



Evaluación de la producción de ROS y glutatión en células madre hematopoyéticas y células leucémicas y su relación con la respuesta a la quimioterapia

Nery Vanessa Celeita Romero

Juanita Fernanda Nuñez Alvarez

Trabajo de grado

Carrera de Bacteriología

Pontificia Universidad Javeriana

Facultad de Ciencias

Bogotá D.C. Colombia

2020



Evaluación de la producción de ROS y glutatión en células madre hematopoyéticas y células leucémicas y su relación con la respuesta a la quimioterapia

Nery Vanessa Celeita Romero

Juanita Fernanda Nuñez Alvarez

Trabajo de grado

Susana Fiorentino. MSc. PhD

Directora

Claudia P. Urueña Pinzón. PhD

Co-directora

Bogotá D.C. Colombia

2020

NOTA DE ADVERTENCIA

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la Doctora Susana Fiorentino, a la Doctora Claudia Urueña por su orientación y apoyo en la realización del trabajo de grado y a todos los integrantes del Grupo de Inmunología y biología celular de la Pontificia Universidad Javeriana, por su colaboración en las distintas actividades llevadas a cabo.

Al programa Colombia Científica - Ministerio de Ciencia y Tecnología y la Pontificia Universidad Javeriana, a través de la Convocatoria Ecosistema Científico "Generación de alternativas terapéuticas en cáncer a partir de plantas a través de procesos de investigación y desarrollo traslacional, articulados en sistemas de valor sostenibles ambiental y económicamente" financiado por el Banco Mundial (Contrato Numero FP44842-221-2018).

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	10
1. INTRODUCCIÓN	12
2. PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	14
3. MARCO TEÓRICO	16
3.1. Células madre hematopoyéticas (CMH)	16
3.2. Leucemias	17
3.3. Especies reactivas de oxígeno (ROS) en CMH y células tumorales	18
3.4. Mecanismo de regulación homeostático entre ROS y glutatión.....	19
3.4.1. Enzimas involucradas en la ruta glutatión	21
4. OBJETIVOS	23
4.1. Objetivo general	23
4.2. Objetivos específicos	23
5. METODOLOGÍA	24
5.1. Búsqueda de la información en bases de datos	24
5.2. Cultivo y mantenimiento de las líneas celulares leucémicas	25
5.3. Inmunofenotipificación de las líneas celulares K562 y U937	25
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
6.1. Producción de ROS en CMH y células tumorales	28
6.2. Producción de glutatión en CMH y células tumorales	33
6.3. Producción de ROS y glutatión y su relación con la resistencia a quimioterapéuticos	36
6.4. Caracterización inmunofenotípica de las líneas K562 y U937.....	41

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	46
8. REFERENCIAS	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Inmunofenotipificación de la línea K562.

Figura 2. Inmunofenotipificación de la línea U937

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. El gen de Fusión BCR/ABL está relacionado con producción de ROS.

Gráfica 2. La mutación FLT3/ITD está asociada con una mayor producción de ROS.

Gráfica 3. Enzimas NOX contribuyen a la producción de superóxido.

Gráfica 4. Expresión relativa de ARNm de los principales genes antioxidantes en muestras de células CD34 + normales humanas y células CD34+ de LMA.

Gráfica 5. Expresión de moléculas antioxidantes relacionadas con el aumento de Nrf2.

Gráfica 6. Disminución de las moléculas antioxidantes causado por la eliminación de Nrf2 mediante shARN inducible a doxociclina.

Gráfica 7. Expresión de GPx3 en muestras de médula ósea de pacientes con LMA clasificados en grupos de riesgo definidos citogenética y molecularmente como riesgo favorable, intermedio y adverso.

Gráfica 8. El tratamiento con RSL3, un inhibidor de GPx4, indujo la muerte celular en ambas líneas celulares de LLA.

LISTA DE IMAGENES

Imagen 1. Vía de señalización Nrf2-Keap1. (A) y (B) En condiciones basales; (C) en condición de estrés; (D) cambios conformacionales de Keap1; (E) modelo de disociación Keap1-Cul3; (F) Translocación de Nrf2 al núcleo.

ABREVIATURAS

CMH: Células Madre Hematopoyéticas

CMH – LP: Células Madre Hematopoyéticas de largo plazo

CMH – CP: Células Madre Hematopoyéticas de corto plazo

ETC: Cadena de transporte de electrones

ROS: Especies Reactivas de Oxígeno

OXPPOS: Fosforilación oxidativa

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

LOOH: Hidroperóxido lípido

OH•: Radical hidroxilo

O₂•: Superóxido

DCFDA: diacetato 2',7' - diclorodihidrofouresceína

Nrf2: Factor 2 relacionado con el NF-E2

ARE: Elemento de Respuesta Antioxidante

GSH: Glutati3n reducido

GSSG: Glutati3n oxidado o glutati3n disulfido

GST: Glutati3n S Transferasa

GPx: Glutati3n Peroxidasa

GR: Glutati3n Reductasa

GCLC: glutamato-cisteína ligasa subunidad catalítica

GCLM: glutamato-cisteína ligasa subunidad moduladora

GSS: Glutati3n Sintasa

MDR: Proteínas resistentes a drogas

MRP: Proteínas de expulsión de fármacos

JNK: cinasa N – terminal c - jun

TRAF2: factor 2 asociado al factor de necrosis tumoral

ASK1: cinasa reguladora de la seña1 de apoptosis 1

MAPK: Proteína cinasa activada por mitógeno

Fas-L: Fas ligando

HIF-1 α : Factor inducible de hipoxia 1 alfa

FOXO: forkhead box O

P2Et: Extracto de la planta *Caesalpinia spinosa*

Anamú-SC: Anamú – Super Crítico, extracto de la planta *Petiveria alliacea*

IC50: concentración inhibitoria 50

MO: Médula Ósea

LA: Leucemia Aguda

LMA: Leucemia Mieloide Aguda

LMC: Leucemia Mieloide Crónica

LLA: Leucemia Linfoide Aguda

LLC: Leucemia Linfoide Crónica

DOXO: Doxorrubicina

Ara-C: Citarabina

Dnr: Daunorubicina

ATO: Trióxido arsénico

LU: Luz ultravioleta

Ig: inmunoglobulinas

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DNA mt: Ácido desoxirribonucleico mitocondrial

ADP: Adenosín difosfato

ATP: Adenosín trifosfato

Da: Daltons

RESUMEN

La leucemia es una neoplasia en donde las células progenitoras hematopoyéticas CD34+ proliferan de forma incontrolada y debido a distintas mutaciones genéticas y epigenéticas estas células presentan un aumento en la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS), derivadas de procesos enzimáticos y no enzimáticos. Estos cambios van a participar en la promoción de la leucemogénesis y la progresión del tumor, lo que difiere claramente con las células progenitoras hematopoyéticas normales, pues, aunque se presenten niveles de ROS, estos no son tan elevados como los encontrados en las células tumorales.

El incremento de ROS puede ser nocivo para la célula, ya que causa estrés oxidativo y apoptosis, sin embargo, para evitar esto existen sistemas antioxidantes los cuales, con diferentes reacciones, controlan los niveles de ROS. Uno de los antioxidantes principales en las células es el glutatión, dentro de sus múltiples funciones se destaca el mantenimiento redox intracelular por medio de reacciones catalizadas por enzimas como la glutatión peroxidasa, la glutatión reductasa y la glutatión S transferasa, las cuales, se han visto incrementadas en diferentes tipos de cáncer, como lo es la leucemia. Las células leucémicas presentan una alta actividad de Glutatión que contrarresta los ROS que poseen, en comparación con las células progenitoras hematopoyéticas normales, que, aunque si llegan a tener niveles de Glutatión, no son tan elevados.

Se ha encontrado en la literatura la participación de los sistemas antioxidantes, especialmente, el sistema Glutatión como medio de resistencia a la quimioterapia. En varios estudios se encontró que diferentes polimorfismos de la enzima Glutatión S Transferasa (GST), específicamente GST μ , GST θ y GST π se encuentran sobreexpresados en células leucémicas quimioresistentes a varios medicamentos, además se encontró que otra enzima de la vía de Glutatión permanece elevada en células de pacientes pronóstico desfavorable, esta enzima es

la Glutación Peroxidasa (GPx), específicamente el polimorfismo GPx3. No se encontraron referencias que indiquen a la enzima Glutación Reductasa (GR) como posible fuente de quimioresistencia o mal pronóstico en pacientes con leucemia.

En conclusión, la eficiencia de la quimioterapia se ha visto afectada por múltiples mecanismos entre los que están los sistemas antioxidantes, ya que, las células leucémicas presentan altos niveles de ROS basales, pero también altos niveles de enzimas antioxidantes, adquiriendo propiedades de las células madre hematopoyéticas, las cuales utilizan estos ROS para procesos como autorenovación, senescencia y proliferación. Por tal motivo es indispensable la búsqueda de estrategias alternativas, que permitan combatir las propiedades biológicas o los mecanismos de resistencia desarrollados por las células tumorales.

1. INTRODUCCIÓN

La leucemia es un tipo de neoplasia que se caracteriza por la proliferación clonal de células madre hematopoyéticas o de células progenitoras de un linaje específico, ya sean mieloides o linfoides. Estas células pueden infiltrar la médula ósea y como consecuencia llevar a alteraciones en la hematopoyesis, provocando distintas manifestaciones clínicas en el paciente, y la disminución de las células sanguíneas. Según estadísticas de Globocan, para el año 2018 se reportaron 101.893 nuevos casos de cáncer en Colombia, siendo las leucemias el noveno cáncer más frecuente, con una tasa de incidencia y mortalidad de 3.126 y 2.192 casos, respectivamente (1).

El tratamiento empleado para esta patología difiere según el estadio o el compromiso del paciente e incluye el trasplante de médula ósea y la aplicación de radioterapia o quimioterapia utilizando fármacos con diferentes blancos moleculares (2). Sin embargo, la tasa de remisión completa de los pacientes con leucemia sigue siendo desfavorable y se cree que uno de los posibles mecanismos asociados con la poca respuesta al tratamiento está relacionado con los sistemas antioxidantes (3) (4).

Las células tumorales por diversas alteraciones genéticas y epigenéticas, sumado a las altas tasas de proliferación, presentan niveles elevados de especies reactivas de oxígeno (ROS)(5), los cuales se han asociado con la progresión de la enfermedad. Sin embargo, para evitar que estos altos niveles de ROS induzcan muerte celular, las células tienen varios sistemas de detoxificación, entre ellos el glutatión.

El sistema de glutatión mantiene la homeostasis redox intracelular por medio de reacciones catalizadas por enzimas como la glutatión peroxidasa (GPx), encargada de la oxidación de glutatión reducido (GSH) a glutatión disulfuro (GSSG) para convertir el peróxido de hidrógeno en agua. También está la glutatión S transferasa (GST), la cual cataliza la

conjugación de GSH con xenobióticos electrofílicos; y finalmente, la enzima Glutación Reductasa (GR), importante en el reciclaje enzimático del glutati6n (6). De esta manera, el GSH y las enzimas de esta ruta, pueden mediar el estr6s oxidativo provocado por la quimioterapia y conferir a la c6lula tumoral una probable capacidad de quimioresistencia.

Sin embargo, no es claro a6n cu6les son las diferencias entre los niveles de producci6n de ROS y los mecanismos de detoxificaci6n del tejido hematopoy6tico normal vs las c6lulas tumorales leuc6micas. Por lo tanto, se propone realizar una b6squeda en la literatura para tratar de comprender mejor el metabolismo de las c6lulas tumorales, con el fin de desarrollar o aplicar a futuro terapias m6s espec6ficas y menos agresivas para la m6dula 6sea, dentro de las cuales se encuentran las terapias alternativas con base en extractos naturales, como lo es el P2Et de *Caesalpinia spinosa* y Anam6 SC de *Petiveria alliacea*, extractos que han demostrado tener un efecto citot6xico en diferentes modelos experimentales *in vivo* e *in vitro*.

2. PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

La leucemia es un tipo de neoplasia que se caracteriza por la proliferación clonal de células madre hematopoyéticas o de células progenitoras de un linaje específico (7). Esta patología se encuentra entre los 10 tipos de cáncer más frecuentes en Colombia. Según Globocan para el año 2018 se reportaron 3126 nuevos casos con una mortalidad de 2192. El Instituto Nacional del Cáncer, informó un número de casos nuevos de leucemia correspondiente a 14,1 por cada 100.000 hombres y mujeres por año, además, el número de decesos es de 6,5 por cada 100.000 mujeres y hombres por año, y también se destaca que la enfermedad es más frecuente en adultos mayores de 55 años y en niños menores de 15 años. Por otra parte, se esperan cada año cerca de 1.338 nuevos casos de leucemia en hombres y 1.290 en mujeres en el país (3).

A los pacientes que son diagnosticados con la enfermedad se les suministran diferentes tipos de tratamiento, entre ellos: trasplante de células madre, radioterapia y/o quimioterapia con distintos blancos moleculares (2). Esta última, implica el uso de medicamentos para interrumpir la formación y/o proliferación de las células neoplásicas, este tratamiento ayuda a que el paciente llegue a tener una remisión completa de la enfermedad (5); sin embargo, se han identificado diferentes mecanismos de resistencia en las células leucémicas, como son: la alteración del metabolismo glucolítico (8), la modificación de los puntos diana (9), alteración de las enzimas del ciclo antioxidante, en las que se destaca la modulación de Glutati6n y producci6n de ROS (10) (11), que posteriormente podría conducir a la quimioresistencia.

En términos generales, se acepta que las células tumorales presenten niveles basales superiores de ROS con respecto a las células normales, y esto debido a las diversas alteraciones de las células tumorales entre ellas su alta tasa de proliferaci6n y su metabolismo alterado como consecuencia de esto, e incluso sus alteraciones genéticas o epigenéticas, entre otras (6).

Aunque estas diferencias no parecen ser ciertas para todos los tumores, se cree que, para defenderse de estos niveles altos de ROS, las células tumorales expresan en mayor cantidad los mecanismos de detoxificación correspondientes, lo que las mantiene protegidas de los efectos deletéreos de los radicales libres (6). Visto que varias enzimas de la ruta glutatión eliminan los ROS y mantienen el equilibrio oxidativo (12), existe evidencia reciente que sugiere que la quimioterapia prolongada puede reducir el ROS en las células tumorales (6), la hipótesis que se ha venido manejando hasta la fecha sostiene que algunos de los quimioterapéuticos, entre ellos la doxorubicina, además de sus efectos específicos sobre el ciclo celular, el DNA u otros, aumenta los ROS a niveles a donde la célula tumoral ya no sobrevive (13). Aunque esta hipótesis parece razonable, no contempla las diferencias intrínsecas en el metabolismo REDOX, entre las células tumorales vs normales.

Teniendo en cuenta lo anterior, se quiere comprender cuales son las diferencias entre los niveles de ROS y glutatión en células leucémicas y células progenitoras hematopoyéticas normales, y adicionalmente las fuentes de producción, con el fin de entender los mecanismos antioxidantes de las células leucémicas y su efecto hacia la inducción de la resistencia a los quimioterapéuticos, para en un futuro poder evaluar el efecto de los extractos naturales P2Et de *Caesalpinia spinosa* y Anamú SC de *Petiveria alliacea* sobre líneas celulares leucémicas en cuanto a la producción de ROS y glutatión, para entender más ampliamente los mecanismos por los cuales inducen citotoxicidad tanto *in vivo* como *in vitro*.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Células madre hematopoyéticas

Las células madre hematopoyéticas (CMH) se originan en la médula ósea (MO), estas se caracterizan primero, por tener la capacidad de ser multipotentes, es decir, que dan origen a la gran diversidad de células sanguíneas, como lo es la serie roja (eritrocitos), la serie blanca (linaje linfocítico: linfocitos T y linfocitos B; y mieloide: neutrófilos, basófilos, eosinófilos, mastocitos y monocitos); segundo, por tener un bajo potencial proliferativo; y tercero, poseen una alta capacidad de generación de nuevas células madre idénticas, es decir, capacidad de autorrenovación (14).

Las CMH, se clasifican en CMH de largo plazo (CMH-LP) y CMH de corto plazo (CMH-CP). Las CMH-LP, constituyen menos de 0.1% de las células en la médula ósea, son capaces de producir todos los tipos de células maduras de la sangre durante la vida de un ser humano y de generar progenitores. Y en otra medida, las CMH-CP son las encargadas de generar células progenitoras del linaje bien sea linfoide o mieloide (14).

Las CMH expresan marcadores celulares específicos, como el antígeno CD34 el cual, es considerado como el *gold estándar* para la identificación de estas y es expresado entre 1-4% de células nucleadas presentes en la médula ósea humana. Este antígeno CD34 es una glicoproteína monomérica de membrana codificada por un gen ubicado en el cromosoma 1q32 (14) que se expresa en etapas iniciales de la diferenciación sanguínea manteniéndose aún en los precursores linfoides y mieloides para luego dejar de expresarse cuando el precursor entra en una etapa de diferenciación. Se cree que este antígeno tiene un papel muy importante en la adhesión intracelular induciendo la polimerización de actina. Así mismo, se ha demostrado que la regulación de la expresión del antígeno CD34 está implicada en el mantenimiento de la

actividad normal de las células hematopoyéticas progenitoras gracias a la inhibición de la proliferación, mediada por contacto y agregación celular (14) (15).

3.2. Leucemia

La leucemia es una enfermedad heterogénea que se caracteriza por tener una proliferación clonal, autónoma y anormal de los progenitores hematopoyéticos o de las mismas CMH con un inmunofenotipo CD34+ (16). Según estudios realizados por Costello, et al. son las células madre leucémicas, en específico la subpoblación CD34+/CD38-, las que van a tener un papel muy importante en la progresión de la enfermedad ya que son capaces de reconstituir la leucemia aguda (LA) (20) (21). Esta subpoblación también demuestra la sobreexpresión de Proteínas Resistentes a Drogas (MDR), concretamente las Proteínas de Expulsión de Fármacos (MRP) las cuales evitan la acumulación de quimioterapéuticos (22) como la Daunorubicina y así, disminuyen la efectividad de este (21). Por otro lado, las células CD34+/CD38- también presentan una disminución de la expresión de FasL, lo que afecta la inducción de apoptosis mediada por linfocitos T, evadiendo entonces la muerte celular (21). Aunque esta subpoblación es de gran importancia, hay también pacientes con otros fenotipos, como CD34+/CD38+ y CD34-, sin embargo, son las células CD34+/CD38- las que se presentan en un gran porcentaje de pacientes (23).

La proliferación anormal de estas células leucémicas provocará que se ocupe paulatinamente el espacio de la médula ósea (18) y, esto causa en el paciente anemia progresiva, sangrado anormal y predisposición a infecciones, así como algunas manifestaciones clínicas incluyendo fiebre, dolor óseo, pérdida de peso, etc. (19).

Dentro de las diferentes opciones terapéuticas con que se cuenta para el tratamiento de las leucemias, se incluye la radioterapia, donde se utilizan ondas de alta energía para eliminar

a las células neoplásicas; los trasplantes, que pueden ser: autólogo, donde los progenitores hematopoyéticos provienen del mismo paciente, y alogénicos, que hacen referencia a células de un familiar e incluso un donante (persona no emparentada) (24); y la quimioterapia, en donde se implementan medicamentos para evitar la proliferación de las células mediante diferentes mecanismos, como lo son: el evitar la síntesis de DNA (citarabina), inhibir la topoisomerasa IIA (daunorubicina), unión de alcaloides a los microtúbulos de la proteína tubulina, bloqueando a las células en la metafase (vincristina), fragmentación del DNA (tríóxido arsénico), entre otros (25). Aparte de realizar estas funciones, los quimioterapéuticos en dosis elevadas incrementan los niveles de ROS y desarrollan citotoxicidad en la célula (26), de manera que se induce al proceso apoptótico celular.

3.3. Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) en CMH y células tumorales

Las Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) son compuestos derivados de la molécula de oxígeno producidos por un lado por procesos enzimáticos propios de la cadena de transporte de electrones y de la familia de las enzimas NOX de las NADPH oxidasas, y por otro lado, por procesos no enzimáticos como lo es la exposición a la luz ultravioleta (UV) o a la radiación ionizante y por administración de quimioterápicos al inducir estrés oxidativo (27) (28). Dentro de las Especies Reactivas de oxígeno se encuentran: el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), los superóxidos (O_2^-), el radical hidroxilo ($OH\cdot$), radical peróxido, el dióxido de nitrógeno y el hidroperóxido lipídico (LOOH); las cuales, influyen en procesos biológicos de las CMH, debido a que se requieren bajos niveles de ROS para que las células madre mantengan un estado quiescente y la capacidad de autorenovación y alto niveles de ROS para procesos de proliferación, diferenciación, senescencia y apoptosis de una manera dependiente de la dosis, lo que consecuentemente lleva a su agotamiento.

Por lo tanto, la producción de ROS en las CMH está estrictamente regulada para garantizar que se tenga la capacidad de mantener la homeostasis de los tejidos y consecuentemente, para evitar que haya un agotamiento prematuro de estas células (13). Sin embargo, los pacientes con leucemia que son sometidos a quimioterapia están expuestos a un estrés oxidativo, lo que induce un incremento de los niveles de ROS, y estos pueden producir daño a proteínas o al DNA y posteriormente conducir a la muerte tanto en células normales como tumorales.

No obstante, es claro que las células tumorales, tienen mecanismos de regulación oxidativo, que les confieren resistencia para evitar la muerte celular (6) (18). Diferentes estudios demuestran que el aumento de la producción de ROS es una característica especial de las células leucémicas tumorales, tal como ha sido observado en líneas celulares leucémicas como THP-1 de leucemia monocítica aguda, MV4-11 de leucemia mieloide aguda, y KG-1 de leucemia mielógena aguda y en células de pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC), leucemia mieloide aguda (LMA) (29), leucemia linfoblástica aguda de células T (30), leucemia linfocítica aguda (LLA) y leucemia linfocítica crónica (LLC) (31) y otras neoplasias mieloproliferativas. Estos niveles se han asociado con la progresión de tumores malignos, ya que, provocan una inestabilidad genética y una alteración de las vías de señalización implicadas en el crecimiento y la supervivencia celular (32).

3.4. Mecanismo de regulación homeostático entre ROS y Glutathión.

Como se mencionó previamente, las células leucémicas presentan niveles basales altos de ROS de manera fisiológica y adicionalmente este incremento se asocia con la administración de agentes quimioterapéuticos; las células tumorales al ser expuestas a este tipo de fármacos cursan por un estrés oxidativo, donde los niveles de ROS aumentan, desencadenando procesos de muerte celular. Para restaurar estos niveles y conseguir entrar en homeostasis o equilibrio,

la célula tiene mecanismos de regulación basados en sistemas antioxidantes capaces de generar una detoxificación, como el sistema glutatión (6).

El glutatión es un tripéptido de ácido glutámico, cisteína y glicina, que se crea mediante un proceso que comienza con la unión de glutamato y cisteína para producir γ -glutamilcisteína. Este importante paso es catalizado por la holoenzima glutamato-cisteína ligasa, que se compone de una subunidad catalítica (GCLC) y moduladora (GCLM). La γ -glutamilcisteína formada, se liga posteriormente a la glicina por la glutatión sintetasa (GSS) para producir la forma reducida de glutatión (GSH). Esta molécula, mantiene la homeostasis redox intracelular, por medio de reacciones catalizadas por enzimas como la glutatión peroxidasa (GPx), encargada de la oxidación de glutatión reducido (GSH) a glutatión disulfuro (GSSG) para convertir el peróxido de hidrógeno en agua. También está la glutatión S transferasa (GST), la cual cataliza la conjugación de GSH con xenobióticos electrofílicos; y finalmente, la enzima Glutatión Reductasa (GR), importante en el reciclaje enzimático del glutatión (11). Más específicamente, la actividad del glutatión está relacionado con el mantenimiento del estado tiol de las proteínas, debido que al haber un estrés oxidativo se afecta tanto la conformación como la funcionalidad de la proteína. Por otro lado, tiene un papel importante en la modificación de los residuos de cisteína, pues se ha descrito que afectan el equilibrio oxidativo, ya que, la cisteína se auto oxida a cistina y provoca un aumento en los niveles de ROS tóxicos. Es así, que hay una relación existente entre los niveles de ROS y de glutatión, pues por un lado, esta molécula equilibra la producción de ROS inducida fisiológicamente y por otro, regula la elevación de ROS provocada por los quimioterapéuticos, promoviendo la resistencia a estos antineoplásicos prooxidantes (6).

3.4.1. Enzimas involucradas en el Sistema Glutación

Como se mencionó anteriormente, el glutati3n mantiene el estado redox intracelular mediante procesos desarrollados por las enzimas GPx, GST y GR.

Las GST son una familia de enzimas de desintoxicaci3n que catalizan la conjugaci3n de glutati3n (GSH) a una amplia variedad de xenobi3ticos. Esta capacidad de desintoxicaci3n comprende un papel en la protecci3n celular del estr3s ambiental y oxidativo, pero tambi3n est3 implicada en la resistencia celular a las drogas. Dentro de la familia de las GST, se encuentra una variedad de isoenzimas, entre las cuales, varias est3n sobreexpresadas en procesos cancer3genos y est3n relacionadas con el desarrollo y la expresi3n de resistencia a una variedad de quimioter3picos. Las GST se dividen en 3 tipos; microsomales, mitocondriales y citos3licas. Las microsomales se definen como "prote3nas asociadas a membranas en el metabolismo de eicosanoides y glutati3n" (33). Las citos3licas por su parte, existen como mon3meros y son catal3ticamente activas en un estado homo o heterodim3rico (34), se dividen en siete clases seg3n el dominio N-terminal, que contiene un residuo de tirosina, ciste3na o serina catal3ticamente activo, donde el residuo catal3tico interact3a con el grupo tiol de GSH (35), de esta manera se encuentran las siguientes clases: alfa, mu, omega, pi, sigma, theta y zeta (33). Por otra parte, la 3nica enzima mitocondrial confirmada de la familia GST es la GST-Kappa, la cual tambi3n se presenta en los peroxisomas (36) (37).

Asimismo, la familia de la GPx es un miembro importante del sistema antioxidante que metaboliza el ROS intracelular y por tanto mantiene la homeostasis de las c3lulas. Se han descubierto 8 polimorfismos de GPx en mam3feros, correspondientes desde la GPx1 a la GPx8, donde solamente cinco hacen parte de los humanos (GPx1, GPx2, GPx3, GPx4, y GPx6). Por su parte GPx1 tiene como funci3n la reducci3n del per3xido de hidr3geno y los hidroper3xidos de 3cidos grasos en el citoplasma, sin embargo, no puede reducir los hidroper3xidos de

fosfolípidos en la membrana celular; los polimorfismos GPx2, GPx3 y GPx6 solo tienen como función principal la reducción del peróxido de hidrógeno; y finalmente, se encuentra la GPx4 que tiene como objetivo reducir eficazmente los hidroperóxidos de fosfolípidos, ácidos grasos, colesterol y timina. No puede reducir el peróxido de hidrógeno (58).

Finalmente, la glutatión reductasa (GSR), a diferencia de las otras enzimas, es solamente una y tiene como única función el inducir la reducción del Glutatión oxidado (GSSG) a Glutatión reducido (GSH) utilizando NADPH como factor. Este proceso ayuda a la célula a realizar un proceso de “reciclaje” con el fin de regular el estado REDOX. La homeostasis inducida por GSR ha demostrado resistencia a quimioterapéuticos y supervivencia de las células tumorales.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de la producción de ROS y glutatión en células madre hematopoyéticas y células leucémicas y su relación con la resistencia a los quimioterapéuticos convencionales.

4.2. Objetivos específicos

4.2.1. Revisar las diferencias entre los niveles de ROS de células madre hematopoyéticas y células tumorales, según lo reportado en la literatura.

4.2.2. Establecer las diferencias entre la producción de glutatión en células normales y en células tumorales, según lo reportado en la literatura.

4.2.3. Evaluar los efectos asociados a la producción de ROS y glutatión en células leucémicas, y su relación con la resistencia a los quimioterapéuticos convencionales, según lo reportado en la literatura.

4.2.4. Determinar las características fenotípicas de las líneas leucémicas, K562 y U937, para utilizarlas posteriormente como modelo de estudio del metabolismo celular tumoral.

5. METODOLOGÍA

5.1. Búsqueda de la información en bases de datos.

El presente trabajo se basó en una revisión de la literatura en el periodo de enero de 2020 a mayo de 2020, de acuerdo con el sistema PICO para identificar los elementos principales de los artículos reportados en PubMed, EBSCOhost y la base de datos de la Pontificia Universidad Javeriana, en el cual se incluyeron artículos desde el año 2000 hasta el año 2020. La revisión fue conducida en idioma inglés. Las palabras clave empleadas en diferentes combinaciones fueron:

- Gluthatione OR GSH OR GST OR GPx OR GR
- Reactive Oxygen Species OR ROS
- Leukemia OR leukaemia OR leukemic cell line
- Drug resistance OR Chemoresistance
- Hematopoietic Stem Cells OR HSC

Criterios de inclusión: Los criterios de inclusión fueron estudios que incluyeron:

1. Pacientes con leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfocítica aguda y leucemia linfocítica crónica.
2. Artículos de revisión en los cuales se encontraba no solamente leucemia, sino también otros tipos de neoplasias.
3. Artículos experimentales donde se utilizaron líneas celulares leucémicas

Criterios de exclusión: Los criterios de exclusión fueron estudios que incluyeron:

1. Artículos experimentales que trataban otras neoplasias distintas a la leucemia.

Complementariamente, el trabajo tuvo una parte práctica para aprender a utilizar distintos equipos empleados en un laboratorio de investigación como el Citómetro de flujo y el espectrofotómetro, y adicionalmente, para adquirir habilidades en el cultivo celular de distintas líneas celulares tumorales para establecerlas en un futuro, como modelos de estudio metabólico tumoral.

5.2 Cultivo y mantenimiento de las líneas celulares leucémicas

Las líneas celulares K562 y U937 se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con SFB al 10%, L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U / ml, estreptomicina 100 µg / ml, y Hepes 0,01 M y se incubaron en atmósfera húmeda a 37 ° C y 5% CO₂. Diariamente se determinó que los cultivos estuvieran libres de contaminación por observación directa al microscopio y cada 48 horas se hizo cambio de medio suplementado, revisando viabilidad celular con azul tripano y haciendo los recuentos celulares en cámara de Neubauer. Para la realización de la citometría y experimentos a futuro, se estableció un banco de células en nitrógeno líquido.

5.3. Inmunofenotipificación de las líneas celulares K562 y U937

La caracterización fenotípica de las líneas celulares leucémicas se realizó por citometría de flujo, empleando anticuerpos contra los antígenos de superficie de las células. Para la línea K562 se marcaron 5×10^5 células por tubo, se lavaron con PBS 1X y PBS-SFB 2%. Posteriormente se procedió al proceso de marcación utilizando los siguientes anticuerpos:

Marcador	Fluorocromo
CD105	PE

CD34	PercP-Cy5.5
CD117	APC
CD71	APC-H7
CD45	V500
HLA-DR	FITC

Para las células U937, se emplearon 3 combinaciones diferentes de anticuerpos como son:

Combinación 1:

Marcador	Fluorocromo
CD34	PercP-Cy5.5
CD11c	APC
CD14	APC-H7
CD45	V500
HLA-DR	FITC
CD4	PercP

Combinación 2:

Marcador	Fluorocromo
IREM-2	APC
CD14	APC-H7
CD45	V500
CD64	FITC
CD4	PercP

Combinación 3:

Marcador	Fluorocromo
CD34	PE
CD117	APC
CD45	FITC
CD4	PercP
Viabilidad	Live/Dead Aqua

En seguida, se incubaron por 30 minutos a 4°C en oscuridad. Terminada la incubación, las células fueron lavadas con PBS-SFB 2%, se resuspendieron con PBS 1X y se realizó la lectura en el citómetro de flujo Aurora (Cytex). El análisis de los datos se realizó con el software SpectroFlo (Cytex).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Producción de ROS en CMH y en células tumorales

La fuente de producción de ROS en CMH está dada principalmente por la cadena de transporte electrones (ETC), basada en la transferencia de electrones por NADPH y FADH, en donde hay un gradiente para bombear hidrogeniones (H^+) al espacio intermembranal de las células por medio de los complejos I, III y IV, en donde en este último, se encuentra una molécula de oxígeno como aceptor final de electrones, la cual puede experimentar reducciones para formar superóxido (O_2^-) y subsecuentemente peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (40).

Se ha descrito que la producción de ROS en CMH, juega un papel importante en la proliferación, diferenciación y senescencia de esta población celular, de manera dependiente a la dosis, ya que se requieren bajos niveles de ROS para mantener su estado quiescente y capacidad de autorenovación; mientras que los altos niveles de ROS están asociados con procesos de diferenciación y proliferación en esta población celular (4) (11). Estos niveles están regulados por diferentes factores de transcripción los cuales están asociados con el metabolismo, las condiciones de oxígeno y el mismo estrés. Dentro de estos se encuentra el Factor inducible por hipoxia 1 alfa (HIF 1 α), el cual a baja expresión se asocia con un cambio de metabolismo, es decir desde un metabolismo glucolítico a un metabolismo más de OXPHO. Infiriendo así que, en células ubicadas en nichos hipóxicos de la MO, se encuentran bajos niveles de ROS para mantener un estadio quiescente presentando un metabolismo glucolítico, para lo cual, el HIF 1 α restringe la producción de ROS y OXPHOS por regulación de genes metabólicos (41).

En relación con la autorenovación de las CMH, los bajos niveles de ROS están regulados por FOXO3, un factor de transcripción de la familia *Forkhead box O* el cual regula varios genes

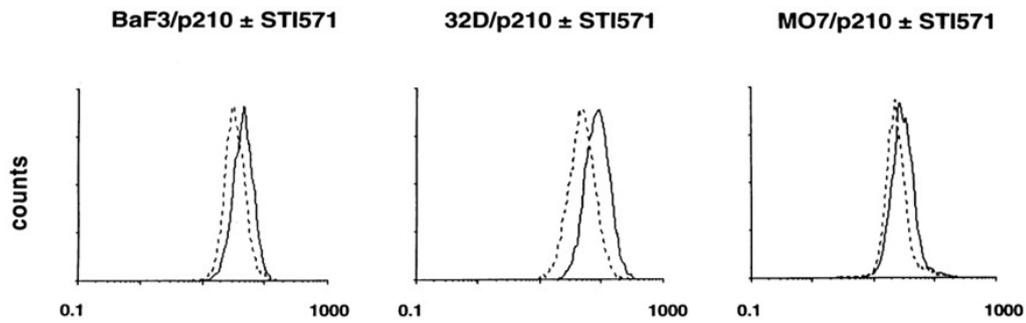
que afectan muchos procesos celulares como el metabolismo, la regulación del ciclo, diferenciación y supervivencia al actuar en la vía PTEN / PI3K / Akt. Otro de los factores involucrados en la autorenovación es BMI-1, miembro del Complejo de proteínas Polycomb, al regular la función mitocondrial para inhibir la producción de ROS y la expresión de p16; un inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina que tiene un papel importante en la regulación del ciclo celular (42).

En procesos de proliferación celular, la producción de ROS está controlada por mTOR; una serina / treonina quinasa perteneciente a la familia de quinasas relacionadas con PI3K que tiene un papel importante en la regulación del crecimiento y el metabolismo celular. Un estudio del año 2008 realizado por Chen y colaboradores, mostró como la hiperactivación de mTOR1 por delección condicional de *Tsc1*, estimuló la proliferación de HSC, deterioro la autorrenovación de HSC y eventualmente provocó el agotamiento de HSC en asociación con una mayor producción de ROS (43).

Por otro lado, la proteína quinasa activada por mitógeno p38; miembro de la familia de quinasas de traducción de señales MAPK, tiene un rol en la inducción de la senescencia en respuesta a una variedad de estímulos a través de la regulación positiva de p16 y Arf; una GTPasa de factor de ribosilación de ADP, asociada a una alta producción de ROS (40).

Ahora bien, la exposición de las células a ROS induce daños al DNA que activa ATM; una serina / treonina quinasa que desempeña un papel central en la coordinación de la reparación de roturas de doble cadena de ADN, lo que provoca una acumulación y activación de p53, el cual se transloca al núcleo para activar transcripcionalmente factores proapoptóticos como Fas y DR5, que al interactuar con sus ligandos activan el iniciador de caspasa 8 para desencadenar apoptosis (44).

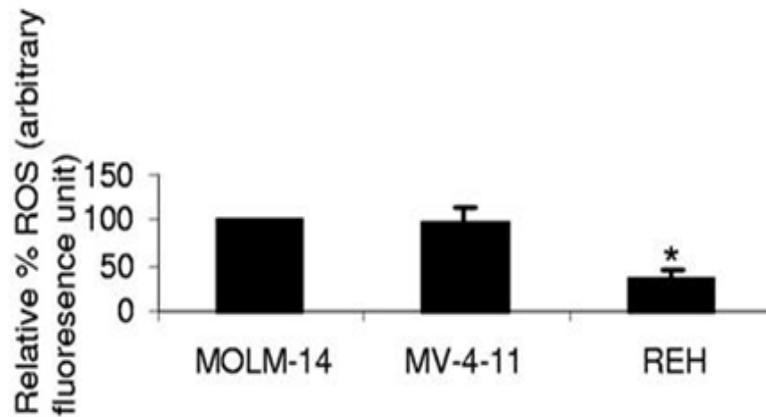
Según Marcia A, et al. y Samimi A, et al., existen diferentes niveles de ROS en las CMH y células tumorales (9) (10). En el caso de las células leucémicas, estas presentan niveles elevados de ROS por la sobreexpresión de oncogenes como BCR/ABL, FLT3 y C-MYC, los cuales activan diferentes rutas de señalización implicadas en proliferación y supervivencia celular o por mutaciones en el ADN mitocondrial (ADNmt), lo que da como resultado alteraciones de la ETC mitocondrial y una producción de ROS potencialmente elevada (6). En el caso de BCR/ABL, producto de la translocación t(9;22) lo que conduce a la regulación de vías de señalización implicadas en proliferación y supervivencia celular, provoca una producción de ROS al manipular la familia NOX mediante regulación ascendente de p47phox, una proteína citosólica para generar O_2^- . Por otro lado, debido a la translocación, se produce una inestabilidad genómica que concomitantemente genera mayor ROS y otras mutaciones implicadas en resistencia a los inhibidores de tirosina quinasa de primera línea. En un estudio realizado por Sattler y colaboradores en el 2000, utilizaron tres líneas celulares, una de leucemia megacarioblastica aguda (M-O7), una de precursores mieloides murinos (32D) y una línea celular pro-B dependiente de interleucina-3 murina (BaF 3), las cuales fueron transfectadas con un plásmido que contenía el gen de fusión BCR/ABL. En estas líneas se determinaron los niveles de ROS con la sonda DCFDA por citometría, antes y después de haberle agregado un inhibidor del gen de fusión (ST1571), donde se observaron niveles mayores de ROS en las líneas con BCR/ABL sin inhibidor, representadas por la línea continua como se muestra en la *Gráfica 1*.(40).



Gráfica 1. El gen de Fusión BCR/ABL está relacionado con producción de ROS. Tomada de Sattler M et al.

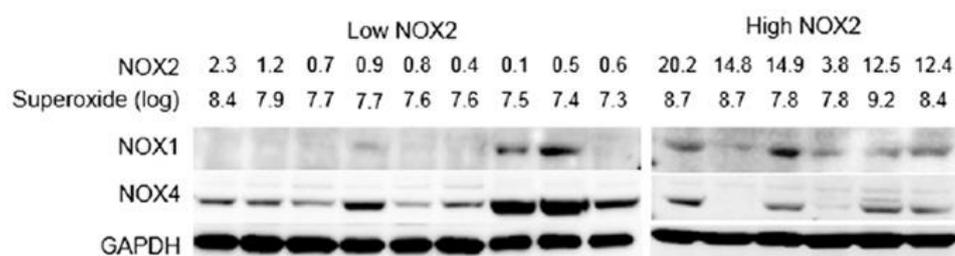
The BCR/ABL tyrosine kinase induces production of reactive oxygen species in hematopoietic cells. *J Biol Chem.* 2000 Aug 11;275(32):24273-8

Como se mencionó previamente, otro de los oncogenes involucrados es FLT3 generado por una mutación que conduce a su autofosforilación, provocando una activación constitutiva de esta quinasa y por ende la iniciación de vías de señalización como MAPK (RAS-RAF-MEK-ERK) y PI3K (PI3K-AKT-mTOR) implicadas en proliferación y supervivencia respectivamente, lo que ocasiona un ciclo de inestabilidad genómica y por ende un aumento de ROS, llevando a roturas en el DNA. Adicionalmente, la mutación FLT3/ITD activa fuertemente STAT5 lo que implica una mayor capacidad de crecimiento a las células que presentan esta alteración. En este orden de ideas, un estudio por Sallmyr y colaboradores en 2008, reveló que FLT3-ITD, provoca niveles elevados de ROS dentro de las células murinas Ba/F3 o 32D que expresan Flt3-ITD, así como en las líneas celulares de LMA humana (MOLM-14 y MV-4-11) ya que, FLT3/ITD a través de la señalización por STAT5 y la activación de Rac1; un componente de NOX para la generación de O_2^- , aumenta los niveles de ROS, en comparación a los presentados en la línea de leucemia linfocítica aguda (REH), la cual, únicamente presenta la mutación FLT3/WT, como se demuestra en la *Gráfica 2.* (45).



Gráfica 2. La mutación FLT3/ITD está asociada con una mayor producción de ROS. Tomada de Sallmyr A. Fan J. Datta K. Kim KT. Grosu D. Shapiro P. Small D. Rassool F. Internal tandem duplication of FLT3 (FLT3/ITD) induces increased ROS production, DNA damage, and misrepair: implications for poor prognosis in AML. *Blood*. 2008;111:3173–3182.

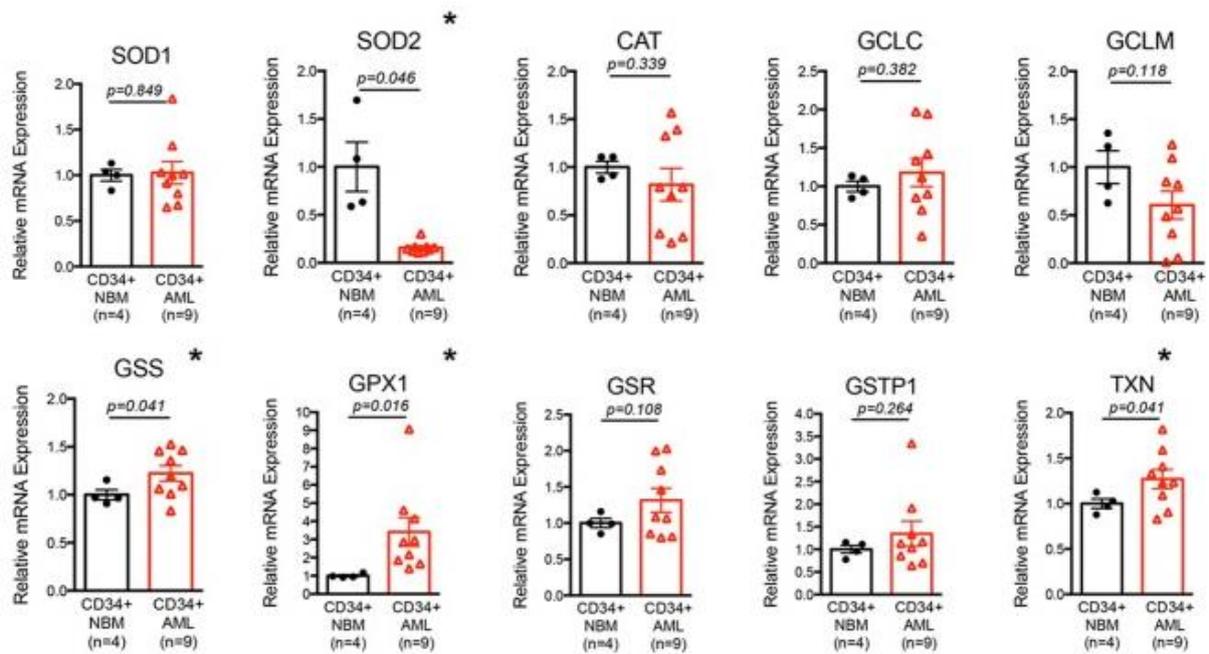
Además, de la actividad de los oncogenes sobre la producción de ROS, diversos estudios demuestran que las enzimas de la familia NOX de las NADPH oxidasas, especialmente NOX1, NOX2 y NOX4, contribuyen a la elevada producción de ROS, es así que en un estudio de 2013 de Hole y colaboradores, se identificó que la producción alta de O_2^- en blastos de LMA CD34+ se atribuía a la presencia específicamente de NOX2, NOX 1 y NOX4, lo cual lo observaron por Western Blot (*Gráfica 3*). (26)



Gráfica 3. Enzimas NOX contribuyen a la producción de superóxido. Tomada de Hole PS, Zabkiewicz J, Munje C, Newton Z, Pearn L, White P, et al. *Overproduction of NOX-derived ROS in AML promotes proliferation and is associated with defective oxidative stress signaling*. *Blood*. 2013;122:3322–30

6.2. Producción de glutatión en CMH y células leucémicas

En CMH con expresión de CD34+, la producción de ROS es regulada a través de reacciones catalizadas por las enzimas GPx, GR y la GST, y se ha reportado en estas células mayores niveles de glutatión en comparación con las células CD34+ de LMA (46) (13), un ejemplo de esto es la GPx3, pues según los experimentos de Herault, et al. se demostró que su producción es bastante baja en CMH en comparación con las células leucémicas y que al eliminar el gen (GPx3) no se afecta la clonogenicidad y tampoco se induce la apoptosis celular, pero si se afecta la capacidad de repoblar el sistema hematopoyético de ratones, por lo tanto, se identifica a esta enzima como un regulador crítico de CMH de repoblación a corto y largo plazo (52). Así mismo, en un estudio por Pei y colaboradores en el 2013, se reportaron niveles reducidos de GSH y aumento de GSSG en blastos leucémicos de pacientes con leucemia mieloide aguda, además de una relación GSH/GSSG significativamente menor en células CD34+ normales en comparación con blastos CD34+ de LMA. Esto es atribuido al consumo necesario para mantener el equilibrio redox en estas células y evitar la inducción de muerte celular por estrés oxidativo. Adicionalmente se observó una mayor concentración de las enzimas involucradas en la vía propia del glutatión como GCLC, GSS, GPx1, GSTP1 y GR en un análisis de expresión relativa de ARNm de cada gen que codifica para las enzimas antioxidantes, como se puede observar en la *Gráfica 4*. Adicionalmente, se ha demostrado que el sistema de glutatión está altamente regulado o tiene una alta actividad en distintos tipos de leucemias como LMA, LMC, LLA y LLC (59).



Gráfica 4. Expresión relativa de ARNm de los principales genes antioxidantes en muestras de células CD34 + normales humanas y células CD34+ de LMA. Tomada de Pei, Shanshan et al. “Targeting aberrant glutathione metabolism to eradicate human acute myelogenous leukemia cells.” *The Journal of biological chemistry* vol. 288,47 (2013): 33542-58. doi:10.1074/jbc.M113.511170

Cabe mencionar que la vía Keap1-NRF2, está involucrada en la regulación de la expresión de genes antioxidantes. En condiciones fisiológicas, esta vía ocurre por unión de Keap1, una proteína 1 asociada a ECH tipo Kelch, al factor 2 relacionado con NF-E2 (NRF2), conduciendo a una poliubiquitinación de NRF2 para su degradación; pero en eventos de estrés oxidativo, Keap1 se modifica por compuestos inductores de estrés para inhibir el complejo de poliubiquitinación y así permitir que NRF2 se transloque al núcleo de la célula para unirse al elemento de respuesta antioxidante (ARE) e inducir la expresión de genes antioxidantes (49).

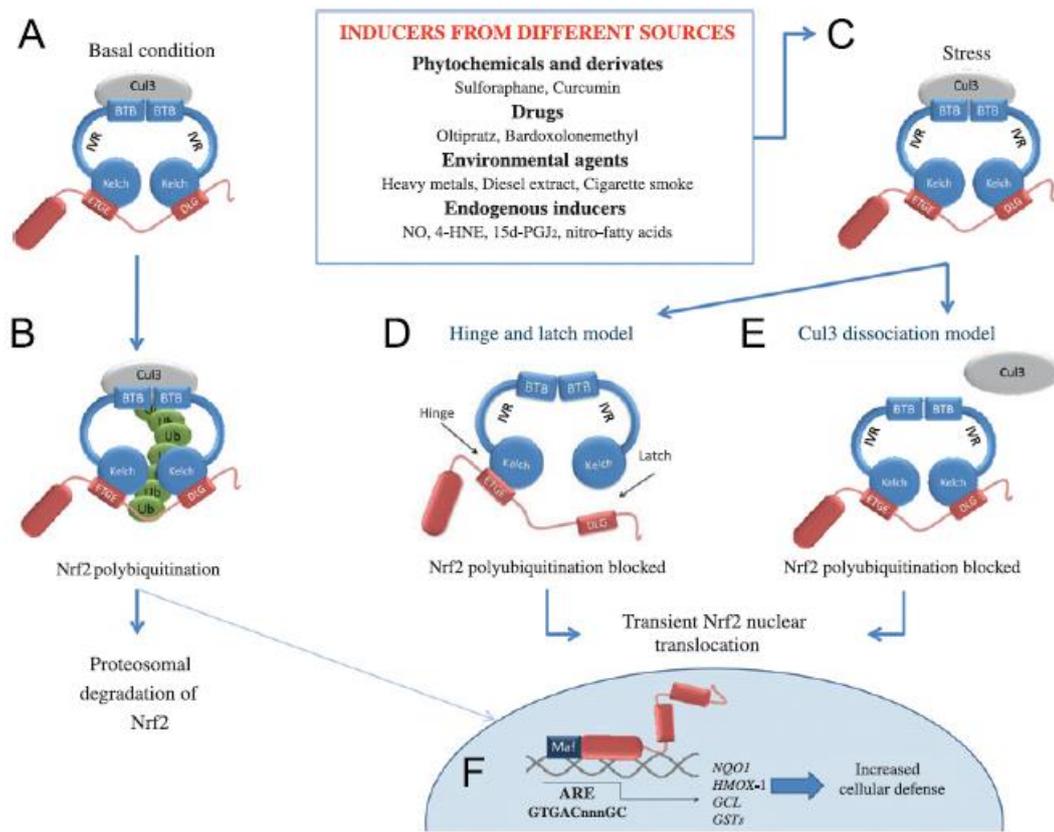


Imagen 1. Vía de señalización Nrf2-Keap1. (A) y (B) En condiciones basales; (C) en condición de estrés; (D) cambios conformacionales de Keap1; (E) modelo de disociación Keap1-Cul3; (F) Translocación de Nrf2 al núcleo. Tomada de Kansanen, E., Kuosmanen, S. M., Leinonen, H., & Levonen, A. L. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. Redox biology, 1(1), 45–49.

Para generar la expresión de genes antioxidantes en cáncer, existen tres mecanismos que promueven el bloqueo de la poliubiquitinación de NRF2, el primero consiste en mutaciones propias de Keap1, el segundo se explica por silenciamiento epigenético de Keap1, y el ultimo, por acumulación de p62, una proteína disruptiva. Otro de los mecanismos que regulan el estrés por esta vía, es debido a la inducción transcripcional de NRF2 por la expresión de oncogenes leucémicos como BCR/ABL y C-MYC, promoviendo el crecimiento celular tumoral (48). Sin embargo, se ha demostrado que en líneas celulares de LMA (U937, TPH1, Molm13 y HL60)

expuestas a quimioterapéuticos como Dnr, Ara-C y ATO, la sobreexpresión de Nrf2 es independiente de las mutaciones y a la expresión de Keap (60).

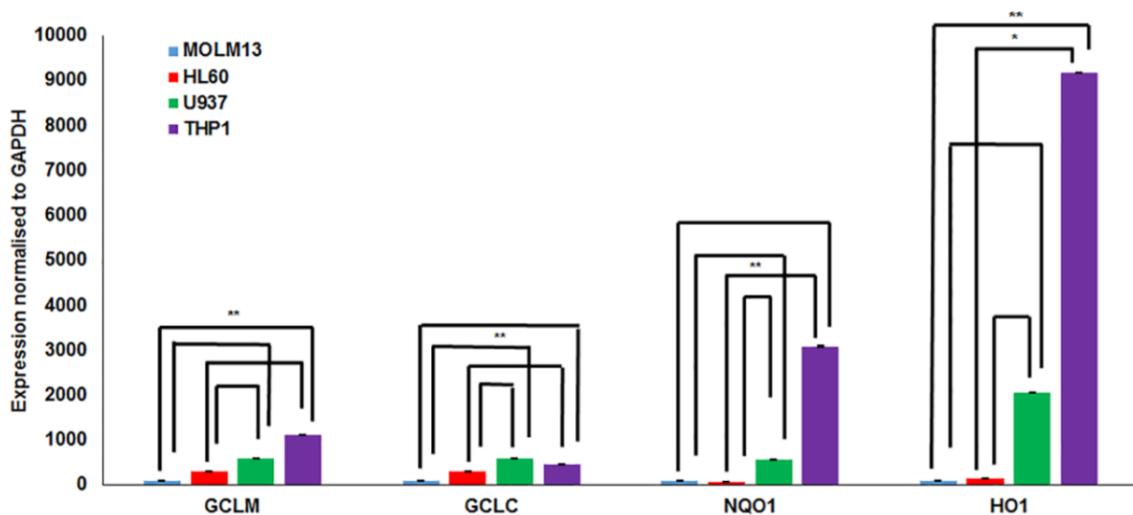
Por consiguiente, la sobreexpresión de NRF2, el factor “maestro” de la regulación de los genes de la vía antioxidante (que van a codificar enzimas como GSH, GCL, GSH sintasa) involucrados en la eliminación y la desintoxicación de ROS, es importante para mantener el estado redox intracelular en las células en general y está en gran medida participando en el equilibrio de ROS en las células leucémicas, tanto por inducción de oncogenes como por activación del sistema ante el estrés celular (48) (49) (60).

6.3. Producción de ROS y glutatión y su relación con la resistencia a quimioterapéuticos

Como se mencionó anteriormente, la producción de ROS está involucrada en muchos procesos de las CMH como la quiescencia, la autorenovación, la proliferación y la diferenciación, los cuales están reguladas por diferentes factores de transcripción como FOXO y mTOR, ya que, se deben controlar para evitar la muerte celular ante un estrés oxidativo y posteriormente llegar a un agotamiento de las CMH, para lo cual, utilizan varias moléculas antioxidantes como lo es el glutatión (7). Por otro lado, el incremento de los niveles de ROS en células leucémicas está dado por la sobreexpresión de diferentes oncogenes, los cuales, puede activar distintas cascadas de señalización implicadas en procesos de proliferación y supervivencia celular, promoviendo la leucemogénesis.

Con respecto al glutatión, su incremento se asocia al aumento de la expresión de Nrf2, este factor va a promover la síntesis de genes involucrados en la ruta antioxidante, lo que va a conducir al aumento de estas enzimas y una posterior quimiorresistencia. Karathedath, et al. realizaron experimentos en donde compararon la expresión de RNA de Nrf2 en células primarias de LMA (muestras de pacientes con LMA *de novo*) al ser sensibilizadas *ex vivo* con

Ara-C (Citarabina), Dnr (Daunorubicina) y ATO (Trióxido arsénico), y posteriormente se agruparon de acuerdo a su concentración inhibitoria 50 (CI50), se observó que las células que tenían una CI50 por encima de la mediana tenían una mayor expresión de Nrf2 en comparación con las que se encontraban por debajo de la mediana (60). Además, compararon la sensibilización *in vitro* de diferentes líneas celulares leucémicas: THP1 (línea celular con características de monocitos de una leucemia monocítica aguda), U937 (línea celular con características de mieloblastos monoblastos o monocitos de una leucemia mieloide aguda monocítica), Molm13 (línea celular de una leucemia mieloide aguda monocítica) y HL60 (línea celular de una leucemia mieloide aguda monocítica), con los quimioterapéuticos Ara-C, Dnr y ATO, y se demostró que la CI50 de las líneas U937 y TPH1 (resistentes) era mucho mayor en comparación con la CI50 de Molm13 y HL60 (sensibles). Igualmente se identificó mediante citometría de flujo, inmunotransferencia e inmunofluorescencia el aumento significativo de la expresión de Nrf2 en las células que denominaron resistentes. Teniendo en cuenta a esto, se evidencia también un aumento de la expresión de enzimas antioxidantes, como lo son GCLC y GCLM como se puede observar en la *Gráfica 5*.



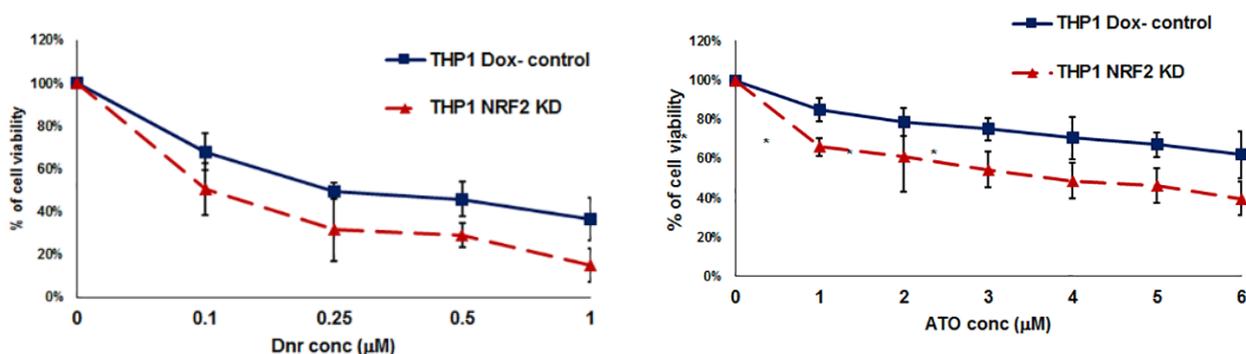
Gráfica 5. Expresión de moléculas antioxidantes relacionadas con el aumento de Nrf2. Tomada de

Karathedath S, Rajamani BM, Musheer Aalam SM, Abraham A, Varatharajan S, Krishnamurthy P, et al. (2017)

Role of NF-E2 related factor 2 (Nrf2) on chemotherapy resistance in acute myeloid leukemia (AML) and the effect of pharmacological inhibition of Nrf2. PLoS ONE 12(5): e0177227. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177227>

pone.0177227

Los investigadores también demostraron que la eliminación condicional de Nrf2 mediante un plásmido inducible a doxiciclina, sensibiliza a la línea celular TPH1 a los quimioterapéuticos Dnr y ATO, como se puede ver en la *Gráfica 6*.



Gráfica 6. Sensibilización de la línea TPH1 por la eliminación de Nrf2 mediante shARN inducible a doxiciclina. Tomada de Karathedath S, Rajamani BM, Musheer Aalam SM, Abraham A, Varatharajan S, Krishnamurthy P, et al. (2017) Role of NF-E2 related factor 2 (Nrf2) on chemotherapy resistance in acute myeloid leukemia (AML) and the effect of pharmacological inhibition of Nrf2. PLoS ONE 12(5): e0177227. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177227>

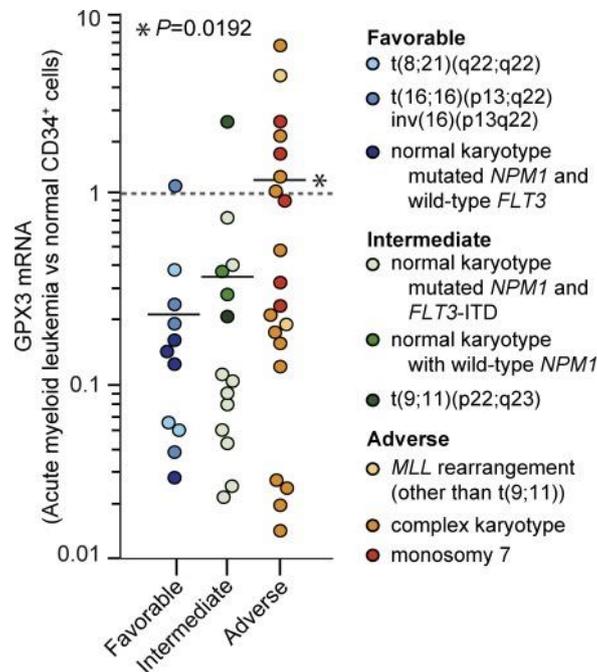
Dado esto, se evidencia un papel importante del factor Nrf2 pues conlleva al incremento de distintas enzimas antioxidantes (entre las cuales se destacan GCLC y GCLM, las cuales darán paso a la formación de GSH), que van a ayudar a la resistencia y a la supervivencia celular, evitando entonces la acumulación de ROS (60).

Por otro lado, aunque las enzimas GCLC y GCLM se encuentran aumentadas en esta patología, como se demostró anteriormente, se ha identificado que las células tumorales presentan niveles de GSH disminuido en comparación con GSSH, esto es debido a la elevada tasa de consumo para evitar el estrés oxidativo derivado de la acelerada proliferación, las alteraciones genéticas y la quimioterapia. Adicionalmente, se reporta la sobreexpresión de

varias enzimas involucradas en la vía del glutatión, como la GST, esta enzima corresponde a una de las más importantes y según la literatura, la mayormente expresada en la resistencia a cánceres, pues permite conjugar a los medicamentos y otros xenobióticos del ambiente con GSH y luego estos salen de la célula con la ayuda de las proteínas de membrana MRP (48), esto se ha visto en leucemia y es asociado a resistencia a citarabina, antraciclinas como doxorubicina y cisplatino (50). Asimismo, de las siete clases de GST citosólicas humanas, tres han sido reconocidas en quimioresistencia, GST π 1 está involucrado en la protección celular contra señales apoptóticas al inhibir la cinasa N-terminal 1 c-jun (JNK1) de la vía de la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) mediante interacciones proteína-proteína, además puede unirse al factor 2 asociado al factor de necrosis tumoral (TRAF2), esta unión bloquea la interacción de TRAF2 con la quinasa reguladora de la señal de apoptosis 1 (ASK1), impidiendo entonces la muerte celular (48); igualmente, GST μ 1 puede unirse a ASK1 e inhibir su capacidad para activar rutas de señalización JNK y p38; finalmente, el polimorfismo GST θ 1 se ha asociado a la quimioresistencia a citarabina (50) y a un mal pronóstico de la enfermedad. Kassogue, et al. demostraron que tener el genotipo GST θ 1+/GST π 1+, en comparación con los genotipos GST θ 1-/GST π 1+ y GST θ 1+/GST π 1- parece influir en el resultado del tratamiento en pacientes con LMC (51). Por otro lado, otros estudios demuestran que el presentar el genotipo GST π 1+ y tener GST θ 1- o GST μ 1- conlleva a tener un mayor riesgo de recaída en pacientes con LLA. Además, se demostró que en pacientes con LMA el tener un genotipo GST π 1- solo o GST π 1-/GST μ 1-, puede conllevar a acortar la supervivencia del individuo y aumentar la progresión de la enfermedad (61).

Por otro lado, GPx, otra enzima asociada a la ruta de glutatión se ha visto implicada en quimioresistencia, debido a la rapidez con la que pueden controlar el estrés oxidativo. Un ejemplo de ello, se describe en un estudio en donde la sobreexpresión de GPx3 aumentó con la gravedad de la leucemia y estaba asociado con pacientes con riesgo adverso, como se puede

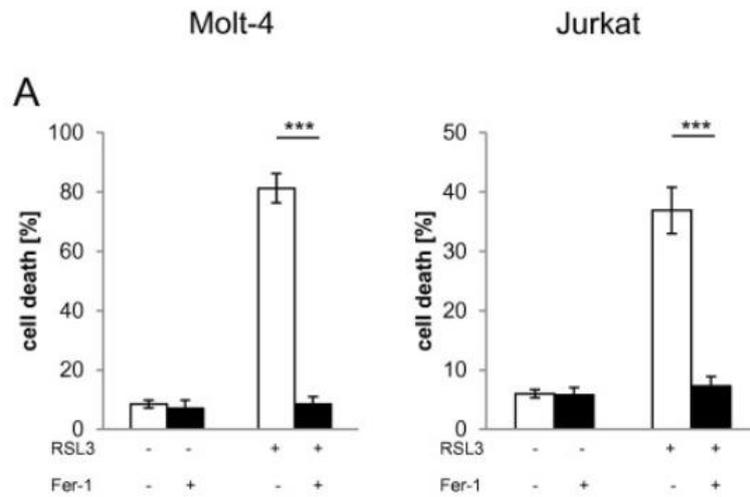
ver en la *Gráfica 7*, asimismo, mediante la eliminación del gen GPx3 por un plásmido (shGpx3) se demuestra que esta enzima es indispensable para la competitividad y para la supervivencia de las células de LMA (52).



Gráfica 7. Expresión de GPx3 en muestras de médula ósea de pacientes con LMA clasificados en grupos de riesgo definidos citogenética y molecularmente como riesgo favorable, intermedio y adverso. Tomada de Herault, O., Hope K. J., Deneault, E., Mayotte, N., Chagraoui, J. Wilhelm, B. T., Cellot, S., Sauvageau, M., Andrade-Navarro, M. A., Hébert J., Sauvageau, G. (2012). A role for GPx3 in activity of normal and leukemia stem cells. *The Journal of experimental medicine*, 209(5), 895-901

Además de esto también se ha demostrado que otro polimorfismo de la familia GPx, la GPx4 ayuda a la célula tumoral a evitar la ferroptosis. Lukas Probst, et al. han demostrado que al utilizar RSL₃ (un inhibidor de la molécula GPx4) y Ferrostatina-1 (Fer-1, un inhibidor de molécula pequeña de la peroxidación lipídica) en líneas celulares leucémicas Molt-4 (línea celular de una LLA tipo T) y Jurkat (línea celular de una LLA tipo T) se induce la muerte

celular, como se puede ver en la *Gráfica 8*, recalcando entonces que la enzima GPx4 es fundamental para la supervivencia celular (62).



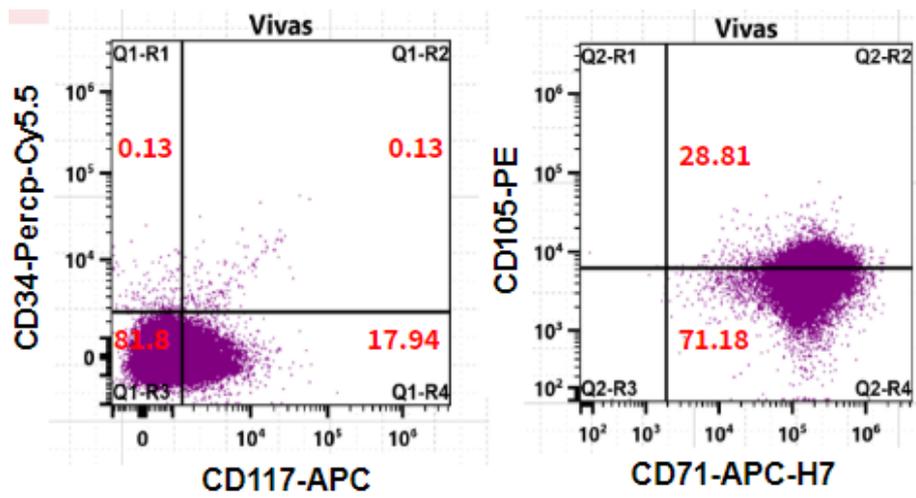
Gráfica 8. El tratamiento con RSL3, un inhibidor de GPx4, indujo la muerte celular en líneas celulares de LLA. Tomada de Probst, L., Dächert, J., Schenk, B., & Fulda, S. (2017). Lipoxygenase inhibitors protect acute lymphoblastic leukemia cells from ferroptotic cell death. *Biochemical Pharmacology*, 140, 41–52. <https://doi-org.ezproxy.javeriana.edu.co/10.1016/j.bcp.2017.06.112>

Finalmente, en cuanto a la enzima GR, no se ha demostrado una relación en cuanto a quimioresistencia ni tampoco a un mal pronóstico en leucemia.

6.4. Caracterización inmunofenotípica de las líneas K562 y U937

El análisis del inmunofenotipo de las líneas celulares leucémicas arrojó que las células K562 (eritroleucemia humana), se caracterizó por ser CD34⁻, CD71⁺, CD105^{+débil}, CD45^{+intermedio}, HLA DR⁻, y CD117^{+débil}, concluyendo que se trata de una línea de proeritroblastos con pérdida parcial de CD45 y expresión característica de CD71, el cual es el receptor de la transferrina, involucrado en la absorción del hierro y que disminuye con la maduración de los eritrocitos.

Según la clasificación de tumores Hematopoyéticos y enfermedades linfoides de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se cataloga a la leucemia eritroide con componentes morfológicos correspondientes a mieloblastos y/o eritroblastos y proeritroblastos, de manera que se reporta un inmunofenotipo $CD117^+$, $CD34^-$, $CD71^+$, $CD105^+$ y $CD45^{+/-}$. Por tanto, el inmunofenotipo realizado a la línea celular K562 corresponde a la de leucemia mieloide crónica de tipo **eritroide con evolución** a crisis blástica. Andersson y colaboradores, reportaron que K562 es una línea de eritroleucemia ya que, se observó por medio de inmunofluorescencia que expresa la principal sialoglicoproteína de glóbulos rojos, es decir, la glicoforina (53) en su superficie; una proteína que se encuentra exclusivamente en las células eritroides en la médula ósea humana que, debido a su principal componente, el ácido siálico, le concede la carga negativa superficial neta de las membranas para evitar las interacciones entre los eritrocitos (54).



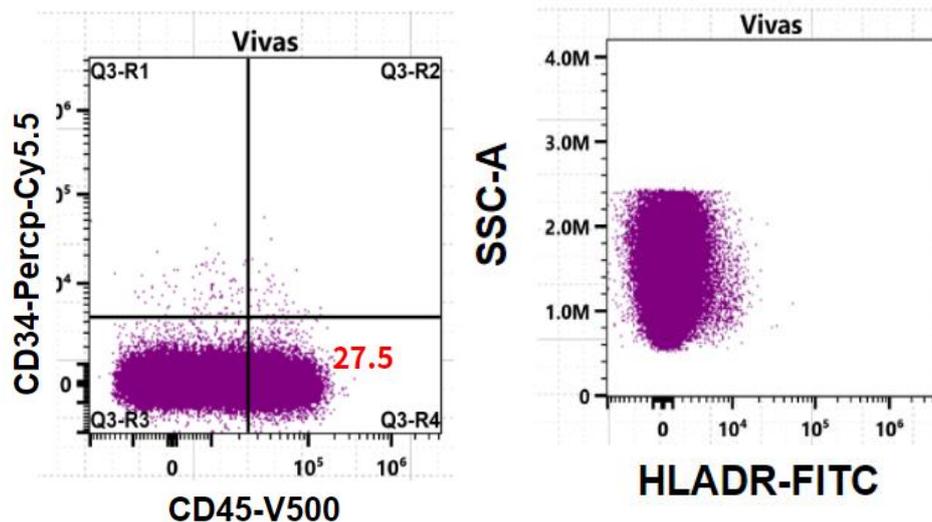


Figura 1. Inmunofenotipificación de la línea K562.

En el caso de la línea U937, una línea de leucemia mieloide aguda con características de monocitos, se obtuvo un inmunofenotipo: CD45⁺, CD34⁺, CD117⁻, CD64^{+débil}, CD4⁺, IREM-2⁺, CD14⁺, HLADR⁻, definiéndose como línea de mieloblastos con expresión aberrante de CD4⁺ y expresión característica de CD64 e IREM-2, el primero también llamado FcγRI es un antígeno que se expresa en monocitos y es un marcador de linaje granulomonocítico temprano en progenitores hematopoyéticos CD34⁺, el cual cumple un papel importante en la fagocitosis a través de la endocitosis mediada por receptor de complejos de antígeno IgG, ya que internalizan eficientemente complejos antígeno-anticuerpos y, por lo tanto, inducen un procesamiento eficiente de antígenos en péptidos presentados por moléculas de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (55). Y el segundo, IREM-2, es un antígeno que se expresa en monocitos, y actúa como receptor activador de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig) en el linaje monocítico (56).

Por otro lado, es importante mencionar que el antígeno CD4 es una glicoproteína transmembrana tipo I de 55 kDa y miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas, principalmente descrito como un marcador de subconjuntos de células T, también se puede encontrar en células NKT, células linfoides innatas y macrófagos (57).

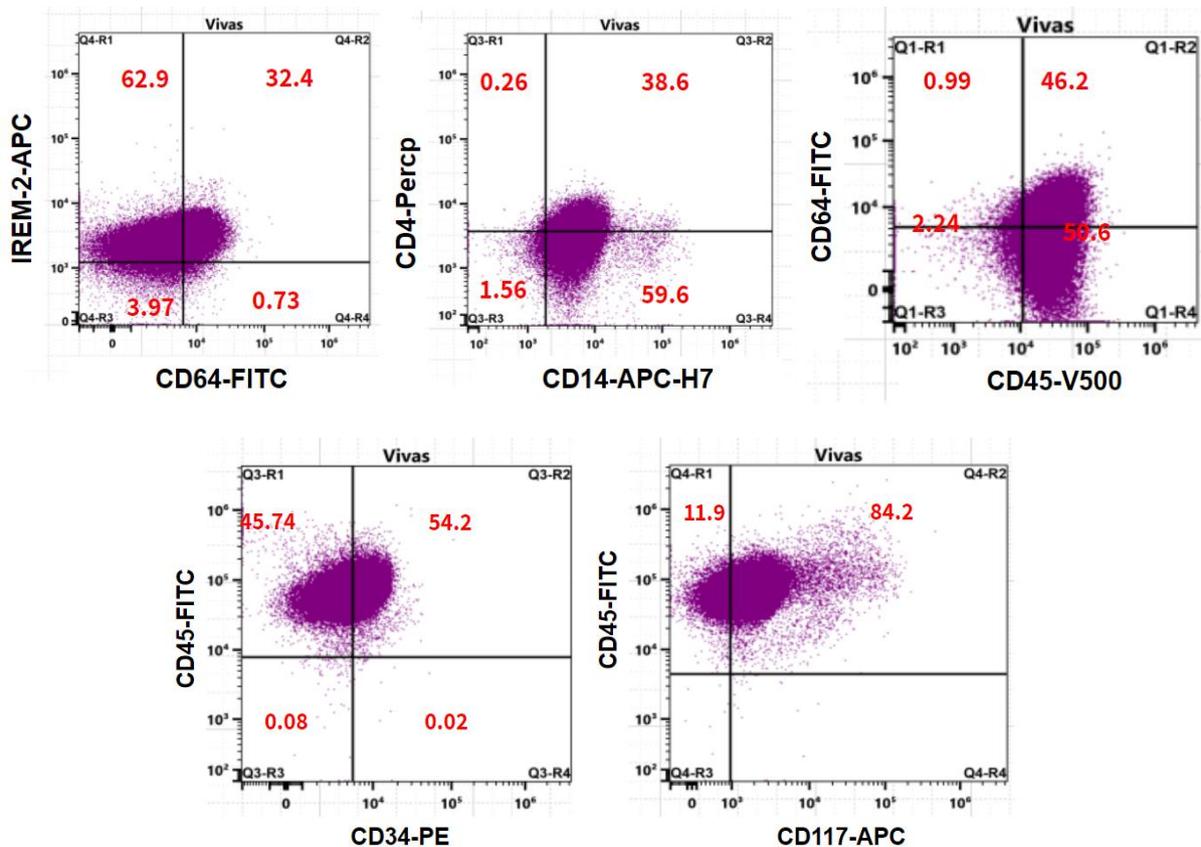


Figura 2. Inmunofenotipificación de la línea U937.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos es importante realizar el análisis de la producción de ROS, pues es sabido que la línea K562 generalmente presenta el gen de fusión BCR-ABL, el cual como se mencionó anteriormente está asociado con la producción de ROS y, por otro lado, se reporta que la línea U937 sobre expresa genes antioxidantes como GCLM y GCLC, involucrados en la síntesis de glutatión, por tanto, es interesante realizar el análisis de producción de glutatión.

En este orden de ideas se espera evaluar el efecto de los extractos sobre la producción de ROS y glutatión teniendo como antecedentes que el extracto Anamú SC, induce cambios morfológicos sobre las células tumorales, altera los filamentos de actina, y detiene a estas células en la fase G2 del ciclo celular, con posterior inducción de apoptosis (63). Adicionalmente, este extracto en una línea de cáncer de seno murino induce activación del flujo

glucolítico, el cual desencadenó la disminución de ATP intracelular, respiración mitocondrial y un bajo consumo de oxígeno, de manera que se observó una reducción en el porcentaje de proliferación de las células tumorales (64). Por otro lado, en un estudio realizado por Murillo en el año 2018, se observó que en la línea K562 tratada con el extracto Anamú-SC se aumentan los niveles de ROS de acuerdo con la concentración del extracto debido a la inducción de estrés metabólico como lo hace la doxorubicina (65) (66).

Por otra parte, se sabe que el extracto P2Et presenta actividad citotóxica, pues induce apoptosis en líneas celulares de cáncer de seno (4T1) y de leucemia (K562), por medio de despolarización de la mitocondria, la activación de la caspasa 3, la condensación de la cromatina y la disminución de la capacidad clonogénica (67) y, además, se conoce que al tratar la línea K562 con P2Et, los niveles de ROS disminuyen con las diferentes concentraciones del extracto, respecto a los niveles basales como se demostró en el estudio de Murillo en el año 2018 (65).

En el caso de la línea U937, se ha demostrado que al ser tratada con el extracto Anamú SC, se disminuyen los niveles de ROS con las diferentes concentraciones de este y adicionalmente, se describió el mismo comportamiento al ser tratada con el extracto P2Et.

En efecto, se puede entender que los niveles de ROS son variables de acuerdo con el tipo de leucemia, dado por la presencia de mutaciones o traslocaciones cromosómicas que generan inestabilidad genómica y activación de vías de señalización de proliferación y supervivencia celular como es el caso de la línea K562, sin embargo, en la búsqueda de literatura realizada en este estudio, no se encontró información acerca de la presencia de mutaciones en la línea U937, posiblemente por el tipo de leucemia al que pertenece.

Asimismo, se podría relacionar con la presencia de genes antioxidantes reexportados en la literatura los cuales hacen que haya un mejor manejo de los niveles de ROS. En cuanto al comportamiento de los extractos P2Et y Anamú SC sobre los mecanismos antioxidantes de las líneas celulares tumorales, aún no se ha estudiado detalladamente, teniendo en cuenta el papel dual que tiene el glutatión al manejar por un lado el estrés oxidativo de las células tumorales, pero por otro lado, al disminuir estos niveles de ROS, los cuales son necesarios para contribuir a la leucemogénesis de las células tumorales, de manera tal que representa un tema de interés para tratar en posteriores estudios.

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En las células madre hematopoyéticas, la producción de ROS es menor y está asociada con el estado quiescente, la proliferación, diferenciación y senescencia celular. En las células leucémicas se presentan altos niveles de ROS por diferentes fuentes: cadena de transporte de electrones, enzimas NOX y generación por parte de oncogenes, los cuales se asocian con la activación de vías de señalización para la proliferación y supervivencia celular, de manera que le otorgan a la célula propiedades de leucemogénesis. Sin embargo, los niveles de ROS deben estar estrictamente regulados en las neoplasias para no generar un estrés oxidativo que las lleve a la muerte celular, por ello, utilizan y alteran los sistemas antioxidantes como el glutatión para evadir la apoptosis celular. En células leucémicas se presenta una alta actividad del sistema del glutatión, presentando así una sobreexpresión de los genes que codifican para las enzimas que participan en este sistema. Sin embargo, al cuantificar la concentración de GSH, los niveles están disminuidos por el consumo al contrarrestar el incremento de los niveles de ROS. En contraste, en células normales de médula ósea, se observa una baja expresión de algunos genes que codifican para las enzimas del sistema glutatión. Sin embargo, al cuantificar la

concentración de GSH, estos niveles se encuentran mayores posiblemente por la baja demanda en la regulación del estrés oxidativo.

Teniendo en cuenta lo anteriormente descrito, el sistema del glutatión posiblemente puede jugar un papel importante en la resistencia a los quimioterapéuticos pro-oxidantes, al controlar el estrés oxidativo generado en las células leucémicas, al presentarse una alta actividad, sin embargo, podría ser perjudicial para la célula tumoral, el disminuir los niveles de ROS, que como se mencionó previamente, son necesarios para la progresión de la enfermedad, ya que, se ha visto que estos niveles participan en la generación de nuevas mutaciones que están involucradas en la resistencia a los quimioterapéuticos al provocar roturas en el ADN, y al mismo tiempo, al alterar vías de señalización que están implicadas en la proliferación y supervivencia celular. Por lo tanto, se necesitan estudios más específicos que permitan entender cuál sería el mecanismo por el que el glutatión podría inducir la muerte celular tumoral y así utilizarlo en un futuro como blanco terapéutico.

Por otro lado, la determinación del inmunofenotipo de las líneas celulares fue útil para identificar los marcadores expresados según el tipo de leucemia, siendo la línea K562 un modelo de esta patología con características de proeritroblastos, en la que se reporta la presencia del gen de fusión BCR/ABL, el cual contribuye a la producción de los niveles de ROS y U937 como línea de mieloblastos, en la que se informa la presencia de genes antioxidantes que están relacionados con la síntesis del glutatión como lo es GCLC y GSS. Con el fin, de utilizarlas como prototipo para el estudio del metabolismo tumoral y poder establecer a futuro el efecto de los extractos naturales P2Et de *Caesalpinia spinosa* y Anamú-SC de *Petiveria alliacea*, sobre la producción de ROS y glutatión en estas líneas celulares leucémicas, para aplicar el conocimiento sobre los mecanismos por los cuales estos extractos generan la citotoxicidad ya reportada en distintos experimentos *in vitro* e *in vivo*.

REFERENCIAS

- 1] The Global Cancer Observatory - All Rights Reserved - Mayo, 2019.
Tomado de <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/170-colombia-fact-sheets.pdf>

- [2] Instituto Nacional del Cáncer. (2019). Tratamiento de la leucemia mieloide aguda en adultos (PDQ®)–Versión para pacientes. Tomado de: <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/leucemia/paciente/tratamiento-lma-adultos-pd>

- [3] Ministerio de salud y Protección Social. (2017). Guía de Práctica para la detección, tratamiento y seguimiento de leucemias linfoblástica y mieloide en población mayor de 18 años. GPC en Internet Edición 1°. Bogotá D.C: El Ministerio; Disponible en: gpc.minsalud.gov.co.

- [4] Roy, M., Mukherjee, A., Mukherjee, S., & Biswas, J. (2017). Drug Resistance in Leukemia: Remediation by Natural Means. *Biomedical Research Journal*, 4(1), 8–27.

- [5] Bowen DT. (2005). Mutations in acute myeloid leukemia is associated with distinct cytogenetic subgroups but does not influence outcome in patients younger than 60 years. *Blood*, 2113–2119.

- [6] Traverso N et al. (2013) Role of Glutathione in Cancer Progression and Chemoresistance. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, Artículo ID 972913.

- [7] Herrera, A., Ñamendys, S., Meneses, A. (2017). Manual de oncología y procedimientos quirúrgicos. México D.F.: McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C.V.
- [8] Song, K., Li, M., Xu, X., Xuan, L. I., Huang, G., & Liu, Q. (2016). Resistance to chemotherapy is associated with altered glucose metabolism in acute myeloid leukemia. *Oncology letters*, 12(1), 334–342. doi:10.3892/ol.2016.4600.
- [9] Froelich-Ammon SJ, Burden DA, Patchan MW, Elsea SH, Thompson RB, Osheroff N. (1995). Increased drug affinity as the mechanistic basis for drug hypersensitivity of a mutant type II topoisomerase. *Journal of biological chemistry*, 270: 28018. doi:10.1074/jbc.270.47.28018
- [10] Roy, M., Mukherjee, A., Mukherjee, S., & Biswas, J. (2017). Drug Resistance in Leukemia: Remediation by Natural Means. *Biomedical Research Journal*, 4(1), 8–27.
- [11] Hall, A. G. Kearns, P. R., Pieters, R., Rottier, M. M. A., & Pearson, A. D. J. (2001). Raised blast glutathione levels are associated with an increased risk of relapse in childhood acute lymphocytic leukemia. *Blood*, 97(2), 393–398. Recuperado de: <https://doi-org.ezproxy.javeriana.edu.co/10.1182/blood.V97.2.393>
- [12] Yang H, Villani RM, Wang H, et al. (2018). The role of cellular reactive oxygen species in cancer chemotherapy. *J Exp Clin Cancer Res*;37(1):266.

- [13] Szwed, M., Laroche-Clary, A., Robert, J., & Jozwiak, Z. (2016). Efficacy of doxorubicin-transferrin conjugate in apoptosis induction in human leukemia cells through reactive oxygen species generation. *Cellular Oncology (Dordrecht)*, 39(2), 107–118.
- [14] Mera, C., et al. (2007). Células madre hematopoyéticas, generalidades y vías implicadas en sus mecanismos de auto-renovación. *Rev. Cienc. Salud*. Bogotá (Colombia) 5 (1): 67-89. Recuperado de: <http://www.scielo.org.co/pdf/recis/v5n1/v5n1a7.pdf>
- [15] Bellantuono, I. (2004). Haemopoietic stem cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(4), 607–620. doi:10.1016/j.biocel.2003.10.008
- [16] Monroy R, Estrada B, & Viveros P (2012) Leucemia para el médico general. *Revista de La Facultad de Medicina de la UNAM*, 55(2),11-25.
- [17] Krause, Diane & Fackler, Mary Jo & Civin, C.I. & May, MD,PhD, W.. (1996). CD34: Structure, biology, and clinical utility. *Blood*. 87. 1-13.
- [18] Zhou, D., Shao, L., & Spitz, D. R. (2014). Reactive oxygen species in normal and tumor stem cells. *Advances in cancer research*, 122, 1–67. doi:10.1016/B978-0-12-420117-0.00001-3
- [19] Hurtado Monroy, R., Solano Estrada, B., & Vargas Viveros, P. (2012). Leucemia para el médico general. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 55(2), 11-25. Recuperado en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0026-17422012000200003&lng=es&tlng=es.

- [20] A. Blair, D.E. Hogge, H.J. Sutherland. (1998) Most Acute Myeloid Leukemia Progenitor Cells With Long-Term Proliferative Ability In Vitro and In Vivo Have the Phenotype CD34+/CD71-/HLA-DR-. *Blood*; 92 (11): 4325–4335.
- [21] Costello, R. T., Mallet, F., Gaugler, B., Sainty, D., Arnoulet, C., Gastaut, J. A., & Olive, D. (2000). Human acute myeloid leukemia CD34+/CD38- progenitor cells have decreased sensitivity to chemotherapy and Fas-induced apoptosis, reduced immunogenicity, and impaired dendritic cell transformation capacities. *Cancer research*, 60(16), 4403–4411.
- [22] Paredes, A., Blanco, J., Echenique-Elizondo, M. (2006). Expresión de proteínas relacionadas con resistencia a múltiples fármacos (MDR-proteínas) en tumores sólidos. *Cirugía Española*. Vol. 79. Núm. 4. pp. 202-214.
- [23] Xu, B., Wang, S., Li, R., Chen, K., He, L., Deng, M., Kannappan, V., Zha, J., Dong, H., & Wang, W. (2017). Disulfiram/copper selectively eradicates AML leukemia stem cells in vitro and in vivo by simultaneous induction of ROS-JNK and inhibition of NF- κ B and Nrf2. *Cell death & disease*, 8(5), e2797. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.176>
- [24] Sociedad Argentina de Hematología. (2010). *Guía diagnóstica terapéutica*. Encontrado en: http://sah.org.ar/docs/Guias_trasplantesvf.pdf
- [25] L, García, M, Cabrero., C, del Cañizo. (2016). Leucemias agudas. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*. 12 (21): 1201-1212. Recuperado de:

<https://www-clinicalkey-es.ezproxy.javeriana.edu.co/#!/content/playContent/1-s2.0-S0304541216301974?returnurl=null&referrer=nul>

- [26] Zhang, J., Lei, W., Chen, X., Wang, S., & Qian, W. (2018). Oxidative stress response induced by chemotherapy in leukemia treatment (Review). *Molecular & Clinical Oncology*, 8(3), 391–399. <https://doi-org.ezproxy.javeriana.edu.co/10.3892/mco.2018.1549> Carrillo Esper, Raúl,
- [27] Díaz Ponce Medrano, Juan Alberto, Peña Pérez, Carlos Alberto, Flores Rivera, Oscar Iván, Neri Maldonado, Rosalinda, Zepeda Mendoza, Adriana Denisse, Pérez Calatayud, Ángel Augusto, & Ortiz Trujillo, Adriana. (2016). Especies reactivas de oxígeno, sepsis y teoría metabólica del choque séptico. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 59(1), 6-18. Recuperado de: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0026-17422016000100006&lng=es&tlng=es.
- [28] McKee, T. & McKee, J. Bioquímica. *Las bases moleculares de la vida*, 5e. McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C. V. ISBN: 978-607-15-1127-0. Disponible en: <https://accessmedicina-mhmedical-com.ezproxy.javeriana.edu.co/content.aspx?bookid=1960§ionid=14770741>
- [29] Hole, P. S., Zabkiewicz, J., Munje, C., Newton, Z., Pearn, L., White, P., Marquez, N., Hills, R. K., Burnett, A. K., Tonks, A., & Darley, R. L. (2013). Overproduction of NOX-derived ROS in AML promotes proliferation and is associated with defective oxidative stress signaling. *Blood*, 122(19), 3322–3330. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-04-491944>

- [30] Silva, A., Yunes, J. A., Cardoso, B. A., Martins, L. R., Jotta, P. Y., Abecasis, M., Nowill, A. E., Leslie, N. R., Cardoso, A. A., & Barata, J. T. (2008). PTEN posttranslational inactivation and hyperactivation of the PI3K/Akt pathway sustain primary T cell leukemia viability. *The Journal of clinical investigation*, 118(11), 3762–3774.
<https://doi.org/10.1172/JCI34616>
- [31] Mazor, D., Abucoider, A., Meyerstein, N., & Kapelushnik, J. (2008). Antioxidant status in pediatric acute lymphocytic leukemia (ALL) and solid tumors: the impact of oxidative stress. *Pediatric blood & cancer*, 51(5), 613–615.
<https://doi.org/10.1002/pbc.21665>
- [32] Chatterjee, A., Dasgupta, S., & Sidransky, D. (2011). Mitochondrial subversion in cancer. *Cancer prevention research* (Philadelphia, Pa.), 4(5), 638–654.
<https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-10-0326>
- [33] McIlwain, C. C., Townsend, D. M., & Tew, K. D. (2006). Glutathione S-transferase polymorphisms: cancer incidence and therapy. *Oncogene*, 25(11), 1639–1648.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209373>
- [34] Mannervik, B., & Danielson, U. H. (1988). Glutathione transferases--structure and catalytic activity. *CRC critical reviews in biochemistry*, 23(3), 283–337.
<https://doi.org/10.3109/10409238809088226>
- [35] Dirr H, Reinemer P, Huber R. X- ray crystal structures of cytosolic glutathione S-transferase. (1994). *Eur J Biochem*, 220: 645–661

- [36] Hui-Wen & Francis Ali-Osman. (2007). Genetic polymorphism and function of glutathione S-transferases in tumor drug resistance. *Current Opinion in Pharmacology*, 7(4):367-374
- [37] Morel, F., Rauch, C., Petit, E., Piton, A., Theret, N., Coles, B., Guillouzo, A. (2008) Gene and Protein Characterization of the Human Glutathione S-Transferase Kappa and Evidence for a Peroxisomal Localization. *The journal of biological chemistry*, 279(16):16246–16253
- [38] Baishen C., Zhuojian S., Duoguang W., Xuan X., Xia X., Liangzhan Lv., Honglue D., Ju Chen., & Xiangfeng G. (2019). Glutathione Peroxidase 1 Promotes NSCLC Resistance to Cisplatin via ROS-Induced Activation of PI3K/AKT Pathway. *BioMed Research International*. Volume 2019, Article ID 7640547, 12 pages
- [39] Corrales C. C & Muñoz M. M. (2012) Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Nova: Vol. 10 No. 18 J 135 – 250*
- [40] Irwin, M. E., Rivera-Del Valle, N., & Chandra, J. (2013). Redox control of leukemia: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants & redox signaling*, 18(11), 1349–1383. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4258>.
- [41] Takubo, K., Goda, N., Yamada, W., Iriuchishima, H., Ikeda, E., Kubota, Y., Shima, H., Johnson, R. S., Hirao, A., Suematsu, M., & Suda, T. (2010). Regulation of the HIF-1alpha level is essential for hematopoietic stem cells. *Cell stem cell*, 7(3), 391–402. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.06.020>

- [42] Miyamoto K, Araki KY, Naka K, Arai F, Takubo K, Yamazaki S, et al. (2007) *Foxo3a is essential for maintenance of the hematopoietic stem cell pool. Cell Stem Cell.* 2007;1:101–112.
- [43] Chen, C., Liu, Y., Liu, R., Ikenoue, T., Guan, K. L., Liu, Y., & Zheng, P. (2008). TSC-mTOR maintains quiescence and function of hematopoietic stem cells by repressing mitochondrial biogenesis and reactive oxygen species. *The Journal of experimental medicine*, 205(10), 2397–2408. <https://doi.org/10.1084/jem.20081297>
- [44] Riley T, Sontag E, Chen P, Levine A. (2008) Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology.* 2008;9:402–412.
- [45] Sallmyr, A., Fan, J., Datta, K., Kim, K. T., Grosu, D., Shapiro, P., Small, D., & Rassool, F. (2008). Internal tandem duplication of FLT3 (FLT3/ITD) induces increased ROS production, DNA damage, and misrepair: implications for poor prognosis in AML. *Blood*, 111(6), 3173–3182. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-05-092510>
- [46] Ozer, H., Armitage, J. O., Bennett, C. L., Crawford, J., Demetri, G. D., Pizzo, P. A., Schiffer, C. A., Smith, T. J., Somlo, G., Wade, J. C., Wade, J. L., 3rd, Winn, R. J., Wozniak, A. J., Somerfield, M. R., & American Society of Clinical Oncology (2000). 2000 update of recommendations for the use of hematopoietic colony-stimulating factors: evidence-based, clinical practice guidelines. *American Society of Clinical Oncology Growth Factors Expert Panel. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 18(20), 3558–3585. <https://doi.org/10.1200/JCO.2000.18.20.3558>

- [47] Monrroy R, Estrada B, & Viveros P (2012) *Leucemia para el médico general*. Revista de La Faculta de Medicina de la UNAM;55(2),11-25.
- [48] Hatem, E., El Banna, N., & Huang, M. E. (2017). Multifaceted Roles of Glutathione and Glutathione-Based Systems in Carcinogenesis and Anticancer Drug Resistance. *Antioxidants & redox signaling*, 27(15), 1217–1234. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7134>
- [49] Kansanen, E., Kuosmanen, S. M., Leinonen, H., & Levonen, A. L. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox biology*, 1(1), 45–49.
- [50] Emadi, Ashkan; Karp, Judith E. (2012). *The clinically relevant pharmacogenomic changes in acute myelogenous leukemia*. Tomo 13, No. 11: 1257-69. DOI:10.2217/pgs.12.102
- [51] Kassogue, Y., Quachouh, M., Dehbi, H. et al. (2014). Effect of interaction of glutathione S-transferases (T1 and M1) on the hematologic and cytogenetic responses in chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib. *Med Oncol* 31, 47. <https://doi-org.ezproxy.javeriana.edu.co/10.1007/s12032-014-0047-z>].
- [52] Herault, O., Hope K. J., Deneault, E., Mayotte, N., Chagraoui, J. Wilhelm, B. T., Cellot, S., Sauvageau, M., Andrade-Navarro, M. A., Hébert J., Sauvageau, G. (2012). A role for GPx3 in activity of normal and leukemia stem cells. *The Journal of experimental medicine*, 209(5), 895-901

- [53] Andersson L et al. (1979). *K562—A human erythroleukemic cell line*. *Int J Cancer*,23(2):143-7.
- [54] Chasis J. & Mohandas N. (1992).Red Blood Cell Glycophorins. *Blood*, Vol80, No8: pp 1869-1879
- [55] Amigorena, S., & Bonnerot, C. (1999). Fc receptor signaling and trafficking: a connection for antigen processing. *Immunological reviews*, 172, 279–284.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-065x.1999.tb01372.x>
- [56] Aguilar H et al. (2004). Caracterización molecular de un nuevo receptor inmune restringido al linaje monocítico. *J Immunol*, 173 (11): 6703-6711
- [57] Zeitlmann, L., Sirim, P., Kremmer, E., Kolanus, W. (2001). Cloning of ACP33 as a novel intracellular ligand of CD4. *J. Biol. Chem* 276: 9123-9132.
- [58] Wei, Y., Lv, H., Shaikh, A. B., Han, W., Hou, H., Zhang, Z., Wang, S., & Shang, P. (2020). Directly targeting glutathione peroxidase 4 may be more effective than disrupting glutathione on ferroptosis-based cancer therapy. *Biochimica et biophysica acta. General subjects*, 1864(4), 129539.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129539>
- [59] Pei, S., Minhajuddin, M., Callahan, K. P., Balys, M., Ashton, J. M., Neering, S. J., Lagadinou, E. D., Corbett, C., Ye, H., Liesveld, J. L., O'Dwyer, K. M., Li, Z., Shi, L., Greninger, P., Settleman, J., Benes, C., Hagen, F. K., Munger, J., Crooks, P. A., Becker, M. W., ... Jordan, C. T. (2013). Targeting aberrant glutathione metabolism to

eradicate human acute myelogenous leukemia cells. *The Journal of biological chemistry*, 288(47), 33542–33558. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.511170>

[60] Karathedath, S., Rajamani, B. M., Musheer Aalam, S. M., Abraham, A., Varatharajan, S., Krishnamurthy, P., Mathews, V., Velayudhan, S. R., & Balasubramanian, P. (2017). Role of NF-E2 related factor 2 (Nrf2) on chemotherapy resistance in acute myeloid leukemia (AML) and the effect of pharmacological inhibition of Nrf2. *PloS one*, 12(5), e0177227. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177227>

[61] Leonardi, D. B., Abbate, M., Riccheri, M. C., Nuñez, M., Alfonso, G., Gueron, G., De Siervi, A., Vazquez, E., & Cotignola, J. (2017). Improving risk stratification of patients with childhood acute lymphoblastic leukemia: Glutathione-S-Transferases polymorphisms are associated with increased risk of relapse. *Oncotarget*, 8(1), 110–117. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.860>

[62] Probst, L., Dächert, J., Schenk, B., & Fulda, S. (2017). Lipoxygenase inhibitors protect acute lymphoblastic leukemia cells from ferroptotic cell death. *Biochemical Pharmacology*, 140, 41–52.

[63] Uruña, C., Cifuentes, C., Castañeda, D., Arango, A., Kaur, P., Asea, A., & Fiorentino, S. (2008). *Petiveria alliacea* extracts uses multiple mechanisms to inhibit growth of human and mouse tumoral cells. *BMC complementary and alternative medicine*, 8, 60. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-8-60>

[64] Hernández, J. F., Uruña, C. P., Sandoval, T. A., Cifuentes, M. C., Formentini, L., Cuezva, J. M., Fiorentino, S. (2017). A cytotoxic *Petiveria alliacea* dry extract induces

ATP depletion and decreases β -F1-ATPase expression in breast cancer cells and promotes survival in tumor-bearing mice. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 27 (3): 306-314

[65] Murillo, N. (2018). Relación entre los niveles intracelulares de ros y la respuesta a los tratamientos in vitro en células tumorales k562 y u937 con los extractos de petiveria alliacea (anamú) y caesalpinia spinosa (p2et) y doxorubicina (Tesis de pregrado). *Pontificia Universidad Javeriana*. Bogotá D.C., Colombia.)

[66] Hernández, J. F., Urueña, C. P., Cifuentes, M. C., Sandoval, T. A., Pombo, L. M., Castañeda, D., Asea, A., & Fiorentino, S. (2014). A Petiveria alliacea standardized fraction induces breast adenocarcinoma cell death by modulating glycolytic metabolism. *Journal of ethnopharmacology*, 153(3), 641–649. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.03.013>

[67] Castañeda, D. M., Pombo, L. M., Urueña, C. P., Hernandez, J. F., & Fiorentino, S. (2012). A gallotannin-rich fraction from Caesalpinia spinosa (Molina) Kuntze displays cytotoxic activity and raises sensitivity to doxorubicin in a leukemia cell line. *BMC complementary and alternative medicine*, 12, 38. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-38>