto del gen BCR-ABL es constitutivamente activa y resulta en la autofosforilación y activación de múltiples vías de señalización cascada abajo que afectan la transcripción de genes, apoptosis, diferenciación y control de la proliferación (Cortez et al., 1995). Las vías involucradas incluyen a las GTPasas pequeñas (RAS) (Cortez et al., 1995), la proteína quinasa activada por mitogeno (MAPK), transductores de señales y activadores de la transcripción (JAK-STAT), quinasa de 3-fosfatidil inositol (PI3K) y el regulador que codifica para factor de transcripción (MYC) (Deininger et al., 2000), entre otras.

Actualmente, el trasplante alogénico de médula ósea, es un procedimiento establecido para el tratamiento de diversos desordenes hematológicos, pero solo un 30% de los pacientes cuentan con un donador emparentado (Migliaccio & Papayannopoulou, 2014), también la mortalidad relacionada con el trasplante varía de entre 5 y 50% dependiendo de factores como: edad del paciente, tipo de donador, grado de histocompatibilidad, estado de la infección por citomegalovirus del donador-receptor y el uso adecuado de la profilaxis antiinfecciosa entre otras. La toxicidad del régimen de acondicionamiento es del 100% y la enfermedad de injerto contra huésped (EICH) aguda es del 10 al 60% y como causa de muerte es del 10 al 15%. La EICH crónica ocurre en 75% de los pacientes y su mortalidad es de alrededor de 10% (Cervera et al., 2009).

El busulfan fue el primer agente citotóxico que logró control hematológico eficaz de la LMC, sin embargo, su toxicidad y nula respuesta citogenética limitó su uso. Posteriormente la hidroxiurea, un agente alquilante, logró una respuesta hematológica, pero la respuesta citogenética es inusual. El interferón (IFN) fue el único agente capaz de generar respuesta citogenética, resultado que fue mejorado al combinarlo con dosis bajas de arabinósido de citosina (ARA-C) y por algún tiempo esta combinación fue la elección en el tratamiento de LMC (Cervera et al., 2009). Actualmente los agentes quimioterapéuticos para el tratamiento de la LMC tienen como objetivo bloquear a la oncoproteína *BCR-ABL* (Cheng & Ko, 2014).

En 2001 la FDA (*Food and Drug Administration*) aprobó al Imatinib (Ima) para el tratamiento de la LMC (Radford, 2002). El mesilato de imatinib es una molécula pequeña que actúa compitiendo con el ATP, al ocupar su sitio de unión dentro de la molécula *BCR-ABL*, originando un giro conformacional en la estructura cuaternaria de esta tirosina quinasa, lo cual inhibe la fosforilación de los sustratos proteicos de *BRC/ABL*, de esta manera, Ima previene la activación de la transmisión de señales cruciales en esta enfermedad (Figura 3) (Cervera et al., 2009). El imatinib demostró una alta respuesta hematológica y citogenética, por esta razón es el tratamiento de primera elección para tratar la LMC (Cervantes, 2011). Sin embargo, existen pacientes que desarrollan resistencia al tratamiento (Shah et al., 2002; Benigno et al., 2007) o intolerancia debido a trastornos de biodisponibilidad, toxicidad hematológica y efectos adversos graves obligan a suspender el tratamiento (Cervantes, 2011), dejando a los pacientes con pocas o nulas opciones terapéuticas (Cervera et al., 2009).



**Figura 4.** Estructura química y mecanismo de acción del mesilato de Imatinib. El imatinib compete con el ATP por el sitio activo en la tirosina quinasa *Bcr-Abl*, bloqueando las señales de proliferación y supervivencia. Este bloqueo también induce un cambio en la estructura cuaternaria de la proteína y es translocada al núcleo donde no puede realizar su función como antiapoptótico y hace a las células nuevamente sensibles a las señales de muerte.

El avance en el conocimiento de los mecanismos moleculares que sustentan el progreso de la leucemia permitió el desarrollo del imatinib para su tratamiento, sin embargo, no elimina por completo las células leucémicas, haciendo necesaria la administración constante del fármaco, lo que aumenta la probabilidad de generar resistencia y por esta razón existe la necesidad de



desarrollar nuevas alternativas para el tratamiento de esta neoplasia, particularmente aquellas que promuevan la eliminación de células malignas sin dañar a las células normales.

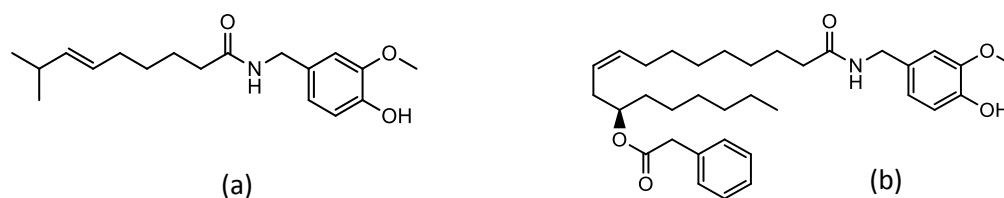
### 1.3 Capsaicina en el tratamiento de cáncer.

La capsaicina ((*E*)-*N*-[(4-hidroxi-3-metoxifenil)-metil]-8-metil-6-nonenamida) (Figura 5a) es un compuesto orgánico de origen natural y componente mayoritario de los capsaicinoides, grupo de compuestos que le confieren el efecto pungente al fruto de chile (*capsicum spp*). La pungencia, uno de los principales efectos fisiológicos de la capsaicina, se debe a la actividad agonista sobre los receptores TRPV1 (*Transient Receptor Potential Vainilloid subfamily 1*) expresados en neuronas sensoriales, los cuales son canales catiónicos no selectivos activados por calor ( $\geq 43^{\circ}\text{C}$ ) o protones (Szallasi & Blumberg, 1999), que juegan un papel importante en la trasmisión de los impulsos del dolor (Russell & Burchiel, 1984), por lo que la capsaicina se utiliza como analgésico en el tratamiento de dolor crónico (Caterina et al., 1997). La aplicación de capsaicina en la medicina tradicional es poco frecuente y su uso se limita a actuar como un analgésico tópico, efecto que fue ampliamente estudiado (Gómez et al., 1995). Sin embargo, diversos grupos de investigación han mostrado la capacidad de la capsaicina para inhibir la proliferación de células derivadas de cáncer gástrico (Chow et al., 2007) y melanoma (Morré et al., 1996), así como diversas líneas celulares cancerosas como: HepG2 (hepatoma humano), PC-3 (cáncer de próstata), MCF-7 (cáncer de mama), U373, U87, FC1 y FLS (gliomas) y HT-29 (cáncer de colon) entre otras. El efecto de la capsaicina podría estar mediado por los receptores TRPV, los cuales inducen apoptosis por medio de la inhibición la respiración mitocondrial (Hail & Lotan, 2002), en las líneas celulares leucémicas NB4, UF-1, Kasumi-1, HL-60, K562, KU812 y U937 inhibe la proliferación de manera dosis y tiempo dependientes, sin afectar a las células mononucleares normales de médula ósea (Ito et al., 2004) y por último se ha descrito la capacidad de inducir diferenciación terminal en células de glioblastoma humano A172. Los reportes también indican la inocuidad de la capsaicina en células normales, lo cual la ubica como una molécula con gran potencial antineoplásico (Morré, Chueh, & Morré, 1995).

Se han utilizado las líneas celulares humanas de hepatoma Hep 3B y Hep G2 y las líneas de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231 y se evaluó el mecanismo de inducción de apoptosis independiente de TRPV-1 de la capsaicina (Moon et al., 2012), este trabajo sugiere que el mecanismo está relacionado a la inducción de expresión de receptores de la muerte DR5 o DR4 y al incremento del  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular. El incremento del calcio intracelular puede estar relacionado con otro mecanismo de inducción de apoptosis mediado por calpaina y caspasa-12 (Wang, Liu, & Cui, 2005), sin embargo, no se han realizado estudios sobre este último mecanismo propuesto. A pesar de la evidencia del potencial de la capsaicina como antineoplásico, su uso presenta inconvenientes; su alta pungencia hace complicada y peligrosa su obtención por métodos sintéticos y no es viable obtenerla de fuentes naturales, debido a que los frutos del género *Capsicum* contiene entre el 1.5 y 0.003% de mezcla de capsaicinoides, familia de compuestos orgánicos a la cual pertenece la capsaicina.

### 1.3.1. Análogos sintéticos de capsaicina.

Se han reportado dos análogos de capsaicina; rinvanil y 12-fenilacetilrinvanil (12-FAR) (Figura 5b), este último es el agonista de los receptores TRPV1 más potente que ha sido sintetizado carente de pungencia (Voets et al., 2004). Se ha realizado la síntesis y evaluación de la actividad citotóxica del 12-FAR en líneas leucémicas de ratón P388, J774 y WEHI-3. Se demostró que FAR inhibe la proliferación de las células leucémicas y presenta un menor efecto toxico sobre células de médula ósea (Tabla 1), así como la inducción de la formación de cuerpos apoptóticos en estas mismas líneas (Figura 6) (Luviano et al., 2014).

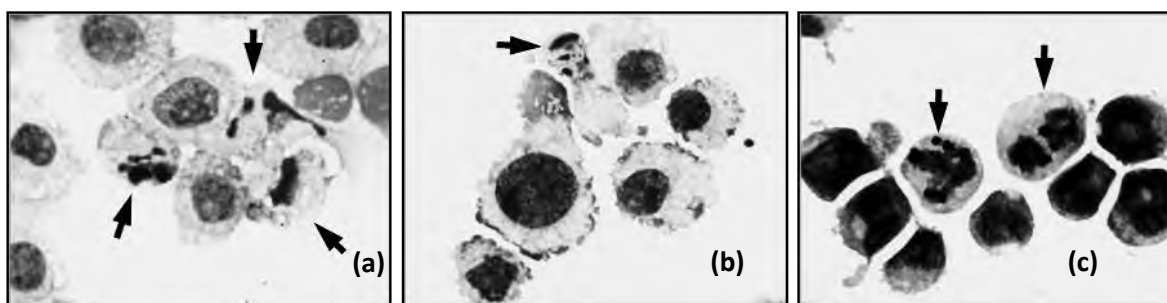


**Figura 5:** Estructura química de la Capsaicina (a) y 12-Fenilacetilrinvanil (b).

**Tabla 1.** Valores de  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) para las diferentes líneas leucémicas y células mononucleadas de médula ósea normal de ratón (Luviano et al., 2014).

Tratamiento	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) <sup>a</sup>				
	P388	J774	WEHI-3	K562	Médula ósea
12-FAR	9.0 ± 2.0	8.0 ± 3.7	3.0 ± 3.1	29.0	40.7 ± 2.4
Capsaicina	72.1 ± 1.8	32.5 ± 1.7	47.7 ± 2.5	ND	53.5 ± 3.1

<sup>a</sup> Concentración necesaria para inhibir la proliferación celular en un 50 %.



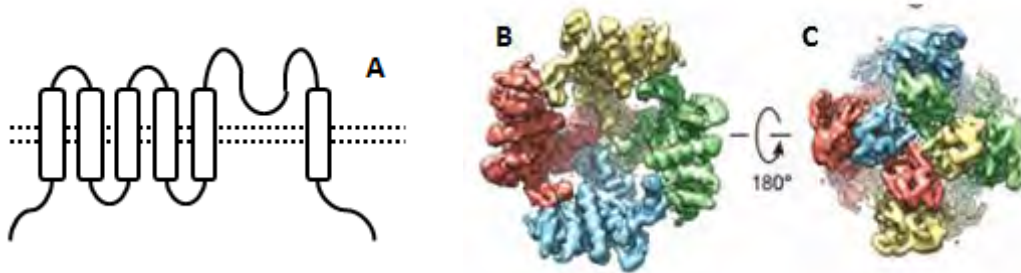
**Figura 6.** Morfología apoptótica de células J774 (a), P388 (b) y WEHI-3 (c). Las líneas leucémicas fueron cultivadas a una densidad de  $1 \times 10^5$  cel/mL y tratadas en presencia de FAR durante 24 horas. Al cabo de este tiempo, alícuotas de las células en suspensión fueron aplicadas a portaobjetos mediante cytopspin, fijadas con metanol, teñidos con la técnica de Giemsa y observadas bajo microscopía óptica en el objetivo de 100X (Luviano et al., 2014).

El mismo trabajo donde se evaluó el efecto del 12-FAR en células leucémicas murinas, también se usó línea leucémica humana K562, una leucemia eritroblastica derivada de un paciente femenino de 53 años de edad en crisis blastica. La línea celular K562 es un modelo de estudio de leucemia mieloide crónica, enfermedad que actualmente sólo se trata en forma indefinida con imatinib y sus análogos (nilotinib y dasatinib), tratamiento con una gran variedad de efectos secundarios y que afecta la calidad de vida del paciente. Se determinó la  $IC_{50}$  para el 12-FAR en esta línea celular y resulto mayor que en las líneas celulares leucémicas de ratón y está muy cercana de la  $IC_{50}$  para células normales, reduciendo así su margen terapéutico de seguridad y por lo cual se requiere continuar con la búsqueda de nuevos compuestos con potencial antileucémico.

#### **1.4 Endocannabinoides en el tratamiento del cáncer.**

Durante los últimos años se han realizado estudios sobre la función biológica del sistema endocanabinoide en la regulación de la salud y la enfermedad (Javid et al., 2016), en los procesos de proliferación, apoptosis y diferenciación celular (Costa et al., 2015) y en particular como blanco terapéutico para el tratamiento del cáncer. Numerosos estudios proponen que los endocannabinoides inhiben directamente el crecimiento tumoral y el efecto anti-proliferativo es mostrado por cannabinoides naturales y sintéticos. Los endocannabinoides han mostrado inhibir el crecimiento y progresión de varios tipos de cáncer, incluido glioma, glioblastoma, cáncer de mama, próstata y tiroides, carcinoma de colon, leucemia, linfoma y otros. El mecanismo propuesto de dichos efectos es complicado y tal vez involucre citotoxicidad o un efecto citostático, inducción de la apoptosis, inhibición de la angiogénesis y migración de células tumorales (Pisanti & Bifulco, 2009).

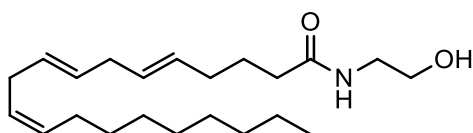
Los endocannabinoides y su actividad no están restringidas a los receptores CB, se ha identificado la interacción de estos con receptores de tipo canal iónico de potencial transitorio y receptores nucleares (Console-Bram, Marcu & Abood, 2012). Por lo que efecto biológico de los cannabinoides dependen del tipo, del tejido blanco y si es dependiente o independiente del receptor CB1, CB2 o TRPV1 (Pisanti & Bifulco, 2009). El canal TRPV1 (Figura 7) posee el sitio de unión a endovainilloides, la unión de capsaicina es por la interacción con los dominios 3 y 4 en los residuos de Ser<sup>505</sup>-Thr<sup>550</sup>, siendo el anillo de vainillilamida el que interactúa con estos aminoácidos (Immke & Gavva, 2006). Sin embargo, otros compuestos como los endocannabinoides carecen de este grupo funcional en sus estructuras y son capaces de activar al canal iónico TRPV1, posiblemente debido a que no solo Ser<sup>505</sup>-Thr<sup>550</sup> activan el canal, sino que existen otros aminoácidos que cumplen esta función.



**Figura 7:** Representación de la estructura de TRPV1, una proteína perteneciente a la súper familia de canales iónicos (A) Esquema de un monómero de un TRP formado por seis dominios transmembrana, B y C vistas superior e inferior de un canal (tetramero) obtenidas por cristalografía, cada uno de los monómeros representado en color diferente, esta proteína es sensible a la temperatura, pH y capsaicina (Liao et al., 2013).

#### 1.4.1 Anandamida.

La anandamida (Figura 8) es un endocanabinoide y es también un ligando endógeno de los receptores CB1 y CB2, un mensajero que modula las funciones simpáticas y es considerado un estimulador del crecimiento de células hematopoyéticas (Derocq et al., 1998). También regula eventos como la analgesia neurológica, relajación vascular, crecimiento de tumor y apoptosis (Biswas et al., 2003), la anandamida inhibe la proliferación de células de cáncer de mama por un mecanismo mediado por la vía Wnt/ $\beta$ -catnina (Laezza et al., 2012) y una vía dependiente de prolactina (Pisanti & Bifulco, 2009). También induce apoptosis en células de osteosarcoma humano por medio del flujo de  $\text{Ca}^{+}$  y la fosforilación de p38 (Hsu et al., 2007).



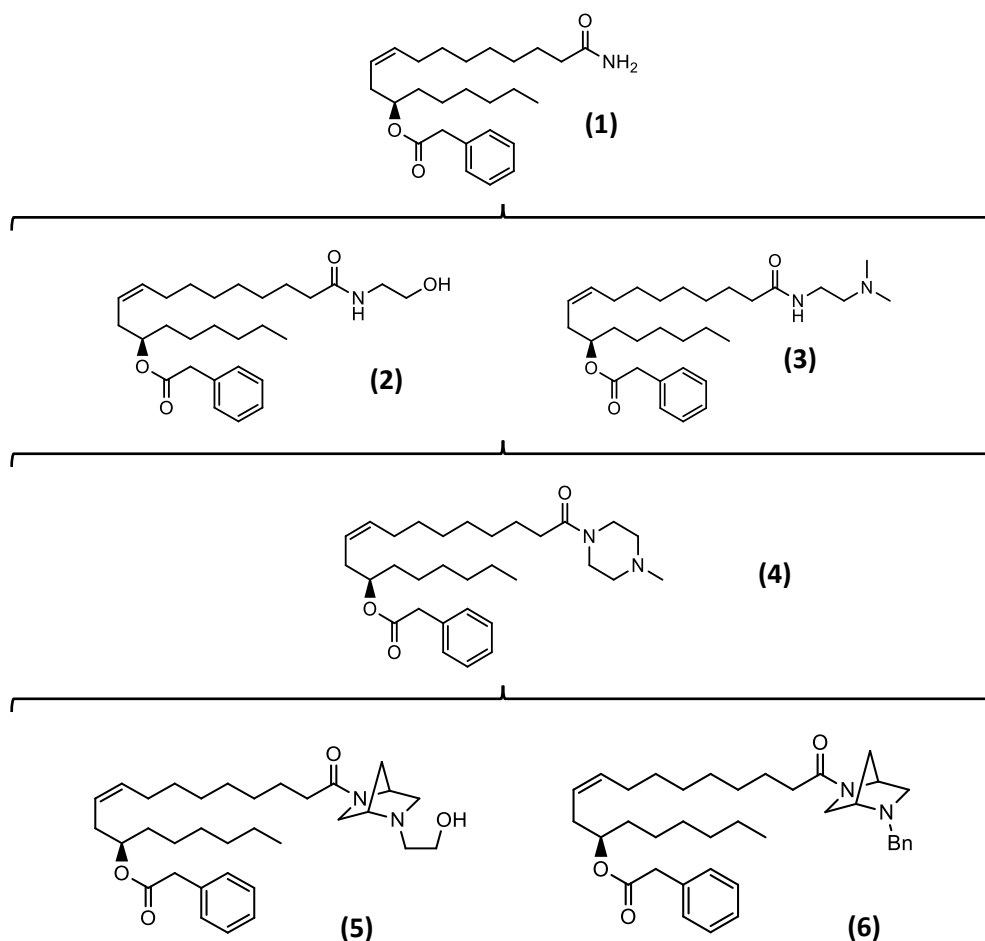
**Figura 8:** Estructura química de la Anandamida, un endocanabinoide con actividad antitumoral, la estructura base es una cadena polinsaturada con una etanolamida.

#### 1.5 Desarrollo de fenilacetilricinoleidamidas, amidas análogas de 12-FAR.

Los endocanabinoides como la anadamida es una etanolamida de ácidos grasos y considerando esta característica, Appedino y colaboradores en 2005 reportaron la modificación de la cadena del ácido fenilacetilricinoleico de donde deriva FAR, la modificación química introduce varios tipos de sustituyentes en el nitrógeno de la amida y ha sido evaluada su afinidad por los receptores CB1 y CB2 encontrando que el compuesto con mayor actividad biológica es la amida con un grupo

hidroxietilo. Otra estrategia para aumentar la actividad biológica de los fármacos es la introducción de fragmentos quirales debido a que incrementan la interacción Fármaco-Receptor más estables, lo que tiene como consecuencia un aumento en la eficacia terapéutica. Del mismo modo, las restricciones en la conformación de las moléculas pueden mejorar sus propiedades farmacológicas. Dentro de nuestro grupo de trabajo se han desarrollado moléculas análogas introduciendo sustituyentes en el nitrógeno de la amida, tal como anillos análogos de piperacina y la incorporación del sistema (1S, 4S)-2,5-diazobiciclo [2.2.1] heptano (Figura 9).

Los compuestos **(5)** y **(6)** son más efectivos para inhibir la proliferación de líneas leucémicas de ratón p388, J774 y WEHI-3 en comparación con 12-FAR (Tabla 2) (Luviano et al., 2011), sin embargo, la evaluación no se ha realizado en células humanas como K562, por lo que se debe evaluar el potencial de inhibición de los análogos FAR en esta línea celular.



**Figura 9:** Estructura de las amidas derivadas del 12-FAR; 12-Fenilacetilricinoleiamida (1), N-Hidroxietil-12-Fenilacetilricinoleiamida (2), *N*-(*NN*-dimetiletilamina)-12-Fenilacetilricinoleiamida (3), Fenilacetilato de (1*R*,3*Z*)-1-hexil-12-(4-*N*-metil-piperazina)-12-oxo-dodecenil (4), Fenilacetilato de (1*R*,3*Z*)-1-hexil-12-[(1*S*,4*S*)-2-hidroxietil-2,5-diazabicyclo[2.2.1]Heptan]-12-oxo-dodecenil (5) y Fenilacetilato de (1*R*,3*Z*)-1-hexil-12-[(1*S*,4*S*)-2-bencil-2,5-diazabicyclo[2.2.1]Heptan]-12-oxo-dodecenilo (6)

**Tabla 2.** Efecto de los análogos diazabicyclo (5) y (6) del 12-FAR sobre la proliferación de las líneas leucémicas de ratón y médula ósea normal.

Línea celular	IC50 (µg/mL)		
	12-FAR	(5)	(6)
P388	9.0	1.9	5.8
J774	8.0	2.2	6.5
WEHI-3	10.4	6.3	9.2
Médula ósea	40.7	73.5	39.4

Por otro lado, la elección de un nuevo compuesto antineoplásico para el tratamiento del cáncer depende del mecanismo por el cual realiza su efecto biológico, en este caso, inhibir la proliferación de las células leucémicas. Se prefiere que los quimioterapéuticos induzcan la apoptosis en células neoplásicas con un efecto selectivo con respecto a las células normales, por lo que se debe evaluar el mecanismo de acción de los nuevos antineoplásicos para el tratamiento del cáncer.

### 1.6 Muerte celular.

Se conocen dos tipos principales de muerte celular: apoptosis y necrosis. Ambos procesos comparten características en común, presentan diferencias morfológicas y bioquímicas (Tabla 3). La apoptosis es altamente regulada y permite la sobrevivencia del organismo, el componente central de este proceso es una familia de proteasas llamadas caspasas (cysteine aspartate-specific proteases), una familia de proteínas intracelulares involucradas en la iniciación y ejecución de la apoptosis (Wang et al., 2005). Por otro lado, la necrosis es un proceso degenerativo producido por factores ajenos al control celular como consecuencia de un trauma ambiental, temperatura extrema, isquemia, daño mecánico y como respuesta a una lesión grave, en este proceso de muerte se pierde la integridad de la membrana celular y produce una muerte por lisis, *in-vivo*, la liberación del contenido celular produce la aparición de procesos inflamatorios (Fink et al., 2005).

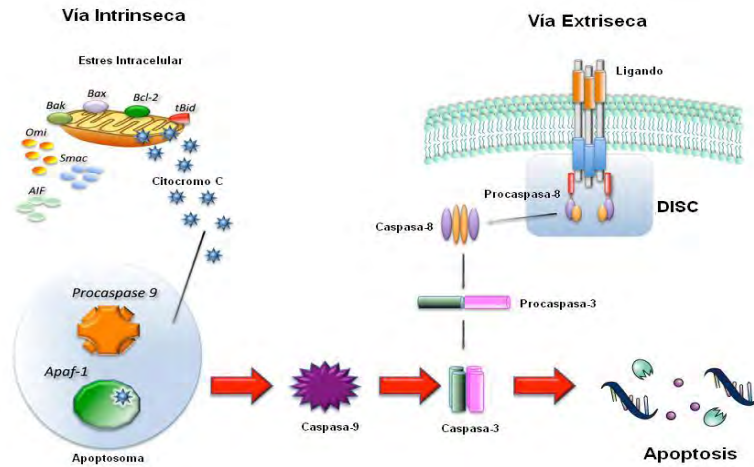
**Tabla 3.** Diferencias de apoptosis y necrosis.

Apoptosis	Necrosis
- Condensación de la cromatina nuclear.	- Incapacidad de mantener la integridad de la membrana.
- Formación de vacuola citoplasmática.	- Desnaturalización de las proteínas por acción de los lisosomas.
- Ampollas en la membrana plasmática.	- Inflamación.
- Activación de caspasas.	
- Formación de cuerpos apoptóticos.	

La apoptosis es un mecanismo de muerte celular programada que ocurre en casi todas las células vivas (Wang et al., 2005), en la embriogénesis natural las células son removidas por apoptosis y en la vida posnatal, la combinación entre la mitosis y apoptosis mantiene el número celular, de este modo, la apoptosis es un proceso integral en el mantenimiento de muchos tejidos, así como en la remodelación y reparación de los huesos (Chan et al., 2011). Los mecanismos que inician la apoptosis son la vía intrínseca (vía mediada por mitocondria) y la vía extrínseca (vía mediada por receptores de muerte). Aunque las fuerzas que inician la apoptosis varían entre los tipos celulares, los mecanismos de respuesta son compartidos (Chan et al., 2011; Wang et al., 2005).

La vía extrínseca se activa por señales químicas o mecánicas desde fuera de la célula. Esta vía es activada por los receptores de la muerte que son parte de la súper-familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR) y FAS es el mejor caracterizado, estos receptores de superficie celular son activados por unión a ligando y comparten un dominio citoplasmático conocido como dominio de muerte (DD). Las señales físicas o químicas activan múltiples proteínas intracelulares denominados conjuntamente “complejo de señalización de inducción de muerte” (DISC por sus siglas en inglés). El DISC activa una cascada de señalización dependiente de caspasas, donde procaspasa 8 es liberada del DISC como caspasa-8 activa, posteriormente caspasa-8 hidroliza procaspasa-3 y como caspasa-3 activa media la liberación de una desoxirribonucleasa dependiente de caspasa (CAD) que desencadena la fragmentación del ADN (Chan et al., 2011).

El otro mecanismo es la vía intrínseca, esta mediada por las mitocondrias inducida e por agentes antineoplásicos, radiación UV y estrés. Inicia con el cambio en la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial, resultando en la liberación de proteínas normalmente encontradas entre las membranas interna y externa de la mitocondria (incluyendo: citocromo C y factor de inducción de apoptosis entre otras); después, se reduce del potencial transmembrana. La liberación de citocromo C conduce a la formación de un complejo heptamérico activador de caspasa (formado por citocromo C, Apaf-1, desoxiadenosin trifosfato dATP y procaspasa-9), también llamado apoptosoma, (Wang et al., 2005). La activación de caspasa-9 da lugar a la activación de una caspasa efectora como caspasa-3, -6 o -7. Esta caspasa efectora activa una proteína blanco y culmina en la muerte celular (Figura 10). La desregulación y la acumulación de los defectos en el proceso de apoptosis pueden llevar a diversas enfermedades y patologías como el cáncer, autoinmunitarias y neurodegeneración. Por lo que el entendimiento del mecanismo que regula la supervivencia celular pueden ayudar a identificar nuevas estrategia terapéuticas (Chan et al., 2011; Wang et al., 2005).



**Figura 10:** Mecanismos de apoptosis. La vía intrínseca de la apoptosis es activada por el estrés intracelular, daño al material genético y alteración de la mitocondria, por otro lado, la vía extrínseca depende de señales extracelulares unidas a receptores de la muerte, la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF). Ambas vías convergen en una caspasa efectora, generalmente caspasa 3, la cual induce cambios en el citoesqueleto y la fragmentación ordenada del ADN.



## 2. PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA

Para el caso de la leucemia mieloide crónica se cuenta con el Imatinib un fármaco que ha demostrado su efectividad y es la primera opción para el tratamiento de esta enfermedad, sin embargo, algunos pacientes pueden ser intolerantes o las células leucémicas pueden desarrollar resistencia al medicamento, lo que deja a los pacientes con pocas o nulas opciones para su tratamiento.

El 12-FAR ha demostrado la capacidad de inhibir la proliferación e inducir la formación de cuerpos apoptóticos de las líneas celulares leucémicas murinas P388, J774 y WEHI-3 sin afectar la proliferación de células normales de médula ósea de ratón y los derivados del 12-FAR son más efectivos que este para inhibir la proliferación de células leucémicas murinas manteniendo la selectividad con las células normales. Los resultados *in-vitro* podrían sugerir que es viable el empleo del 12-FAR y sus como fármacos antileucémico, sin embargo, la línea celular leucémica humana K562 no es sensible al tratamiento con 12-FAR y se desconoce su efecto de estos análogos en esta línea leucémica, así como en células humanas normales. En caso de que los derivados sean capaces de inhibir la proliferación de K562 también es importante conocer el mecanismo de inducción de muerte celular, debido a que podría inducir necrosis y producir inflamación a nivel sistémico..

### **3. HIPOTESIS**

Los compuestos derivados del 12-FAR a los que se le incorporan el anillo diazabicycloheptano son más efectivos que el compuesto base para inhibir la proliferación y activar la apoptosis de la línea K562.

### **4. OBJETIVO**

#### **4.1. Objetivo general.**

Evaluar el potencial antiproliferativo y proapoptotico de seis análogos del 12-FAR en la línea celular leucémica humana K562.

#### **4.2. Objetivos particulares.**

Confirmar el efecto antiproliferativo del 12-FAR en la línea celular K562 y analizar el efecto de seis de sus análogos sobre la proliferación y viabilidad de la línea celular K562.

Seleccionar el o los análogos del 12-FAR con la mayor capacidad para inhibir la proliferación de K562 y evaluar la inducción de apoptosis de esta línea celular.

Determinar si la inhibición de la proliferación en la línea celular K562 tratada con el o los análogos que resulten más efectivos es consecuencia de un efecto citostático.

Evaluar la translocación de fosfatidilserina y la incorporación de 7AAD en células K562 tratadas con el o los análogos que resulten más activos.

## **5. METODO.**

### **5.1 Cultivo celular.**

La línea celular K562 (ATCC® CCL-243™) se cultivó en medio Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, Gibco BRL, USA), suplementado con 10% v/v de suero fetal bovino (SFB, Gibco BRL, USA) previamente inactivado por calor, la incubadora se mantuvo a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y con humedad saturada.

### **5.2 Derivados del ácido 12-fenilacetil ricinoleico**

Los derivados del ácido 12-fenilacetil ricinoleico: 12-Fenilacetilricinoleiamida (1), N-Hidroxietil-12-Fenilacetilricinoleiamida (2), N-(NN-dimetiletilamina)-12-Fenilacetilricinoleiamida (3), Fenilacetilato de (1R,3Z)-1-hexil-12-(4-N-metil-piperazina)-12-oxo-dodecenil (4), Fenilacetilato de (1R,3Z)-1-hexil-12-[(1S,4S)-2-hidroxietil-2,5-diazabicyclo[2.2.1]Heptan]-12-oxo-dodecenil (5) y Fenilacetilato de (1R,3Z)-1-hexil-12-[(1S,4S)-2-bencil-2,5-diazabicyclo[2.2.1]Heptan]-12-oxo-dodecenilo (6). Fueron sintetizados en el laboratorio de Síntesis Farmacéutica de la UMIEZ, FES Zaragoza de la UNAM por el Dr. Ignacio Regla y sus colaboradores.

### **5.3 Ensayos de proliferación.**

Para los ensayos de proliferación, las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos (Corning, USA) con una densidad inicial de 50,000 cel/mL en presencia de 12-FAR o los análogos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 con dosis entre 0.3 y 100 µg/mL; para el Imatinib se usaron dosis entre 0.0054 y 0.82 µg/mL. Las células fueron incubadas durante 48 horas en condiciones de cultivo (suero fetal bovino 10%, 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y con humedad saturada). Transcurrido el tiempo de incubación, la proliferación fue evaluada por la técnica colorimétrica cristal violeta, para la cual, las células fueron fijadas con glutaraldehído 1% durante 24 horas, después se adicionaron 50 µL de cristal violeta 1% e inmediatamente después se eliminó el colorante realizando varios lavados con agua ultra purificada (Milli-Q) y se dejó secar ligeramente a temperatura ambiente, finalmente se adicionó 50 µL de ácido acético al 10% y se dejó reposar por 20 minutos con agitación. La absorbancia se determinó con un espectrofotómetro (TECAN A-5082 Spectra, Austria) a 570 nm.

La proliferación se reporta como un porcentaje de proliferación usando como 100% la absorbancia de las células sin tratamiento, se realizaron ensayos usando dosis entre 1 y 10 µg/mL, se determinó por regresión lineal la dosis media de inhibición (IC<sub>50</sub>) y posteriormente se confirmó la dosis de forma experimental.

#### **5.4 Aislamiento y cultivo de linfocitos de sangre periférica.**

Los cultivos primarios de linfocitos de sangre periférica humana se realizaron a partir de 15 mL de sangre obtenida con una jeringa heparinizada (Heparina 5000 UI/mL). En un tubo de vidrio con fondo cónico se colocaron 5 mL de Ficol Hystopaque, se agregó lentamente la sangre con una proporción Ficol-sangre 1:1. El tubo se centrifugo a 750 rpm durante 5 minutos, al terminar, se aumenta la velocidad a 2000 rpm durante 25 minutos. Se colecto el anillo de células mononucleadas y se realizaron dos lavados con 10 mL de medio de cultivo IMDM. Terminado el segundo lavado, el botón celular se resuspendió en medio suplementado con 20% de SFB y se incubó en una caja petri a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> durante 1 hora. Al finalizar la incubación se colectaron las células en suspensión.

Para el ensayo de proliferación, las células se cultivaron las células en placas de 96 pozos (Corning, USA) en medio de cultivo IMDM con 20% de SFB y 15 µg/mL de fitohemaglutinina en placa de 96 pozos. 24 horas después del inicio del cultivo se estimularon las células con los compuestos que inhibieron la proliferación de la línea leucémica K562 usando dosis entre 1 y 10 µg/mL, 48 horas después del estímulo, las células se fijaron y evaluaron por el método de cristal violeta.

#### **5.5 Evaluación del ciclo celular.**

Como un indicativo de la etapa del ciclo celular en la cual se encuentran las células, se evaluó la cantidad relativa de ADN por medio de citometría de flujo. Las células fueron incubadas durante 36 horas en presencia de los compuestos que inhibieron la proliferación de K562 o Imatinib usando como dosis la IC<sub>50</sub> de cada uno, más un control sin tratamiento. Terminado el cultivo las células fueron colectadas y centrifugadas a 1500 rpm durante 5 min, se realizaron dos lavados con 3 mL de Buffer de Fosfatos (Phosphate Buffer Solution, PBS), terminados los lavados las células fueron permeabilizadas usando 1 mL de etanol absoluto y se dejaron incubar 24 horas. Finalizada la incubación se adicionó 20 µL de Yoduro de propidio a cada muestra, estas se mantienen en hielo y protegidas de la luz hasta ser analizadas en el Címetro BD FACSAria II Cell Sorter. La adquisición por citometría se realiza en la hora siguiente a la incubación.

#### **5.6 Inducción de la formación de cuerpos apoptoticos**

Para el análisis citomorfológico, se colocaron las células en placas de 24 pozos y fueron incubadas en presencia de los compuestos que inhibieron la proliferación de K562 o Imatinib usando como dosis la IC<sub>50</sub> de cada uno, más un control sin tratamiento, se tomó una muestra a las 12, 24, 36 y 48 horas. En cada toma, se colectaron las células y se colocaron cuatro laminillas por cada condición en una centrifuga Cytospin®, las muestras se centrifugaron 5 min a 25 speed, después se fijaron con metanol y se tiñeron con colorante Giemsa para sangre, finalmente las células se observaron con ayuda microscopio con un objetivo 40X. En cada laminilla se contaron hasta 200

células, los resultados se expresan como el promedio del porcentaje de células apoptóticas con respecto al total de células contadas en cada condición.

### **5.7 Detección de apoptosis por PE-ANEXINA V y 7AAD.**

Las células K562 fueron incubadas en presencia de los compuestos 3, 5 o Imatinib con las dosis de 3.6 µg/ml, 4 µg/ml o 0.5 µM respectivamente, más un control sin tratamiento. Al término de 36 horas de cultivo, se observó al microscopio para asegurarse de que estuvieran libres de contaminación. Se colectaron las células en tubos de vidrio de 15ml y fueron centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos, se desechó el sobrenadante por decantación y se realizaron dos lavados más, el primero con 3 mL PBS+SFB al 5% y el segundo con 3 mL PBS, centrifugando a 1500 rpm y decantar. El botón celular se resuspendió en 500 µL de buffer Anexina V, se realizó un conteo celular por la técnica de exclusión de azul tripano, para conocer la densidad celular y la viabilidad de la muestra. Se tomó la cantidad equivalente a  $5 \times 10^5$  células y se colocan en un tubo FACS de 5 ml. Se adicionan 5 µL de PE+ANEXINA V y 5 µL de 7AAD (PE Annexin V Apoptosis Detection Kit 1, BD Pharmingen™). Se agitó suavemente y se incubó a temperatura ambiente, 15 minutos en la oscuridad. Terminada la incubación, se añadieron 400 µL de Buffer Anexina V (el buffer se preparó haciendo una dilución 1:10 con agua Milli Q esteril). Las muestras se mantuvieron en hielo y protegidas de la luz hasta ser analizadas en el Citómetro BD FACSAria-II Cell Sorter. La adquisición por citometría se realizó dentro del periodo de una hora posterior a la incubación.

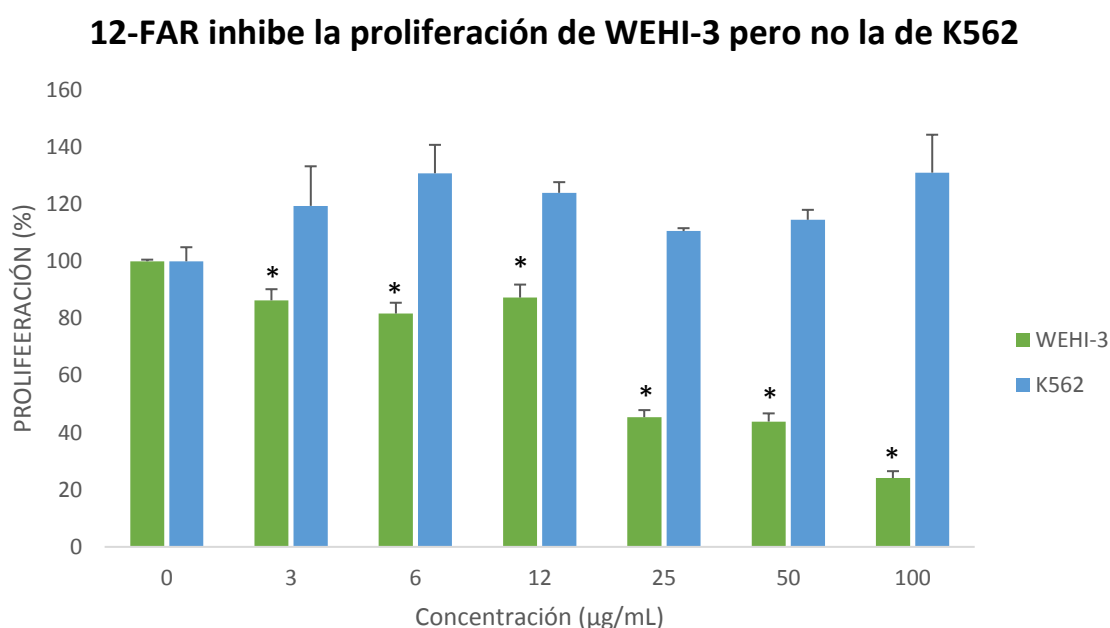
### **5.8 Tratamiento estadístico.**

Para determinar las diferencias significativas se utilizó la prueba Dunnett (comparación con un control). Se consideraron diferencias significativas cuando el valor de p fue menor que 0.01.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Confirmación el efecto de 12-FAR y evaluación del efecto de sus análogos sobre la proliferación de las células WEHI-3 y K562.

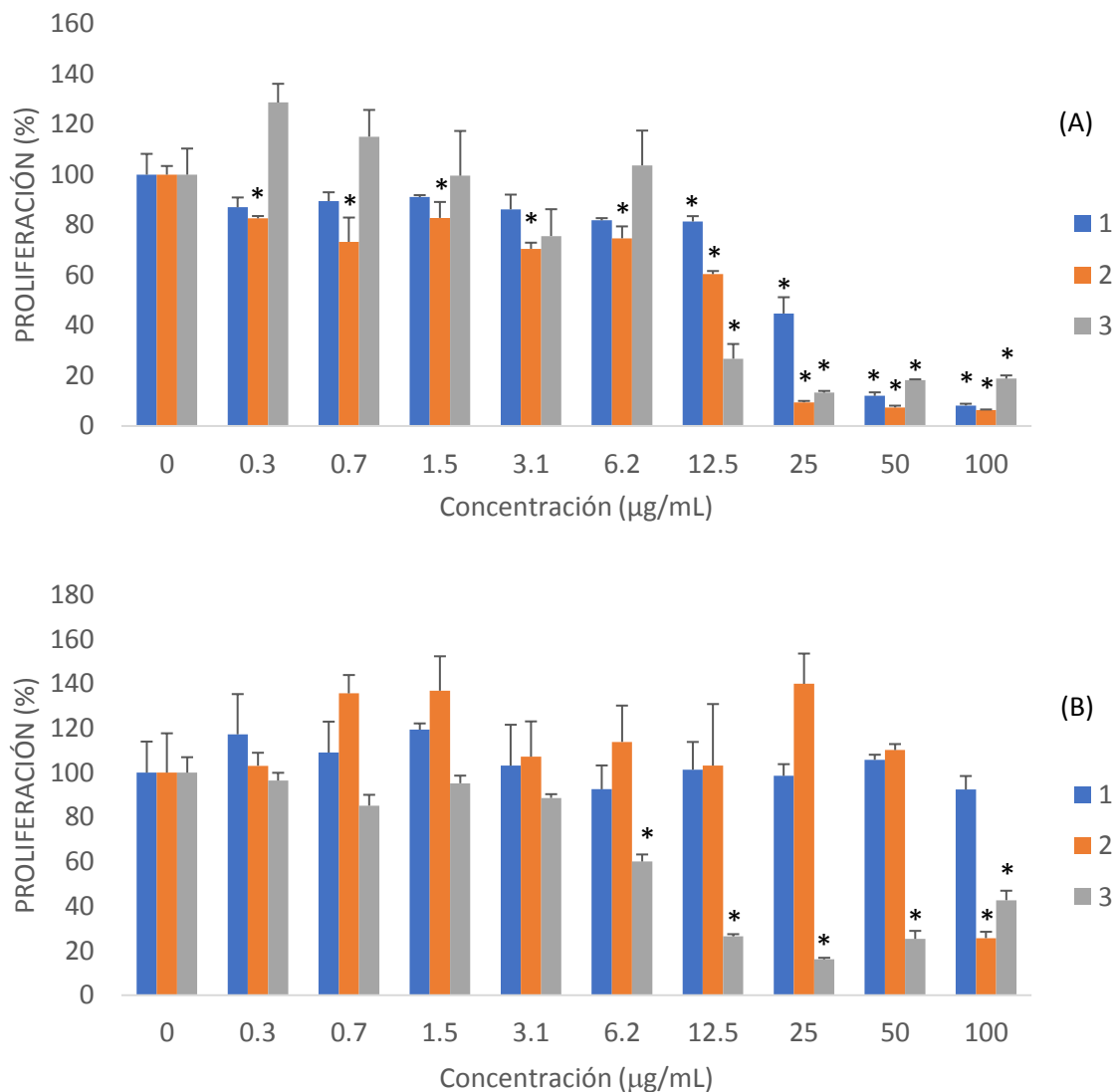
Existen reportes previos de la capacidad del 12-FAR para inhibir la proliferación de las líneas celulares leucémicas de ratón: WEHI-3, J774 y P388; así como la línea celular leucémica humana K562, esta última menos sensible al efecto del 12-FAR. En las condiciones experimentales del presente trabajo, se confirmó el potencial de 12-FAR para inhibir la proliferación de la línea WEHI-3, pero a las mismas dosis no inhibieron la proliferación de la línea K562 (Grafica 1).



**Gráfica 1.** Se muestra el porcentaje de proliferación de la línea celular leucémica de ratón WEHI-3 y la línea celular leucémica humana K562 estimuladas con diferentes concentraciones de 12-FAR (0-100 µg/mL) evaluadas a las 48 horas por el ensayo de cristal violeta a 570 nm. La gráfica representa el promedio de tres experimentos independientes. \*Diferencia significativa respecto a las células sin tratamiento (Dunnett  $p < 0.01$ ).

Los primeros derivados en ser evaluados fueron las risinoleiamidas, compuestos que resultan de la modificación del fragmento vainillilamida del 12-FAR, los compuestos 1, 2 y 3 inhibieron la proliferación de la línea leucemia de ratón WEHI-3 de forma dosis dependiente (Gráfica 2A), efecto similar al que posee el 12-FAR. Por otro lado, de este grupo de compuestos solo el 3 (NN-Dimetil-etil-12-Fenilacetil-Ricinoleiamida) fue efectivo para inhibir la proliferación de la línea celular K562 en dosis mayores a 3.1 µg/mL (Grafica 2B).

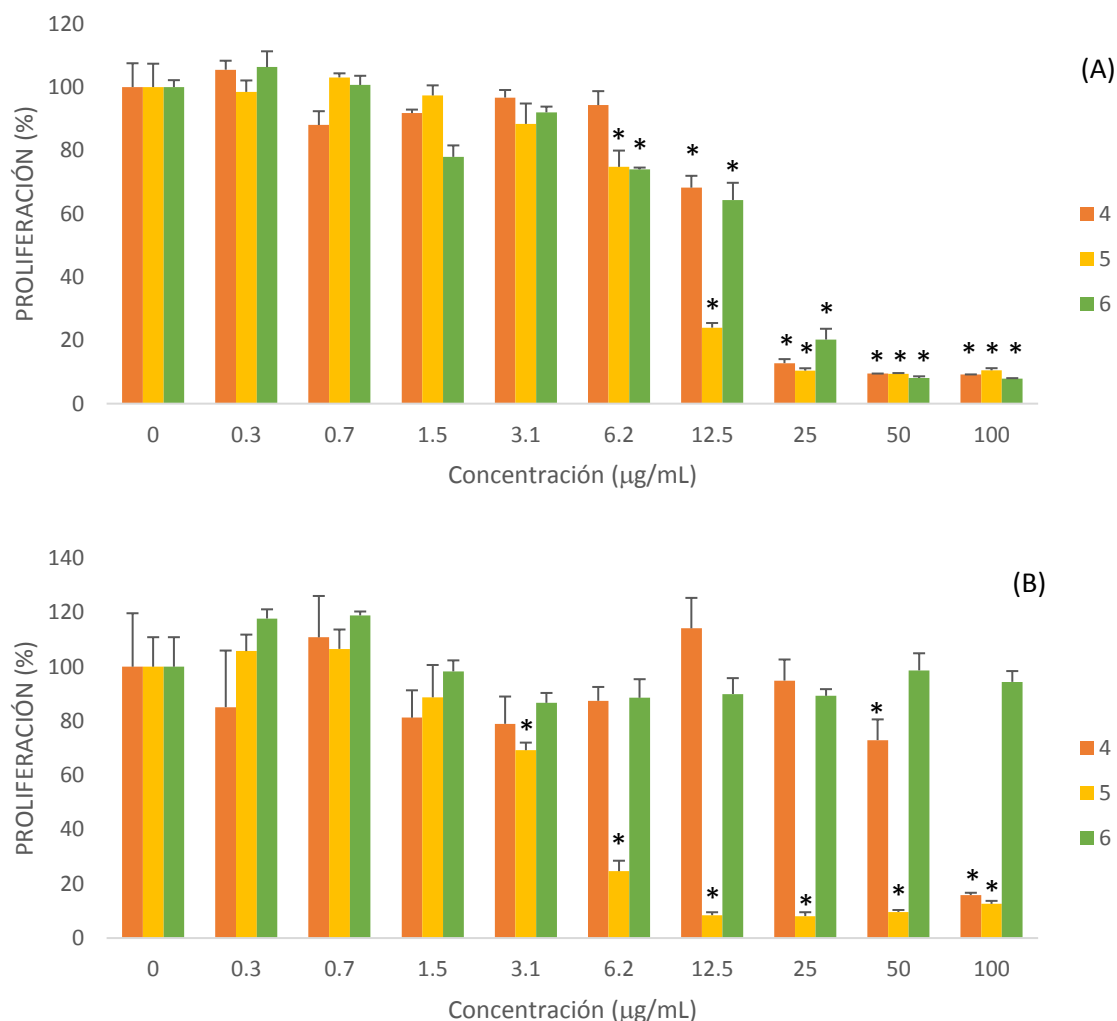
**Los compuestos 1, 2 y 3 inhiben la proliferación de WEHI-3, pero solo 3 inhibe la proliferación de K562**



**Gráfica 2.** Porcentaje de proliferación de la línea celular WEHI-3 (A) y K562 (B) a diferentes concentraciones (0-100 µg/mL) de los análogos de 12-FAR; compuestos 1, 2 y 3. La proliferación se evaluó a las 48 horas por la técnica de cristal violeta a 570 nm. Las gráficas representan el promedio de tres experimentos independientes. \*Diferencia significativa respecto a las células sin tratamiento (Dunnett  $p < 0.01$ ).

Otras de las modificaciones realizadas a la vainillilamida del 12-FAR, incluye la sustitución por piperacina (4), un hidroxietil diazabicyclo (5) o bencil diazabicyclo (6), todos estos análogos resultantes inhibieron la proliferación de WEHI-3 de manera dosis dependiente (Gráfica 3A), pero solamente el compuesto 5 lo hace sobre la línea celular K562 (Gráfica 3B) en dosis mayores a 1.5 µg/mL

### Los compuestos 4, 5 y 6 inhiben la proliferación de WEHI-3, pero solo el compuesto 5 inhibe la proliferación K562

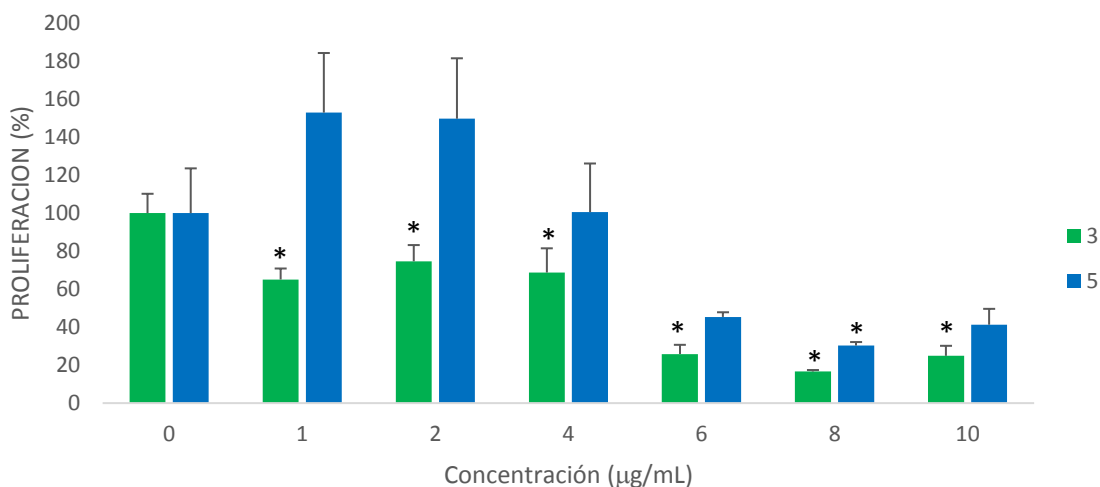


**Gráfica 3.** Porcentaje de proliferación de la línea celular WEHI-3 (A) y K562 (B) a diferentes concentraciones (0-100 µg/mL) de los análogos de 12-FAR; compuestos 4, 5 y 6. La proliferación se evaluó 48 horas por la técnica de cristal violeta a 570 nm. Las gráficas representan el promedio de tres experimentos independientes. \*Diferencia significativa respecto a las células sin tratamiento (Dunnett p<0.01)

Una vez mostrado que solo los compuestos 3 y 5 poseen un efecto citotóxico sobre la línea celular K562, se procedió a evaluar su efecto en linfocitos normales de sangre periférica. Los linfocitos también mostraron ser sensibles al tratamiento con los análogos a una dosis entre 1 y 10 µg/mL (Gráfica 4). Para lograr comparar el efecto en ambos tipos celulares, se empleó el análisis por regresión lineal para determinar la IC<sub>50</sub> de ambos compuestos (Tabla 4), dosis que fueron confirmadas experimentalmente, el compuesto 3 posee un efecto citotóxico similar en células leucémicas y normales, por el contrario, el compuesto 5 parece ser más selectivo entre células tumorales que sobre linfocitos normales.



## Los compuestos 3 y 5 inhiben la proliferación de linfocitos normales de sangre periférica.



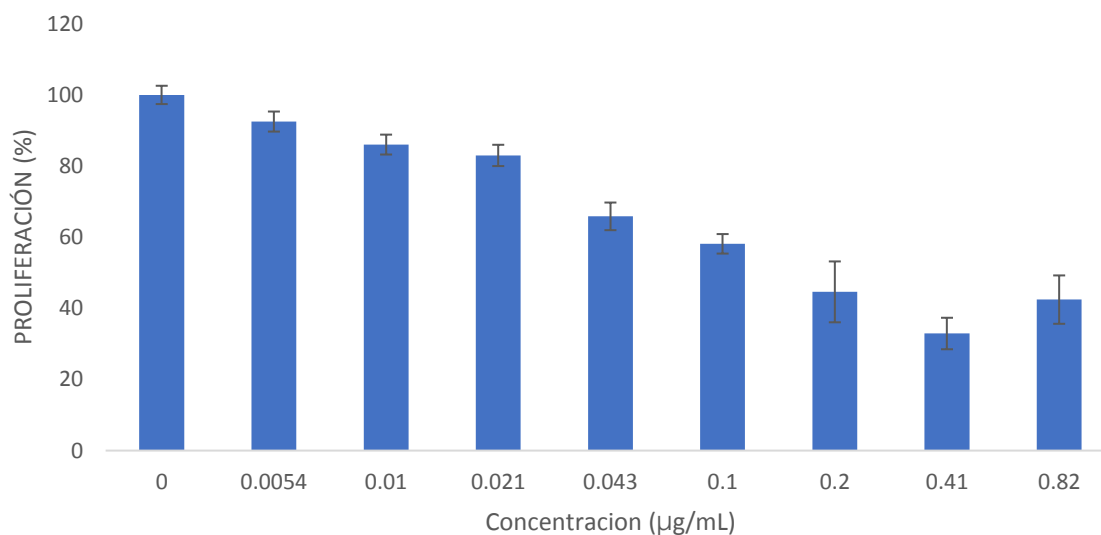
**Gráfica 4.** Porcentaje de proliferación de linfocitos humanos de sangre periférica a diferentes concentraciones de los compuestos **3** (NN-dimetil) y **5** (5N-Hidroxietil), la proliferación se evaluó a las 72 horas de cultivo con 48 horas de estímulo, usando medio suplementado con fitohemaglutinina por la técnica de cristal violeta a 570 nm. La gráfica representa el promedio de tres experimentos independientes. \*Diferencia significativa respecto a las células sin tratamiento (Dunnett  $p < 0.01$ ).

Tabla 4: Valores de  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) de 12-FAR y sus análogos en la línea leucémica humana K562.

Tratamiento	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	K562	Linfocitos
12-FAR	>100	>100
Compuesto 3	3,6	4,0
Compuesto 5	4,0	8,1

Se empleó como fármaco de referencia al Imatinib, el cual es empleado en la clínica debido a su demostrada actividad antileucémica. Se ha reportado que la línea celular leucémica K562 es capaz de generar resistencia a multidrogas, por lo que se realizó el ensayo de proliferación para conformar la sensibilidad de la línea celular al fármaco modelo, se usaron dosis de 0.0054 a 0.82  $\mu\text{g/mL}$  (0.011 a 1.66  $\mu\text{M}$ ) y se observó que el imatinib inhibe la proliferación de K562 de forma dosis dependiente (Gráfica 5), con una  $IC_{50}$  próxima a 0.2  $\mu\text{g/mL}$  o 0.4  $\mu\text{M}$  la cual es similar a las dosis empleadas del fármaco para inducir apoptosis en la línea K562.

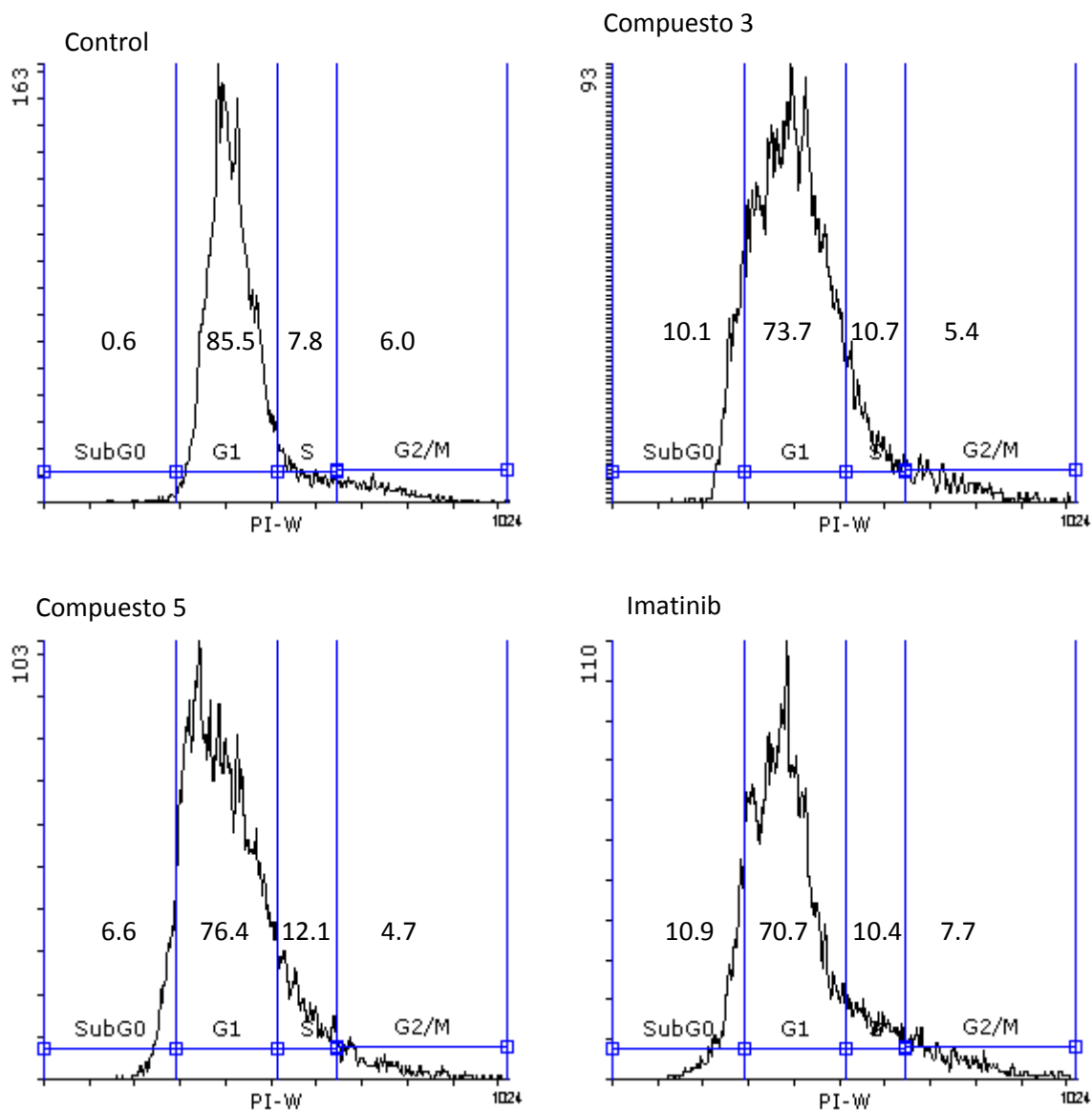
## El Imatinib inhibe la proliferación de la línea K562



**Gráfica 5.** Porcentaje de proliferación de la línea leucémica humana diferentes concentraciones del fármaco Imatinib, la proliferación se evaluó a las 48 horas de estímulo por la técnica de cristal violeta a 570 nm. La gráfica representa el promedio de tres experimentos independientes.

### 6.2 Evaluación del efecto los análogos (3) y (5) en el ciclo celular de la línea leucémica humana K562.

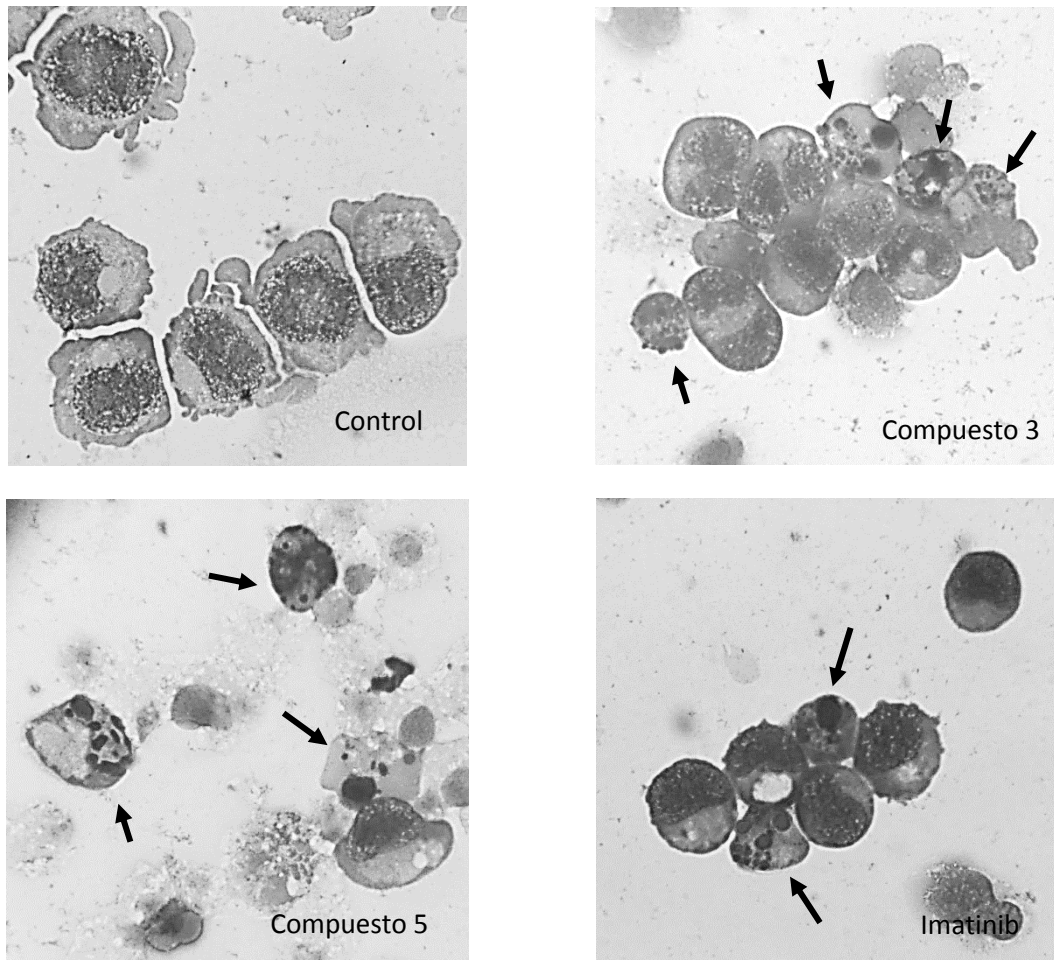
Los fármacos citostáticos impiden que las células avancen a través del ciclo celular, inhibiendo así su proliferación. El análisis por citometría de flujo muestra que los compuestos (3) y (5), así como el imatinib, usando la dosis de  $IC_{50}$  se indujo una evidente acumulación de células en la fase Sub-G0, comparado con células sin tratamiento. También, los tratamientos incrementan el número de células en S y solo el compuesto 5 reduce en la región G2/M (Histograma 1).



Histograma 1: Las células K562 fueron cultivadas durante 36 horas, posteriormente los núcleos fueron fijados y teñidos con IP. Las muestras control sin tratamiento y tratadas con compuesto 3, 5 o Imatinib, fueron adquiridos en un citómetro FACS Area II y los datos analizados el Flowing Software 2.5.1.

### 6.3 Los compuestos (3) y (5) Inducen la formación de cuerpos apoptóticos en la línea celular K562.

Durante la apoptosis las células sufren una condensación nuclear y citoplasmática, desintegración nuclear, condensación de la cromatina y aspecto de burbujas en la membrana (Arango et al., 1997). Las células leucémicas K562 tratadas durante 36 horas con los compuestos 3, 5 y el Imatinib presentan esta morfología de células apoptóticas (Figura 11, señalado por flechas), el porcentaje de cuerpos apoptóticos se incrementa desde las 24 horas, efecto que se mantiene hasta las 48 horas (Tabla 5).



**Figura 11:** Cuerpos apoptoticos (señalados con flechas) inducidos por los compuestos (3), (5) y el Imatinib en la línea celular K562, obtenidas del análisis citomorfológico, células teñidas con colorante Giemsa para sangre observados en microscopio con un objetivo 100X.

**Tabla 5:** Porcentaje de cuerpos apoptoticos en la línea celular K562 evaluados hasta las 48 horas.

	12 H	24 H	36 H	48 H
Control	0,22 ± 0,44	1,06 ± 1,24	1,41 ± 0,49	2,10 ± 1,25
Vehículo	0,24 ± 0,47	0,46 ± 0,53	0,49 ± 0,56	1,67 ± 1,45
Compuesto 3	1,31 ± 1,08	12,10 ± 3,37	28,89 ± 6,29	58,57 ± 2,02
Compuesto 5	2,93 ± 1,82	11,80 ± 0,95	42,84 ± 1,28	51,85 ± 20,95
Imatinib	2,59 ± 1,59	8,14 ± 1,25	44,67 ± 2,96	55,30 ± 3,03

Se presenta el promedio de tres experimentos independientes.

#### 6.4 Los compuestos 3 y 5 inducen translocación de fosfatidilserina y la incorporación de 7AAD en la línea celular K562.

Una vez demostrada la formación de cuerpos apoptóticos por morfología, se procedió a evaluar la apoptosis por citometría de flujo por el ensayo de ANNEXINA-V y 7-AAD, el cual permite observar en una población celular diferentes eventos como la apoptosis temprana (simple positivo para ANNEXINA, Q4), apoptosis tardía (doble positivo, Q2) y necrosis (simple positivo para 7-AAD, Q1). Se observó que las células tratadas con los compuestos 3, 5 e Imatinib incrementan el porcentaje en los cuadrantes Q4 y Q2, que corresponden a la apoptosis (Figura 12) y este incremento es significativo comparado con células sin tratamiento (Grafica 6)

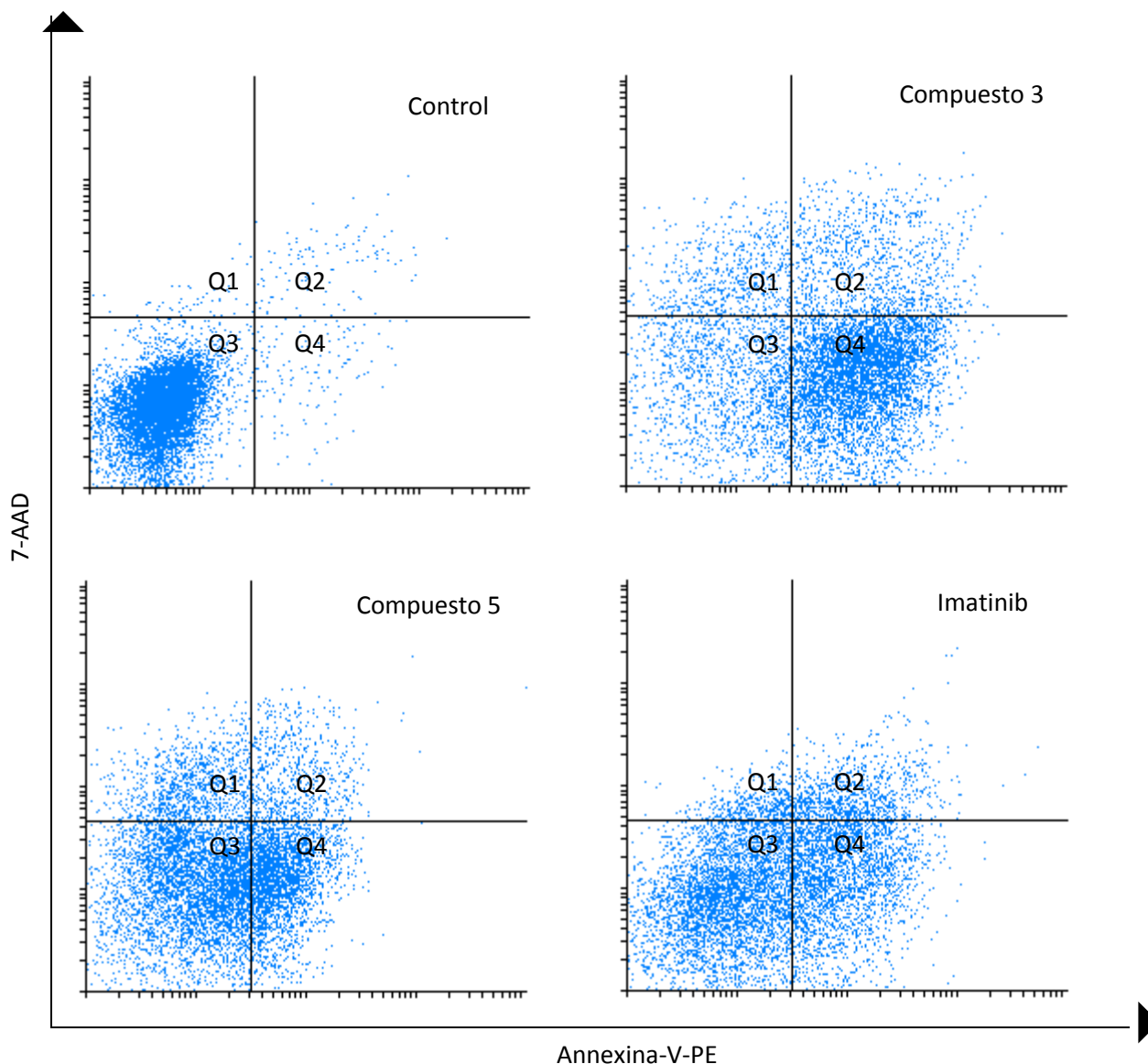
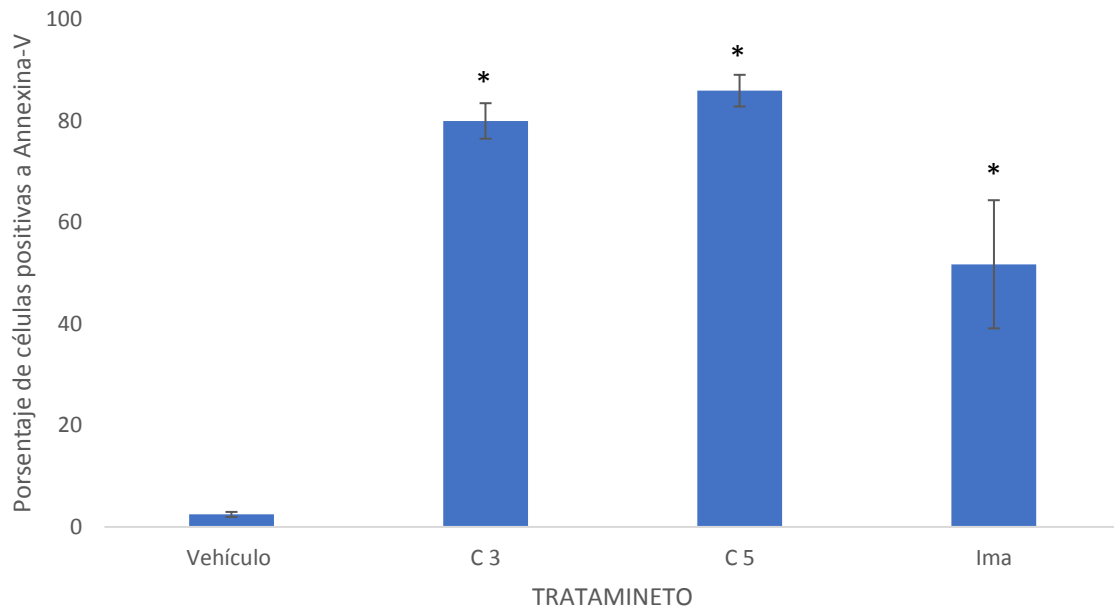


Figura 12: Células apoptóticas detectadas por la técnica de Annexina-V-PE/7-AAD por citometría de flujo, después de 36 horas de cultivo, las células sin tratamiento y las células K562 tratadas con el compuesto 3, 5 o Imatinib.

### 3, 5 e Imatinib inducen aumento en el porcentaje de células con translocación de fosfatidilserina.



**Grafico 6:** Porcentaje de células K562 positivas a Annexina-V-PE, se presenta el promedio de tres experimentos independientes. Las células fueron tratadas durante 36 horas. \*Diferencias significativas con respecto a células sin tratamiento ( $p < 0.05$ ).

## 7. DISCUSIÓN.

Actualmente, la primera elección para el tratamiento de la leucemia mieloide crónica es el Imatinib y sus análogos. Aun cuando se ha logrado aumentar la supervivencia de los pacientes, la realidad es que el tratamiento con Imatinib y sus análogos de la segunda y tercera generación no es curativo (Ayala et al., 2016). Los efectos tóxicos de este medicamento y el desarrollo de resistencia al mismo en células tumorales de algunos pacientes hacen necesario el desarrollo de alternativas para el tratamiento de esta y otras leucemias. Compuestos orgánicos de origen natural son una de las mejores fuentes para el desarrollo de nuevos fármacos, un ejemplo de esto son los análogos de capsaicina: Rinvanil y 12-Fenilacetilrinavnil (12-FAR), los cuales inhiben la proliferación de células leucémicas de ratón sin afectar la proliferación de las células de médula ósea normal (Luviano et al., 2014). El 12-FAR carece del efecto pungente y posee una mayor afinidad por el receptor TRPV1 que la capsaicina (Voets et al., 2004). El TRPV1 es un canal con alta permeabilidad a  $\text{Ca}^{+2}$  que participa en la nocicepción, la activación de neuronas sensoriales del nervio vago presenta un efecto analgésico por medio de la desensibilización del canal de calcio o degradación de las fibras sensoriales (Baamonde et al., 2005), inhibe la metástasis de la línea celular de cáncer de seno 4THM (Erin et al., 2012), induce apoptosis en Mioblastos de rata H9C2 durante la hipoxia (Sun et al., 2014), esto indica que a pesar de que el TRPV1 no es un receptor de muerte celular es capaz de inducir apoptosis. Sin embargo, aunque se ha demostrado que la capsaicina es capaz de inducir apoptosis en diversas líneas celulares cancerígenas y la capacidad del canal TRPV1 para inducción apoptosis, se desconoce el mecanismo por el cual el análogo 12-FAR reduce la proliferación de las células leucémicas.

En las condiciones experimentales de este trabajo, se confirma que el 12-FAR inhibe la proliferación de la leucemia murina WEHI-3 y en contraste con los reportes previos (Luviano et al., 2014), no tiene efecto sobre las células de la línea leucemia mieloide crónica humanas K562, las cuales no son sensibles al tratamiento con hasta 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de 12-FAR. Una posible explicación de la diferencia de resultados, es que K562 es capaz de desarrollar resistencia a fármacos por distintos mecanismos, los cuales incluyen: La mutación de genes, amplificación del gen Bcr-Abl, sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas e incremento en el flujo de la glicoproteína-p transportadora de fármacos (Wei, To & Au-Yeung, 2015; Yang & Fu, 2015). Particularmente, en el caso de las células K562 usadas en este trabajo, se ha demostrado que expresan proteína de multiresistencia a drogas 1 (MDR-1/ABCB1) (De la Cruz-Rosas et al., 2015), fenotipo que es considerado la principal causa de falla en la quimioterapia del cáncer (Assef et al., 2009).

Con el objetivo de generar compuestos más efectivos que el 12-FAR para inhibir la proliferación de células neoplásicas, fueron sintetizados varios análogos del 12-FAR. Los primeros análogos generados fueron los compuestos 1, 2 y 3 llamados ricinoleiamidas, quienes, en este trabajo, mostraron una capacidad inhibitoria de la proliferación de células leucémicas WEHI-3 (Grafica 2). Sin embargo, los compuestos 1 y 2 no presentan efecto en la línea leucémica K652 con una dosis máxima de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , en cambio para el compuesto 3 (NN-dimetilaminoetil-12-Fenilacetilricinoleidamida), las células son sensibles a una concentración de 6.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , demostrando el potencial antileucémico en células humanas ausente en los demás compuestos.

Los compuestos de tipo dimetilaminoetil amidas de cadena larga como el compuesto 3, son empleados en productos cosméticos (Patente WO2008/64976) y en este trabajo se demuestra por primera vez la actividad antiproliferativa de un compuesto de este tipo.

El compuesto 2 (N-Hidroxietil-12-Fenilacetilricinoleidamida) es una etanolamida de cadena larga similar al canabinoide anandamida. Los endocannabinoides son un grupo de compuestos que en mamíferos regulan funciones cardiovasculares, nerviosas, metabólicas, reproductivas e inmunes, con efectos como la vasorelajación o con actividad antiinflamatoria (Flygare & Sander, 2008). La actividad de los cannabinoides esta mediada por los receptores CB1 y CB2, así como la interacción de estos con receptores de tipo canal iónico de potencial transitorio y receptores nucleares (Console-Bram et al., 2012). Los receptores CB también son blanco terapéutico para el tratamiento del cáncer, numerosos estudios proponen que los endocannabinoides inhiben directamente el crecimiento tumoral y el efecto anti-proliferativo es mostrado por cannabinoides naturales y sintéticos (Flygare & Sander, 2008; Pisanti & Bifulco, 2009). La anandamida inhibe a las células del sistema inmune, también, presenta la capacidad de inducir apoptosis en leucemias humanas, efectos mediados por el receptor CB2 (Brown et al., 2013). La diferencia del compuesto 2 con la anandamida y otros cannabinoides de tipo etanolamidas es la presencia de un fenilacetilo en el carbono 12. Existe la posibilidad de que este grupo funcional bloquee la unión del compuesto 2 con los receptores CB, lo que se observa como la falla de este compuesto para inhibir la proliferación de K562. Similar al compuesto 2, el compuesto 3 posee un grupo fenilacetilo y debería ser incapaz de interactuar con los receptores cannabinoides, esto indicaría que la capacidad del compuesto 3 para inhibir la proliferación de K562 posiblemente es independiente a los receptores CB, haciendo necesario investigar una vía alternativa para explicar el mecanismo de inhibición de la proliferación inducida por el C3.

Adicional al impedimento estérico producto de grupos funcionales como el fenilacetilo, otro de los factores que afectan la interacción de los fármacos con sus receptores es la conformación y la configuración que pueden presentar estos compuestos orgánicos. Para reducir los cambios se generaron otros análogos de 12-FAR en los que se reduce la variabilidad de conformación en la cabeza aminoetilamida. Los análogos que se desarrollaron fueron el compuesto 4; análogo de piperazina y los compuestos 5 y 6, derivados del anillo diazabicyclo heptano; los tres compuestos inhibieron la proliferación de WEHI-3 de forma dosis dependiente, aunque el compuesto 5 fue el más efectivo (gráfica 3). En la línea celular K562, el compuesto 4 también presenta actividad biológica, sin embargo, el efecto se presenta con una dosis elevada, mientras que el compuesto 6 no tiene efecto, por lo que ambos compuestos no son una buena opción para inhibir la proliferación de K562. Finalmente, el compuesto 5 es el más efectivo para inhibir la proliferación de K562. Contrario a la hipótesis sobre la conformación, los compuestos 4 y 6 con anillos de piperacina o bicicloheptano no poseen mayor efecto biológico que el compuesto 3 aminoetilamida, lo cual sugiere la posibilidad de que la geometría de los anillos no sea la indicada para lograr la interacción requerida de nitrógeno-nitrógeno con su receptor, lo que se traduce en ausencia de actividad para inhibir la proliferación de la línea K562.



Conociendo que Imatinib (Ima) es el fármaco usado en la clínica para el tratamiento de la LMC (Kotaki et al., 2003) y con efecto sobre K562 con una  $IC_{50}$  de 0.5  $\mu$ M determinada en este trabajo (0.25  $\mu$ g/mL) (gráfica 5), lo empleamos como control de la inhibición de la proliferación para esta línea leucémica y para comparar el efecto de nuestros compuestos en células normales se usaron linfocitos de sangre periférica humana. A pesar de la selectividad del Imatinib para inhibir a Bcr-Abl sin afectar a otras quinasas, el tratamiento prolongado con este fármaco inhibe el crecimiento y la diferenciación de los progenitores hematopoyéticos normales (Appel et al., 2004), su efecto tóxico se confirmó ya que el imatinib inhibió la proliferación de linfocitos normales de sangre periférica de manera dosis dependiente. También se observó que el compuesto 3 no es selectivo, debido a que afectó la proliferación de células leucémicas y normales a una concentración similar. Por otro lado, el compuesto 5 requirió casi el doble de concentración usado en células leucémicas para producir el mismo efecto en células normales. La capacidad de generar un efecto diferencial entre normal y leucémico presente en 5 pero no 3 podría estar relacionado con las diferencias en las estructuras químicas de ambos compuestos, con la posibilidad de que actúen por receptores y mecanismos diferentes, haciendo a las normales menos sensibles al tratamiento con el compuesto 5. A pesar de la poca selectividad entre células normales y neoplásicas, es importante conocer el mecanismo por el cual estos compuestos reducen la proliferación, es decir, demostrar si los compuestos son capaces de inducir apoptosis en la línea celular K562 ya que esto brinda información necesaria para proponer estos compuestos como posibles fármacos quimioterapéuticos.

La constante proliferación celular es una de las características principales del cáncer (Sherr, 1996), por tal motivo los fármacos capaces de detener el ciclo celular son particularmente útiles para el tratamiento de las neoplasias. Una de las formas de evaluar la progresión a través del ciclo celular es conociendo la cantidad relativa de ADN nuclear de una población celular; Las células somáticas humanas tienen 23 pares de cromosomas, es decir, su número cromosómico es  $2n$  (fase G1); cuando una célula está lista para dividirse al final del ciclo el número cromosómico se ha duplicado y es  $4n$  (fase G2/M), entre estas dos etapas cuando las células tienen una cantidad de ADN entre  $2n$  y  $4n$  significa que están en fase de síntesis (fase S). Utilizando un colorante fluorescente que se une de manera específica al ADN se puede relacionar la intensidad de fluorescencia con la cantidad de ADN y así conocer cómo se distribuye una población celular entre las fases G1, S y G2/M (Endresen, Prytz & Aarbakke, 1995). En comparación con células sin tratamiento, los compuestos 3, 5 y el Imatinib incrementan el porcentaje de células en la región Sub-G0, la población en esta región no se pueden considerar células debido a que contienen una cantidad de material genético menor de  $2n$ , por lo que son indicativos de cuerpos apoptóticos, lo cual sugiere que el mecanismo de muerte es por inducción de apoptosis (Darzynkiewicz and Zhao, 2014). Está reportado que el Imatinib induce apoptosis en la línea celular K562 (Nimmanapali et al., 2003; Sabbo, Ruade & Ciuvalschi, 2012), por lo que se puede suponer que este incremento en la región sub-G0 son los cuerpos apoptóticos y que, de manera similar, estos datos indican que los compuestos 3 y 5 también inducen apoptosis. Los tratamientos inducen un incremento en la región S y por lo cual, es posible que los compuestos afecten el proceso de síntesis del ADN o las proteínas reguladoras de la replicación, en las células tratadas con el compuesto 3 no se observan

cambios en el porcentaje de células en la región G2/M, por lo que se puede proponer que las células no son completamente bloqueadas, por otro lado, el compuesto 5 reduce la región G2/M lo que sugiere que las células afectadas desde la fase de síntesis no llegan a G2/M e inician el proceso apoptótico, este mecanismo es observado en células expuestas a radiación (Orren et al., 1997) o diversos compuestos que afectan a las ciclinas o las Cdk inhibiendo el ciclo y produciendo apoptosis (Ichimaru et al., 2010; Chang et al., 2016)

Una de las evidencias de la apoptosis es la formación de cuerpos apoptóticos (Fan et al., 2016) y el análisis citomorfológico en microscopio de las células K562 expuestas a los compuestos 3, 5 e Imatinib incrementan el número de células con morfología apoptótica; en las tres condiciones experimentales, el porcentaje de células apoptóticas se incrementó (tabla 7), mientras que la viabilidad y el número celular total se reduce de manera tiempo dependiente. No se presentan datos después de las 48 horas de estímulo debido a que superando este tiempo de exposición a los compuestos 3 y 5 las células neoplásicas han sido eliminadas completamente, por el contrario, los cultivos de células tratados con Imatinib se pueden observar células viables después de 72 horas de tratamiento. En un mismo lapso de tiempo los compuestos 3 y 5 eliminan a todas las células leucémicas, mientras que el Imatinib no, poniendo de manifiesto una mayor citotoxicidad por parte de nuestros compuestos.

Actualmente se conocen proteínas y enzimas que a nivel molecular inician y promueven la apoptosis, la morfología característica de una célula apoptótica es un evento tardío dentro del proceso, por otro lado, uno de los primeros eventos de la apoptosis es la translocación de fosfatidilserina de la cara interna a la externa de la membrana celular. La presencia de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana se puede detectar por citometría de flujo usando Annexina-V para unirse a este fosfolípido, técnica descrita por Koopman y colaboradores en 1994 y actualmente sigue siendo usada (Fan et al., 2016). Después de la translocación de la fosfatidilserina se compromete la integridad de la membrana celular, permitiendo el paso al citoplasma de compuestos normalmente impermeables, este evento se puede evidenciar usando 7-AAD (Schmid et al., 1994), un colorante fluorescente que se une al ADN y que es impermeable a la membrana (Leucouber et al., 1997). La técnica para detectar apoptosis con Annexina-V/7AAD es particularmente útil debido a que permite comparar apoptosis con necrosis; las células simple positivas a Annexina-V son apoptosis temprana, las doble positivo Annexina-V/7AAD son apoptosis tardía y las células simples positivas a 7-AAD son células necróticas. Las células que están en proceso de apoptosis, primero se observan como simples positivos para Annexina-V y posteriormente como doble positivo Annexina-V/7-AAD (Darzynkiewicz, Bedner & Traganos, 2001). El tratamiento con los compuestos 3 y 5, incrementan de forma significativa el número de células positivas a Annexina-V-PE comparados con células sin tratamiento, también se incrementan las células dobles positivo Annexina-V/7-AAD similar el efecto producido por el Imatinib, el cual está reportado como un fármaco capaz de inducir apoptosis en las células leucémicas K562 (Druker et al., 1996; Oetzel et al., 2000; Jakubowska, Wasowska-Lukawska & Czyz, 2008) y en el análisis por citometría de flujo confirma un aumento en el número de células simple positivo apoptosis temprana y doble positivo apoptosis tardía sin registrar un aumento

significativo para las células necróticas. La ausencia de muerte celular por necrosis es un factor muy importante para un fármaco anticancerígeno (Amaravadi & Thompson, 2007), debido a que la necrosis produce inflamación (Willingham, 1999) se pueden producir severos efectos adversos y el deterioro en la calidad de vida de un paciente. Los compuestos 3 y 5 son similares al Imatinib al incrementar las células positivas para apoptosis, sin incrementar de manera significativa las positivas a necrosis, datos que nuevamente confirman la similitud con el Imatinib como fármaco empleado en la clínica.

La participación de las caspasas en la apoptosis fue descrita en la década de 1990, estas proteasas promueven la actividad de proteínas efectoras que realizan los cambios morfológicos y bioquímicos de la apoptosis: fragmentación de ADN, condensación de la cromatina, formación de burbujas en la membrana, la contracción celular y la formación de los cuerpos apoptóticos (Thornberry & Lazadnik, 1998) y la importancia de las caspasas en la inflamación y la apoptosis fue demostrada utilizando tetrapéptidos inhibidores de caspasas (García-Calvo et al., 1998). La inducción de la apoptosis inicia con la formación de complejos multiprotéicos de alto peso molecular, a lo que le sigue la activación de las caspasas efectoras, sin embargo, existen mecanismos moleculares como la fosforilación que pueden inhibir o bloquear la activación de las caspasas (Zamaraev et al., 2017). Esto quiere decir que en el desarrollo de nuevos fármacos modelo para el tratamiento de neoplasias, aunque un compuesto sea capaz de iniciar la apoptosis no necesariamente puede llevar a las células a apoptosis, motivo por el cual la degradación del ADN es un punto sin retorno de la apoptosis, puesto que la fragmentación supera la capacidad de cualquier enzima o mecanismo para reparar el daño, efecto que se puede observar con la pérdida de integridad y la fragmentación del núcleo inducida por 3, 5 e Imatinib (Figura 12).

Numerosos estudios han demostrado que el efecto del Imatinib es debido a su actividad específica para bloquear la oncoproteína Bcr-Abl, lo que bloquea la señal de supervivencia constitutivamente activa en la LMC. También se ha demostrado la capacidad del imatinib para inhibir la telomerasa (Mor-Tzuntz et al., 2010), enzima que regula a los telómeros y permite una división celular indefinida. Como se ha mencionado anteriormente, el mecanismo de la capsaicina o la anadamida por el cual inhiben la proliferación de células cancerígenas no es necesariamente el mismo que el de sus derivados. Hasta este punto, se ha demostrado que los análogos 3 y 5 inducen muerte por apoptosis en las células de la línea de leucemia mieloide crónica humana K562, denotando su potencial como antileucémicos. Debido a que en la clínica es común utilizar dos o más fármacos con diferentes mecanismos o moléculas diana, se abre la posibilidad de usar nuestros compuestos en combinación con el Imatinib, lo cual puede reducir la dosis de ambos fármacos y en consecuencia la posibilidad de alcanzar una dosis tóxica y los efectos secundarios adversos, un estudio deseable de realizarse en un futuro.

## 8. CONCLUSIONES

Los seis compuestos evaluados inhibieron la proliferación de la línea celular leucémica de ratón WEHI-3, pero solo la (*NN*-dimetiletilamino)-12-fenilacetilrisileiamida (**3**) y el Fenilacetato de (1*R*,3*Z*)-1-hexil-12-[(1*S*,4*S*)-2-hidroxi-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptan]-12-oxo-dodecenilo (**5**) demostraron potencial antileucémico al inhibir la proliferación y reducir la viabilidad de la línea leucémica humana K562.

El análogo diazabicyclo (**5**) del 12-FAR y fue más efectivo que el 12-FAR para inhibir la proliferación de la línea K562.

La (*NN*-dimetiletilamino)-12-fenilacetilricinoleilamida (**3**) y el análogo diazabicyclo (**5**) del 12-FAR, no produjeron un efecto citostático, sin embargo, indujeron la translocación de fosfatidilserina y la incorporación del 7-AAD, las cuales son evidencias de inducción de muerte tipo apoptosis.

El análogo diazabicyclo (**5**) del 12-FAR presentó selectividad entre células normales y leucémicas, ya que se requiere el doble de la dosis usada en células leucémicas para afectar la proliferación de linfocitos de sangre periférica, este efecto no se observó en el compuesto (**3**), debido a que se afecta la proliferación de ambos tipos celulares con la misma dosis.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Alberts, B., Johnson, A., Lewi, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2009) *Biología molecular de la célula*. Artmed Editora.
- Amaravadi, R. K., & Thompson, C. B. (2007). The roles of therapy-induced autophagy and necrosis in cancer treatment. *Clinical Cancer Research*, 13(24), 7271-7279.
- Arango, P. M. C., Linares, F. L., & Diaz, R. T. M. (1997). La apoptosis: sus características y su papel en la transformación maligna de la célula. *Revista Cubana de Oncología*, 13. 126-134.
- Appel, S., Boehmler, A. M., Grünebach, F., Müller, M. R., Rupf, A., Weck, M. M., Hartman, U., Reichardt, V. L., Kanz, L., Brümmendorf, T. H. & Brossart, P. (2004). Imatinib mesylate affects the development and function of dendritic cells generated from CD34+ peripheral blood progenitor cells. *Blood*, 103(2), 538-544.
- Appendino, G., De Petrocellis, L., Trevisan, M., Minassi, A., Daddario, N., Moriello, A. S., Gazzieri, D., Ligresti, A., Campi, B., Fontana, G., Pinna, C. & Di Marzo, V. (2005). Development of the first ultra-potent "capsaicinoid" agonist at transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) channels and its therapeutic potential. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 312(2), 561-570.
- Assef, Y., Rubio, F., Coló, G., Del Mónaco, S., Costas, M. A. & Kotsias, B. A. (2009). Imatinib resistance in multidrug-resistant K562 human leukemic cells. *Leukemia Research*, 33 (5), 710-716.
- Ayala, M., Ávila, E., Domínguez, J., Aquino, X. & Vela, J. (2016). Diagnosis and Treatment of Chronic Myeloid Leukemia in the Imatinib Mesylate Era: Report of Experience at "La Raza" Medical Center in México. *Clinical Lymphoma, Mieloma & Leukemia*, 16(2), 57-62.
- Baamonde, A., Lastra, A., Juarez, L., Hidalgo, A., & Menéndez, L. (2005). TRPV1 desensitisation and endogenous vanilloid involvement in the enhanced analgesia induced by capsaicin in inflamed tissues. *Brain research bulletin*, 67(6), 476-481.
- Benigno, R. M., Gargallo, P., Barreyro, P., Bitton, R. & Larripa, I. (2007). Leucemia mieloide crónica mecanismos genéticos de resistencia al imatinib. *Medicina*, 67. 71-74.

- Bianco P. (2011). Bone and the hematopoietic niche: a tale of two stem cells. *Blood*, 17(20), 5281-5288.
- Biswas, K. K., Sarker, K. P., Abeyama, K., Kawahara, K. I., Iino, S., Otsubo, Y., Saigo, K., Izumi, H., Hashiguchi, T., Yamakuchi, M., Yamaji, K., Endo, R., Suzuki, K., Imaizumi, H. & Yamaji, K. (2003). Membrane cholesterol but not putative receptors mediates anandamide-induced hepatocyte apoptosis. *Hepatology*, 38(5), 1167-1177.
- Brown, I., Cascio, M. G., Rotondo, D., Pertwee, R. G., Heys S. D. & Wahle, K. W. J. (2013). Cannabinoids and omega-3/6 endocannabinoids as cell death and anticancer modulators. *Progress in Lipid Research*, 52(1), 80-109.
- Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D. & Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389(6653), 816-824.
- Cervantes, F. (2008). Leucemia mieloide crónica. *Medicina clínica*, 131 (17). 658-659.
- Cervera Ceballos, E. E., Espinosa Zamora, J. R., Cortez Franco, J. E., & Labardini Méndez, J. R. (2008). Leucemia granulocítica crónica. En E. E. Cervera Ceballos, J. R. Espinosa Zamora, J. E. Cortez Franco, & J. R. Labardini Méndez. Hemato Oncología. Ciudad de México, México: Clinicas Oncológicas de Iberoamerica.
- Chan, D. D., Van Dyle, W. S., BAhls, M., Connell, S. D., Critser, P., Kelleher, J. E., Kramer, M. A., Pearce, S. M., Sharma, S. & Neu, C. P. (2011). Mechanostasis in apoptosis and medicine. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 106(3). 517-524.
- Chang, H. T., Chou, C. T., Chen, I. S., Yu, C. C., Lu, T., Hsu, S. S., Shieh, P., Jan, C. R., & Liang, W. Z. (2016). Mechanisms underlying effect of the mycotoxin cytochalasin B on induction of cytotoxicity, modulation of the cell cycle, Ca<sup>2+</sup> homeostasis and ROS production in human breast cells. *Toxicology*, 370, 1-19.
- Cheng, H. Y., & Ko, F. H. (2014). Studying the enhancement of programmed cell death by combined AG1024 and paclitaxel in a model of chronic myelogenous leukemia. *Life sciences*, 102(2), 118-126.

- Chow, J., Norng, M., Zhang, J., & Chai, J. (2007). TRPV6 mediates capsaicin-induced apoptosis in gastric cancer cells—Mechanisms behind a possible new “hot” cancer treatment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1773(4), 565-576.
- Console-Bram, L., Marcu, J. & Abood, M. E. (2012). Cannabinoid receptor: nomenclature and pharmacological principles. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & biological Psychiatry*, 38(1), 4-15.
- Cooper, G. M. H., Robert, E., Cooper, G. M. & Hausman, R. E. (2008). *La célula*. (no. Sirsi) i9788471015884.
- Cortez, D., Kadlec, L., & Pendergast, A. M. (1995). Structural and signaling requirements for BCR-ABL-mediated transformation and inhibition of apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, 15(10), 5531-5541.
- Costa, M. A., Fonseca, B. M., Teixeira, N. A. & Correia-da-Silva, G. (2015). The endocannabinoid anandamide induced apoptosis in cytotrophoblast cells: Involvement of mitochondrial and death receptor pathways. *Placenta*, 36(1), 69-76.
- Darzynkiewicz, Z., Bedner, E., & Traganos, F. (2001). Difficulties and pitfalls in analysis of apoptosis. *Methods in cell biology*, 63, 527-546.
- Darzynkiewicz, Z. & Zhao, H. (2014). Cell Cycle Analysis by Flow Cytometer. *Els*
- De la Cruz-Rosas, A., Olarte-Carrillo, I., Mendoza-Salas, I., García-Laguna, A. I., Ceron-Maldonado, R., Miranda-Peralta, E. L., Rozen-Fuller, E., Collazo-Jaloma, J., Kassack-Ipiña, J. J., Ramos-Peñafiel, C. O., Palmeros- Morgado, G., & Martinez-Tovar, A. (2015 mayo, Acapulco Guerrero). Niveles de la proteína MDR-1 (ABD-B1) en diferentes tipos de líneas celulares hematológicas. Poster presentado en el 56 Congreso Nacional de la Agrupación Mexicana para el Estudio de la Hematología A. C. Ciudad de México, México.
- Deininger, M. W., Goldman, J. M., & Melo, J. V. (2000). The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*, 96 (10), 3343-3356.
- Derocq, J. M., Bouaboula, M., Marchand, J., Rinaldi-Carmona, M., Ségui, P. & Casellas, P. (1998). The endogenous cannabinoid anandamide is a lipid Messenger activating cell growth via a cannabinoid receptor-independent pathway in hematopoietic cell lines. *FEBS letters*, 425(3), 419-425.

- Duker, B. J., Tamura, S., Buchdunger, E., Ohno, S., Segal, G. M., Fanning, S., Zimmermann, J. & Lydon, N. B. (1996). Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nature Medicine*, 2(5), 561-566.
- Endresen, P. C., Prytz, P. S., & Aarbakke, J. (1995). A new flow cytometric method for discrimination of apoptotic cells and detection of their cell cycle specificity through staining of F-actin and DNA. *Cytometry Part A*, 20(2), 162-171.
- Erin, N., Duymus, Ö., Öztürk, S. & Demir, N. (2012). Activation of vagus nerve by semapimod alters substance P and decreases breast cancer metastasis. *Regulatori Peptides*, 179(1-3), 101-108.
- Fan, Y., Lu, H., An, L., Wang, C., Zhou, Z., Feng, F., Ma, H., Xu, Y. & Zhao, Q. (2016). Effect of active fraction of *Eriocaulon sieboldianum* on human leukemia K562 cells via proliferation, inhibition, cell cycle arrest and apoptosis induction. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 43. 13-20.
- Fink, S. L. & Cookson, B. T. (2005). Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and immunity*, 73(4), 1907-1916.
- Flygare, J. & Sander, B. (2008). The endocannabinoid system in cancer – Potential therapeutic target? *Seminars in Cancer Biology*, 18 (3). 176-189.
- Garcia-Calvo, M., Peterson E. P., Leiting, B., Ruel, R., Nicholson, D. W. & Thornberry, N. A. (1998). Inhibition of Human Caspases by Peptide-based and Macromolecular inhibitors. *The Journal of biological chemistry*, 27 (49). 32608-32613.
- Gómez Alvis, A., Melucci, J. C., Quiroga, P., & Mandrile, E. L. (1995). Capsaicina. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 14(1). 63-70.
- Hail, N., & Lotan, R. (2002). Examining the role of mitochondrial respiration in vanilloid-induced apoptosis. *Journal of the National Cancer Institute*, 94(17), 1281-1292.
- Hoggatt, J., & Pelus, L. M. (2013). Hematopoiesis.
- Hsu, S. S., Huang, C. J., Cheng, H. H., Chou, C. T., Lee, H. Y., Wang, J. L., Chen, I. S., Liu, S. I., Lu, Y. C., Chang, H. T., Huang, J. K., Chen, J. S. & Jan, C. R. (2007). Anandamide-induced Ca<sup>2+</sup> elevation leading to p38 MAPK phosphorylation and subsequent cell death via apoptosis in human osteosarcoma cells. *Toxicology*, 231(1). 21-29.



- Ichimaru, T., Lau, J., Jackson, A. L., Modiano, J. F., & Weiss, R. H. (2010). Pharmacological inhibition of cyclin dependent kinases causes p53 dependent apoptosis in renal cell carcinoma. *The Journal of urology*, 184(5), 2143-2149.
- Immke, D. C., & Gavva, N. R. (2006). The TRPV1 receptor and nociception. In *Seminars in cell & developmental biology*, 17(5). 582-591. Academic Press.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía [INEGI]. (2014). Estadísticas a propósito de... Día mundial del cáncer (4 de febrero). 31 de enero de 2014. México, Pachuca, HGO. Disponible en: <http://www.beta.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2014/cancer13.pdf>
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía [INEGI]. (2015). Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. 4 de febrero de 2015. México, Aguascalientes, AGS. disponible en: [http://www.equidad.org.mx/images/stories/documentos/Cancer\\_2015.pdf](http://www.equidad.org.mx/images/stories/documentos/Cancer_2015.pdf)
- Ito, K., Nakazato, T., Yamato, K., Miyakawa, Y., Yamada, T., Hozumi, N., Sagawa, K., Ikeda, Y. & Kizaki, M. (2004). Induction of apoptosis in leukemic cells by homovanillic acid derivative, capsaicin, through oxidative stress. *Cancer research*, 64(3), 1071-1078.
- Jaffe, E. S. (Ed.). (2001). *Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. IARC.
- Jakubowska, J., Wasowska-Lukawska, M. & Czyz, M. (2008). STI571 and morpholine derivative of doxorubicin collaborate in inhibition of K562 cell proliferation by inducing differentiation and mitochondrial pathway of apoptosis. *European Journal of Pharmacology*, 596(1-3). 41-49.
- Javid, F. A., Phillips, R. M., Afshinjavid, S., Verde, R. & Ligresti, A. (2016). Cannabinoid pharmacology in cancer research: A new hope for cancer patients? *European Journal of Pharmacology*, 775(15). 1-14.
- Koopman, G., Reutelingsperger, C. P. M., Kuijten, G. A. M., Keehnen, R. M. J., Pals, S. T. & Van Orens, M. H. J. (1994). Annexin V for Flow Cytometric Detection of Phosphatidylserine Expression on B Cells Undergoing Apoptosis. *Blood*, 94(5). 1414-1420.
- Kotaki, M., Motoji, T., Takanashi, M., Wang, Y. H., & Mizoguchi, H. (2003). Anti-proliferative effect of the abl tyrosine kinase inhibitor STI571 on the P-glycoprotein positive K562/ADM cell line. *Cancer letters*, 199(1), 61-68.

- Laezza, C., D'Alessandro, A., Paladino, S., Malfitano, A. M., Proto, M. C., Gazzero, P., Pisanti, S., Santoro, A., Ciaglia, E., Bifulco, M. & Endocannabinoid Research Group. (2012). Anandamide inhibits the Wnt/ $\beta$ -catenin signalling pathway in human breast cancer MDA MB 231 cells. *European Journal of Cancer*, 48(16), 3112-3122.
- Lawal, R. A. & Calvin, L. M. (2011). The niche is a Target for Hematopoietic Manipulation and Regeneration. *Tissue Engineering*, 17(6). 415-422.
- Lecoeur, H., Ledru, E., Prévost, M. C. & Gougeon, M. L. (1997). Strategies for phenotyping apoptotic peripheral human lymphocytes comparing ISNT, annexin-V and 7-AAD cytofluorometric staining methods. *Journal of Immunological Methods*, 209. 111-123.
- Liao, M., Cao, E., Julius, D., & Cheng, Y. (2013). Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature*, 504(7478), 107-112.
- Luviano, A., Aguiñiga-Sánchez, I., Demare, P., Tiburcio, R., Ledesma-Martínez, E., Santiago-Osorio, E. & Regla, I. (2014) Antineoplastic activity of rinvanil al phenylacetyl-rinvanil in leukaemia cell lines. *Oncology Letters*, 7(5). 1651-1656.
- Mariani, S. A. & Calabretta, B. (2014). Leukemia stem cells: Old and new perspectives. *Molecular Aspects of Medicine*, 39. 102-109.
- Moon, D. O., Kang, C. K., Kang, S. H., Choi, Y. H., Hyun, J. W., Chang, W. Y., Kang, H. K., Koh, Y. S., Maeng, Y. H., Kim, Y. R. & Kim, G. Y. (2012) Capsaicin sensitizes TRAIL-induced apoptosis through Sp1-mediated DR5 up-regulation: Involvement of Ca<sup>2+</sup> influx. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 259(1). 87-95.
- Migliaccio, A. R., & Stamatoyannopoulos, T. (2014). Cord blood hematopoiesis. In *Elsevier Inc.*
- Mor-Tzuntz, R., Uziel, O., Shpilberg, O., Lahav, J., Raanani, P., Bakhanashvili, M., Rabizabeh, E., Zimra, Y., Lahav, M. & Granot, G. (2010). Effect of imatinib on the signal transduction cascade regulating telomerase activity (BCR-ABL-positive) cells sensitive and resistant to imatinib. *Experimental Hematology*, 38(1). 27-37.
- Morré, D. J., Chueh, P. & Morré, D. M. (1995). Capsaicin inhibits preferentially the NADH oxidase and growth of transformed cells in culture. *Cell Biology* 92. 1831-1835.

- Morré, D. J., Sun, E., Geilen, C., Wu, L.-Y., de Cabo, R., Krasagakis, K., Orfanos, C. E. & Morré, D. M. (1996). Capsaicin Inhibits Plasma Membrane NADH Oxidase and Growth of Human and Mouse Melanoma lines. *European Journal of Cancer*, 32(11). 1995-2003.
- Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A. & Rodwell, V. W. (2001). *Bioquímica de Harper*. El manual moderno.
- Nimmanapalli, R., Fuino, L., Stobaugh, C., Richon, V. & Bhalla, K. (2003). Cotreatment with the histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) enhances imatinib-induced apoptosis of Bcr-Abl-positive human acute leukaemia cells. *Blood*, 101. 3236-3239.
- Oetzel, C., Jonuleit, T., Götz, A., Van Der Kuip, H., Hallek, M. & Aulitzky, W. E. (2000). The Tyrosine Kinase Inhibitor CGP 57148 (ST1 571) Induces Apoptosis in BCR-ABL-positive Cells by Down-Regulating BCL-X. *Clinical Cancer Research*, 6. 1958-1968.
- Orren, D. K., Petersen, L. N., & Bohr, V. A. (1997). Persistent DNA damage inhibits S-phase and G2 progression, and results in apoptosis. *Molecular Biology of the Cell*, 8(6), 1129-1142.
- Pisanti, S. & Bifulco, M. (2009). Endocannabinoid system modulation in cancer biology and therapy. *Pharmacological Research*, 60 (2). 107-116.
- Radford, I. R. (2002). Imatinib. Novartis. *Current opinion in investigational drugs (London, England: 2000)*, 3(3), 492-499.
- Riether, C., Schürch, C. M. & Ochsenbein, A. F. (2015). Regulation of hematopoietic and leukemic cells by the immune system. *Cell Death and Differentiation*, 22. 187-198.
- Russell, L. C., & Burchiel, K. J. (1984). Neurophysiological effects of capsaicin. *Brain Research Reviews*, 8(2), 165-176.
- Sabbo Bernardo, P., Ruade de Souza Reis, F. & Ciuvalschi Maia, R. (2012). Imatinib increases apoptosis index through modulation of survivin subcellular localization in the blast phase of CML cells. *Leukemia Research*, 36(12). 1510-1516.
- Shah, N. P., Nicol, J. M., Nagar, B., Gorre, M. E., Paquette, R. L., Kuriyan, J. & Sawyers, C. L. (2002). Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STU571) in chronic phase and blast crisis myeloid leukemia. *Cancer cell*, 2. 127-125.

- Schmid, I., Uittenbogaart, C. H., Keld, B., & Giorgi, J. V. (1994). A rapid method for measuring apoptosis and dual-color immunofluorescence by single laser Flow cytometry. *Journal of immunological methods*, 170(2), 145-157.
- Sherr, C. J. (1996). Cancer cell cycles. *Science*, 274(5293), 1672.
- Sun, Z., Han, J., Zao, W., Zhang, Y., Wang, S., Ye, L., Lui, T. & Zheng, L. (2014). TRPV1 Activation Exacerbates Hypoxia/Reoxygenation- Induced Apoptosis in H9C2 Cells via Calcium Overload and Mitochondrial Dysfunction. *International Journal of Molecular Sciences*, 15 (10). 18362-18380.
- Szallasi, A., & Blumberg, P. M. (1999). Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacological reviews*, 51(2), 159-212.
- Thornberry, N. & Lazabnik, Y. (1998). Caspases: Enemies Within. *SCIENCE*, 281(5381), 1312-1316.
- Vardiman, J. W., Harris, N. L., & Brunning, R. D. (2002). The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*, 100(7), 2292-2302. doi: 10.1182/blood-2002-04-1199.
- Voets, T., Droogmans, G., Wissenbach, U., Janssens, A., Flokezi, V. & Nilius, B. (2004). The principle of temperatura-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature*, 430. 748-754.
- Wang, Z.-B., Liu, Y.-Q. & Cui, Y.-F. (2005). Pathways to caspase activation. *Cell Biology Interenational*, 29. 489-496.
- Wei, Y., To, K. K. W. & Au-Yeung, S. C. F. (2015). Synergistic cytotoxicity from combination of imatinib and platinum-based anticancer drugs specifically in Bcr-Abl positive leukemia cells. *Journal of Pharmacological Sciences*, 129(4). 210-215.
- Willingham, M.C. (1999) Cytochemical Methods for the Detection of Apoptosis. *The Journal of Histochemistry & Citichemistry*, 47(9). 1101-1109.
- Yang, K. & Fu, L. (2015) Mechanisms of resistance to BCR-ABL TKIs and the therapeutic strategies: A review. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 93(3). 277-292.

Zamaraev, A. V., Kopeina, G. S., Prokhrova E. A., Zhivotovsky, B. & Lavrik, I. N. (2017). Post-translational Modification of Caspases: The Other Side of Apoptosis Regulation. *Trends in Cell Biology*.