



**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS EXTRACTOS DE *PETIVERIA ALLIACEA*
(SUPERCRÍTICO) Y *CAESALPINIA SPINOSA* (P2Et) SOBRE LOS NIVELES DE ÓXIDO
NÍTRICO EN LAS LÍNEAS CELULARES LEUCÉMICAS K562 Y Reh**

**JUAN JOSÉ ARÉVALO FERRIN
ESTUDIANTE DE BACTERIOLOGÍA**

**TRABAJO DE GRADO
PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BACTERIÓLOGO**

**VIVIANA MARCELA RODRÍGUEZ PARDO. MSc. PhD
DIRECTORA**

**SANDRA MILENA QUIJANO GÓMEZ. MSc. PhD
CODIRECTORA**

**CINDY MAYERLI ARÉVALO OLAYA. Esp. PhD(c)
ASESORA**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BACTERIOLOGÍA
BOGOTÁ, D.C. COLOMBIA**

2022



**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS EXTRACTOS DE *PETIVERIA ALLIACEA*
(SUPERCRÍTICO) Y *CAESALPINIA SPINOSA* (P2Et) SOBRE LOS NIVELES DE ÓXIDO
NÍTRICO EN LAS LÍNEAS CELULARES LEUCÉMICAS K562 Y Reh**

Juan José Arévalo Ferrin

Estudiante de Bacteriología

Aprobado por:

Viviana Marcela Rodríguez Pardo. MSc. PhD

Directora

Sandra Milena Quijano Gómez. MSc. PhD

Codirectora

Cindy Mayerli Arévalo Olaya. Esp. PhD(c)

Asesora

José Alfredo Iglesias Jiménez. PhD

Par Evaluador

Orlando Bonell Patiño Escobar. MD

Par Evaluador

NOTA DE ADVERTENCIA

ARTÍCULO 23 DE LA RESOLUCIÓN N° 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 mis padres, quienes han sido mi más grande apoyo y motivación en todas mis decisiones a lo largo de mi vida.

A la Dra. Viviana Rodríguez, Dra. Sandra Quijano y a la Dra. Cindy Arévalo por su tiempo, enseñanzas, apoyo y esfuerzo a lo largo del desarrollo de este proyecto, especialmente por haber confiado en mí para ser parte del Grupo de Investigación en Inmunobiología y Biología Celular y por haberme permitido crecer como persona y como profesional.

A mi compañero de trabajo de grado, Alejandro García, por su apoyo y amistad durante la realización de este proyecto.

A mis compañeros del Grupo de Investigación en Inmunobiología y Biología Celular, quienes me apoyaron con su conocimiento durante el desarrollo de este proyecto.

A mi amiga María Fernanda, por todo su apoyo y amistad a lo largo de mi carrera.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	10
INTRODUCCIÓN.....	11
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	13
MARCO TEÓRICO	15
Leucemias Agudas.....	15
Óxido nítrico	17
Extractos SC y P2Et.....	19
Antecedentes sobre extractos obtenidos de plantas y ON.....	20
OBJETIVOS.....	22
Objetivo general	22
Objetivos específicos	22
METODOLOGÍA.....	23
Características generales y mantenimiento en cultivo de la línea celular K562 y Reh ..	23
Evaluación de la viabilidad celular.....	25
Medición de óxido nítrico en las líneas celulares K562 y Reh.....	25
Análisis de los datos de citometría de flujo	28
Análisis estadístico.....	29
RESULTADOS	30
DISCUSIÓN.....	37
CONCLUSIONES	41
RECOMENDACIONES.....	41
REFERENCIAS	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Intensidad media de fluorescencia del ON detectado con la sonda DAF-FM DA en la línea celular K562 después de 12h de exposición a los tratamientos.

Figura 2. Número de células vivas por mL en la línea celular K562 después de 12h de exposición a los tratamientos.

Figura 3. Porcentaje de viabilidad celular medido mediante IP en la línea celular K562 después de 12h de exposición a los tratamientos.

Figura 4. Intensidad media de fluorescencia del ON detectado con la sonda DAF-FM DA en la línea celular Reh. después de 12h de exposición a los tratamientos.

Figura 5. Número de células vivas por mL en la línea celular Reh después de 12h de exposición a los tratamientos.

Figura 6. Porcentaje de viabilidad celular medido mediante IP en la línea celular Reh después de 12h de exposición a los tratamientos.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Factores de riesgo para el desarrollo de Leucemia Aguda.

Tabla 2. Concentraciones de los extractos y quimioterapéuticos.

Tabla 3. Condiciones experimentales del estudio.

LISTA DE IMÁGENES

Imagen 1. Línea celular K562.

Imagen 2. Línea celular Reh.

Imagen 3. Evaluación de la viabilidad celular mediante Azul Tripano.

Imagen 4. Conversión de la sonda DAF-FM DA en un compuesto fluorescente.

ABREVIATURAS

LA: Leucemia aguda

LMA: Leucemia mieloide aguda

LLA: Leucemia linfoide aguda

DNA: Ácido desoxirribonucleico

ON: Óxido nítrico

NOS: Óxido nítrico sintasa

iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible

nNOS: Óxido nítrico sintasa neuronal

eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial

RNS: Especies reactivas de nitrógeno

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SC: Extracto Supercrítico de *Petiveria alliacea*-Anamú

Ara-C: Citarabina

IP: Yoduro de propidio

AT: Azul Tripano

RESUMEN

Las células leucémicas tienen un comportamiento metabólico complejo que se relaciona con su potencial de proliferación, supervivencia, y resistencia tumoral; es así que compuestos como el óxido nítrico se han asociado con la modulación de la apoptosis, regulación de la respuesta inmune, resistencia a la terapia, diferenciación y proliferación celular en células tumorales. En el Grupo de Inmunobiología y Biología Celular (GIBC) de la Pontificia Universidad Javeriana se ha estudiado durante los últimos años la actividad de dos extractos de plantas comúnmente utilizadas en la medicina tradicional, provenientes de (*Caesalpinia spinosa*) y (*Petiveria alliacea*), los cuales han evidenciado tener efectos sobre el metabolismo de células tumorales. En este trabajo se evaluó el efecto de los extractos de *Caesalpinia spinosa* (P2Et) y *Petiveria alliacea* (Supercrítico, SC) solos y en combinación con quimioterapéuticos convencionales sobre la producción de óxido nítrico, proliferación y viabilidad en las líneas celulares leucémicas K562 (origen mieloide) y Reh (origen linfoide). Se demostró que el extracto SC induce un aumento sobre los niveles de óxido nítrico asociado con una importante disminución en la proliferación celular en la línea celular K562, mientras que los niveles de óxido nítrico y proliferación celular no se ven modulados por ningún tratamiento en la línea celular Reh. Este estudio demuestra que el efecto del extracto SC en la modulación de los niveles de óxido nítrico en línea K562, y su relación con la disminución de la proliferación celular podría ser un fenómeno metabólico importante en leucemias mieloides tratadas con este extracto.

Palabras clave: Óxido nítrico, leucemia mieloide aguda, leucemia linfoide aguda, proliferación celular, viabilidad celular.

INTRODUCCIÓN

Las leucemias agudas (LA) son tumores de origen hematopoyético, originados en la médula ósea a partir de la transformación maligna y proliferación de una única célula madre hematopoyética que puede estar comprometida o no hacia linaje mieloide o linfoide, debido principalmente a una serie de eventos mutacionales que ocurren durante el proceso de la hematopoyesis. Como consecuencia de la transformación maligna, se generan clonas y subclonas de células tumorales portadoras de alteraciones genéticas y moleculares, que confieren a las células malignas ventajas de crecimiento, proliferación y expansión, sustituyendo la hematopoyesis normal.

En Colombia, aunque las leucemias no son el tipo de cáncer más representativo, es uno de los tipos de cáncer con mayores tasas de resistencia al tratamiento, recaída de los pacientes y fallo al tratamiento de inducción, para quienes las opciones terapéuticas curativas son limitadas. Como resultado de esto, se han utilizado combinaciones de distintos tratamientos con diferentes blancos terapéuticos; sin embargo, todavía se observa refractariedad/resistencia a la terapia, fracaso en la fase de inducción y bajas tasas de supervivencia.

En el Grupo de Inmunobiología y Biología Celular (GIBC) de la Pontificia Universidad Javeriana se ha estudiado durante los últimos años la actividad anti-tumoral in vitro e in vivo de dos extractos de plantas comúnmente utilizadas en la medicina tradicional, provenientes de (*Caesalpinia spinosa*) de la cual se obtuvo el extracto P2Et y (*Petiveria alliacea*) de la cual se logró obtener el extracto supercrítico (SC), los cuales han evidenciado tener efectos antitumorales, antiproliferativos, antioxidantes en diferentes modelos tumorales. Dentro de la biología de las células leucémicas se ha descrito en los últimos años el papel dual que puede desempeñar el óxido nítrico, ya sea pro-tumoral o anti-tumoral, dependiendo principalmente de la concentración, su célula de origen, el estadio del tumor y el microambiente tumoral, aunque en términos generales puede regular la diferenciación celular, la proliferación celular, la respuesta inmune antitumoral y la inducción de muerte celular.

En el presente trabajo experimental se evaluó el efecto de los extractos SC, P2Et, los quimioterapéuticos Idarrubicina, Citarabina, Doxorubicina, Vincristina y Metotrexato y las combinaciones de los extractos con los quimioterapéuticos sobre los niveles de óxido nítrico, la proliferación y la viabilidad celular en la línea celular leucémica mieloide K562 y

en la línea celular leucémica linfoide Reh. Se encontró que el extracto SC induce un aumento sobre los niveles de óxido nítrico asociado a una importante disminución en la proliferación celular en la línea celular K562, mientras que los niveles de óxido nítrico no se ven modulados por ningún tratamiento en la línea celular Reh, aunque ambos extractos y los quimioterapéuticos disminuyeron de manera muy importante la proliferación celular.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad en las Américas y en el mundo, por lo que se considera un importante problema de salud pública. Se estima que para el año 2020 se produjeron 19,3 millones de casos nuevos y aproximadamente 10,1 millones de fallecimientos a nivel mundial (1). En Colombia, aunque las leucemias no son el tipo de cáncer más frecuente en población adulta, entre el 2 de enero de 2019 y el 1 de enero de 2020 se reportaron 2.547 casos de leucemia aguda y 413 fallecimientos asociados a esta enfermedad (2).

La resistencia al tratamiento quimioterapéutico sigue siendo la principal causa de progresión y muerte en los pacientes. Si bien entre un 60 y 80 % de los pacientes con leucemia aguda logran una remisión completa (3), la mayoría presentan recaídas y aproximadamente entre el 30 y el 50 % de los pacientes en Colombia no responden al tratamiento de inducción (4, 5), para los cuales las opciones terapéuticas curativas son limitadas. Como resultado de esto, se han utilizado combinaciones de distintos tratamientos con diferentes blancos terapéuticos; sin embargo, todavía se observa refractariedad/resistencia a la terapia, fracaso en la fase de inducción y bajas tasas de supervivencia. Además, el panorama para los pacientes pediátricos y adultos mayores en Colombia es mucho más desalentador, en los cuales las tasas de supervivencia a cinco años pueden llegar tan solo a un 53,5 % en pacientes pediátricos con leucemia mieloide aguda (6) y 68,3 % en pacientes pediátricos con leucemia linfoide aguda (7), y en el caso de los adultos mayores la tasa de supervivencia a un año llega tan solo a un 22,8 % (8), debido a que las terapias con fines curativos son usualmente aplicadas a pacientes con buen estado general y menores de 60 años (9).

Una de las causas de la resistencia de los tumores a la terapia actual es la reprogramación metabólica, la cual consiste en rutas y vías metabólicas convencionales cuya actividad se encuentra aumentada, disminuida o suprimida en células tumorales en comparación con tejidos benignos como consecuencia de mutaciones tumorigénicas y/u otros factores (10). Las actividades metabólicas reprogramadas que apoyan la supervivencia de las células tumorales en condiciones de estrés se relacionan con rutas bioenergéticas alteradas, biosíntesis mejorada y el fortalecimiento de los sistemas de equilibrio redox. Estas alteraciones metabólicas pueden derivar en un incremento en la producción de óxido nítrico, el cual en concentraciones elevadas puede presentar actividad pro-tumoral mediante la

formación de especies reactivas de nitrógeno que participan en la nitrosilación de proteínas que produzcan estrés nitrosativo y genotóxico que puedan favorecer procesos de mutagénesis, evasión y supresión de la respuesta inmune, evasión de la apoptosis mediante regulación positiva de genes anti-apoptóticos, activación de factores de transcripción que inducen transición de las células hacia un fenotipo maligno, entre otros (11).

Con este trabajo se busca aportar evidencia acerca del efecto de los extractos de *Petiveria alliacea* (SC) y *Caesalpinia spinosa* (P2Et) sobre la modulación de los niveles de óxido nítrico en líneas celulares leucémicas K562 y Reh (12), dado que resultados preliminares del Grupo de Inmunobiología y Biología Celular de la Pontificia Universidad Javeriana (GIBC) (datos no publicados), indican que estos extractos podrían modular los niveles de óxido nítrico en células leucémicas. El óxido nítrico, en concentraciones elevadas puede presentar actividad pro-tumoral (11) y se ha asociado con resistencia al tratamiento con quimioterapéuticos y por consiguiente con falla terapéutica. Dentro de los mecanismos descritos en la resistencia a quimioterapéuticos en células tumorales, se encuentra la modulación de la expresión de integrinas que regulan positivamente la actividad de la proteína quinasa B (AKT) y que además pueden incrementar la proliferación y migración tumoral (13, 14), por lo tanto, si los extractos modulan los niveles de óxido nítrico en células leucémicas estos podrían representar una alternativa al tratamiento convencional al emplearlos como coadyuvantes terapéuticos.

MARCO TEÓRICO

Leucemias Agudas

Las leucemias agudas (LA) son tumores de origen hematopoyético, originados en la médula ósea a partir de la transformación maligna y proliferación de una única célula madre hematopoyética que puede estar comprometida o no hacia linaje mieloide o linfoide, debido principalmente a una serie de eventos mutacionales que ocurren durante el proceso de la hematopoyesis. Como consecuencia de la transformación maligna, se generan clonas y subclonas de células tumorales portadoras de alteraciones genéticas y moleculares, que confieren a las células malignas ventajas de crecimiento, proliferación y expansión, sustituyendo la hematopoyesis normal (15).

El proceso de leucemogénesis requiere la susceptibilidad de células progenitoras hematopoyéticas hacia agentes inductores, como por ejemplo mutaciones, infecciones, compuestos químicos, entre otros (16). Sin embargo y a pesar de que se han identificado múltiples factores de riesgo que pueden favorecer el desarrollo de LA, la presencia de estos no implica que necesariamente se desarrollará la enfermedad y en la mayoría de los casos no es posible identificar su causa o su asociación con algún factor de riesgo (16). Algunos de los factores de riesgo identificados se enlistan a continuación (16, 17):

<i>Tabla 1. Factores de riesgo para el desarrollo de Leucemia Aguda</i>
Edad temprana (<5 años) o edad avanzada (60< años)
Género masculino
Estrés mutagénico o genotóxico
Exposición a radiación ionizante
Exposición a compuestos químicos: Benceno, Insecticidas, Hidrocarburos
Fumadores, especialmente después de los 60 años
Antecedentes de enfermedades hematológicas
Presencia de enfermedades raras y congénitas: Anemia de Fanconi, Síndrome mielodisplásico hereditario, Síndrome de Down, entre otras.

Las alteraciones genéticas son de los principales factores de riesgo y pronóstico en el desarrollo y progresión de las LA. Las anomalías genéticas adquiridas o somáticas están presentes en el 50-80% de los casos de LA, donde las alteraciones con mayor prevalencia

son la delección de los cromosomas 5, 7, Y y 9, además de traslocaciones como t(8;21)(q22;q22),t(15;17)(q22;q11), trisomías en los cromosomas 8 y 21 y otras anomalías en los cromosomas 16, 9 y 11 (16). Algunas alteraciones genéticas se asocian a otras enfermedades genéticas: Por ejemplo, los pacientes diagnosticados con síndrome de Down, caracterizado por la presencia de trisomía en el cromosoma 21, poseen un riesgo hasta 500 veces mayor de desarrollar LA comparado con pacientes que no son portadores de la trisomía (18). Otras enfermedades genéticas asociadas al desarrollo de LA son síndrome de Klinefelter, anemia de Fanconi y neurofibromatosis (16).

Adicionalmente, se ha descrito el papel que pueden tener algunos virus, en particular los virus de tipo retrovirus RNA en el desarrollo y/o progresión de las LA. Por ejemplo, la leucemia de células T es causada por el virus de la leucemia de células T humanas tipo 1 (HTLV-1), el cual posee una elevada capacidad oncogénica y aunque la mayoría de los afectados permanecerán asintomáticos, se estima que entre 1-5% de los infectados desarrollará leucemia de células T como consecuencia de la infección (19, 20). Por otra parte, la infección por el parvovirus B19 se ha asociado a la progresión de pacientes diagnosticados con LA, mediante el desarrollo de aplasia medular asociada a la infección directa y consiguiente apoptosis de eritroblastos (21), lo cual puede producir complicaciones en su pronóstico clínico.

Por otro lado, previamente se ha descrito que la exposición a compuestos a ciertos compuestos químicos con propiedades cancerígenas o la exposición tanto ocupacional como espontánea a radiación ionizante puede favorecer el desarrollo de LA. El benceno es un compuesto altamente carcinógeno y ejerce su efecto principalmente mediante la inhibición de enzimas implicadas en la reparación del DNA, como las topoisomerasas, lo que favorece procesos de mutagénesis y estrés genotóxico (22, 23).

Una vez establecida la enfermedad y dependiendo del grado de infiltración tumoral en la médula ósea, los pacientes desde el punto de vista clínico cursan con citopenias progresivas incluyendo anemia, neutropenia con infecciones recurrentes, así como trombocitopenia o inclusive pancitopenia. Sin embargo, es una enfermedad heterogénea en términos de presentación clínica y patológica, varía de acuerdo con la etapa de manifestación temprana o tardía, el estado inmunológico del paciente, el linaje celular afectado, la presencia de infiltración extramedular a distancia, la resistencia al tratamiento convencional, entre otros factores.

El diagnóstico de LA se realiza al detectar la presencia de blastos, ya sean mieloides o linfoides, en sangre periférica y/o médula ósea, o identificando la presencia de anomalías genéticas características de la enfermedad en la médula ósea, independientemente del recuento de blastos (24). A partir de las características inmunofenotípicas y citogenéticas de los blastos se realiza la identificación del linaje celular afectado, aunque los principales linajes afectados en la leucemogénesis son el linaje mielóide y linfóide, derivando en el desarrollo de Leucemia Mielóide Aguda (LMA) y Leucemia Linfocítica Aguda (LLA), respectivamente.

Óxido nítrico

Dentro de los mecanismos biológicos implicados en la resistencia de las células tumorales a la terapia convencional se encuentran las alteraciones metabólicas, las cuales a su vez pueden derivar en el incremento en la producción de óxido nítrico (ON) y de especies reactivas de nitrógeno (RNS).

El ON, también denominado monóxido de nitrógeno, es una molécula de señalización de tamaño pequeño y de vida corta que se encuentra involucrada en diferentes procesos tanto fisiológicos (angiogénesis, tonicidad del músculo liso, modulación de la inflamación, respuesta inmune, apoptosis y comunicación sináptica (25)) como patológicos, entre ellos la tumorigénesis (11). Presenta difusión libre a través de la membrana celular y no requiere la presencia de algún receptor o proteína de transporte específica para su movilización, por lo que puede actuar de manera autónoma sobre las células y puede actuar en blancos celulares distantes de su célula de origen (26).

Es producido de manera endógena por acción de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), la cual realiza la conversión de L-Arginina y O_2 en L-Citrulina y ON. La enzima NOS posee 3 isoformas: NOS1 o nNOS neuronal, NOS2 o iNOS inducible y NOS3 o eNOS endotelial. Las diferencias entre sus isoformas radican principalmente en su distribución a nivel tisular, mecanismos moduladores y la concentración de ON que pueden llegar a producir. Las isoformas nNOS y eNOS son isoformas constitutivas, están moduladas por la concentración de calcio presente y producen menor cantidad de ON a comparación de la iNOS, mientras que la iNOS es independiente de la concentración de calcio y es modulada de forma transcripcional por estímulos como citoquinas proinflamatorias, como las producidas en la respuesta inmune antitumoral, y condiciones de hipoxia (11).

Los efectos biológicos del ON son dados principalmente por su interacción con otro tipo de moléculas en vez de ejercer su efecto directamente. Por ejemplo, puede reaccionar con el anión superóxido para formar anión peroxinitrito, el cual es altamente tóxico y es un potente oxidante de diferentes moléculas como lípidos y proteínas, además previamente ha sido descrito como agente inductor de apoptosis mediante la activación indirecta de caspasas-3 en las líneas celulares leucémicas HL60 y U937 (27).

Adicionalmente, el ON puede reaccionar con otras moléculas como O₂ molecular para formar óxidos de nitrógeno (dióxido de nitrógeno NO₂), nitrato NO₃⁻ y trióxido de dinitrógeno N₂O₃. En conjunto, todas estas moléculas se denominan Especies Reactivas de Nitrógeno (RNS), las cuales pueden interactuar con otras moléculas como blancos proteicos e inducir modificaciones postraduccionales como S-nitrosilaciones de residuos de cisteína o C-nitración de residuos de tirosina. Estas modificaciones pueden alterar la actividad de las proteínas y/o su localización intracelular, lo cual puede favorecer procesos de mutagénesis y de establecimiento y desarrollo tumoral (28).

Las RNS también pueden reaccionar con otras moléculas diferentes de proteínas, como los ácidos nucleicos. A modo de ejemplo, el trióxido de dinitrógeno puede dañar directamente el DNA celular por cambios de Citosina a Timina, llevando a la mutagénesis del DNA, favoreciendo la inestabilidad genómica, la supervivencia, la señalización del crecimiento y la motilidad tumoral. También, otras RNS como el dióxido de nitrógeno pueden modificar lípidos insaturados llevando a la formación de nitrolípidos, los cuales pueden tener funciones de modulación metabólica y estar involucrados en vías de señalización inflamatorias que afectan la respuesta inmune antitumoral (29).

Se ha demostrado que el ON tiene actividad dual, tanto pro-tumoral como anti-tumoral. Se han realizado diferentes estudios empleando tanto inhibidores como donadores de ON e inductores de la producción de ON, los cuales concluyen principalmente que la concentración de ON producida, la célula de origen, el estadio del tumor, la naturaleza y características intrínsecas tumorales como el microambiente tumoral son factores que pueden influir en el rol pro-tumoral o anti-tumoral del ON (11).

Particularmente, se ha evidenciado que la inhibición de la síntesis y los niveles bajos de ON tienen un importante efecto para bloquear la producción de la molécula VEGF endotelial y por lo tanto el proceso de angiogénesis asociada a tumores, estimulación del sistema inmune para combatir el tumor y sensibilidad a los quimioterapéuticos; mientras que la

inducción de la producción y los niveles elevados de ON puede favorecer proliferación celular, inhibición de la apoptosis y resistencia a los quimioterapéuticos. Es importante resaltar, que todos estos efectos son dependientes de la concentración de ON, las condiciones del nicho tumoral y posiblemente de otras variables biológicas propias del individuo afectado. Además, previamente se ha evidenciado que medicamentos liberadores de ON y donadores de ON presentan una acción citostática contra células hematopoyéticas tanto malignas como benignas, por lo que la exposición de células leucémicas frente al ON, ya sea de origen exógeno (Donadores) o endógeno mediante la inducción de iNOS en las células tumorales, podría disminuir su proliferación e inducir su diferenciación (27).

Extractos SC y P2Et

En el Grupo de Inmunobiología y Biología Celular (GIBC) de la Pontificia Universidad Javeriana se ha estudiado durante los últimos años la actividad anti-tumoral in vitro e in vivo de dos extractos de plantas comúnmente utilizadas en la medicina tradicional, provenientes de (*Caesalpinia spinosa*) de la cual se obtuvo el extracto P2Et y (*Petiveria alliacea*) de la cual se logró obtener el extracto supercrítico (SC), los cuales han evidenciado tener un efecto en la modulación de las especies reactivas de oxígeno y sobre la expresión de iNOS en diferentes modelos tumorales (30).

El extracto SC es obtenido de la planta *Petiveria alliacea*, comúnmente denominada Anamú, pertenece a la familia *Petiveriaceae* y es originaria de Norteamérica, Centroamérica y la zona tropical de Suramérica. Tradicionalmente, su infusión ha sido empleada como antiespasmódico, antiinflamatorio, analgésico y diurético. El extracto SC es obtenido de las hojas del Anamú y presenta algunos compuestos de azufre como sulfuro de dibencilo y tribencilo, esteroides, triterpenos y polifenoles como los flavonoides dentro de sus compuestos principales (31). Este extracto ha evidenciado actividad citotóxica en diferentes líneas de células tumorales como la línea celular leucémica empleada en este estudio (K562), melanoma humano (A375), melanoma murino (Mel-Rel) y en modelos animales de cáncer de mama (32). Entre los mecanismos involucrados, se encuentra la regulación tanto negativa como positiva de las proteínas involucradas en el metabolismo, relacionadas con la disminución de la glucólisis y la respiración mitocondrial y la alteración de la expresión de la β F1 ATPasa mitocondrial, y la reducción en la producción de ATP y lactato. Además, presenta actividad inmunomoduladora sobre células dendríticas, las cuales pueden producir moléculas que favorecen la señalización intracelular y la supervivencia tumoral (33).

Por otra parte, *Caesalpinia spinosa*, comúnmente denominada Dividivi o Tara, es una leguminosa arbustiva encontrada principalmente en la parte norte de Sudamérica que tradicionalmente es empleada como analgésico, antiinflamatorio, astringente y antipirético. El extracto etanólico obtenido de los frutos de esta planta se denomina P2Et, el cual se caracteriza por estar enriquecido en polifenoles y taninos hidrolizables derivados del ácido gálico como el galato de etilo y el galato de metilo, los cuales han presentado cambios morfológicos y efectos citotóxicos en diferentes células tumorales humanas, incluyendo líneas celulares de leucemia, melanoma y cáncer de mama resistentes o sensibles a quimioterapia y actividad antitumoral in vivo en modelos de melanoma y cáncer de mama.

Algunos de los mecanismos de acción por los cuales este extracto tiene un efecto sobre células tumorales son inducción de la despolarización de la membrana mitocondrial, la activación de la apoptosis por caspasas-3, apoptosis dependiente del Ca^{++} intracelular (34), condensación de la cromatina, disminución de la clonogenicidad en la línea tumoral K562 y se ha reportado mayor sensibilidad a otros quimioterapéuticos como Doxorrubicina cuando se realiza el pretratamiento de las células con el extracto P2Et (34). Además, se ha encontrado que modula la producción de citoquinas por parte de las células tumorales y se ha evidenciado que regula negativamente la expresión de iNOS sobre un modelo de células mieloides supresoras (12), lo que podría regular el microambiente tumoral y la respuesta inmune antitumoral (35).

Por otro lado, y de manera muy relevante para el uso in vivo del compuesto, se ha evidenciado que el extracto no presenta actividad citotóxica en fibroblastos humanos ni en fibroblastos inmortalizados (3T3), ni en otras líneas celulares no tumorales (36). Adicionalmente se ha observado que el tratamiento de la línea celular tumoral de cáncer de mama 4T1 con el extracto disminuye la expresión de la enzima LDHa, el consumo de glucosa, la producción de lactato, los niveles de ATP intracelulares, el consumo de oxígeno y la expresión de la enzima β -F1-ATPasa, evidenciando las alteraciones metabólicas producidas sobre esta línea celular (37).

Antecedentes sobre extractos obtenidos de plantas y ON

Previamente se ha demostrado en diferentes estudios la actividad moduladora y dual de diferentes extractos obtenidos de plantas sobre los niveles de óxido nítrico en diferentes líneas celulares tumorales. Por ejemplo, el extracto crudo obtenido de la planta *Annona muricata* (Guanábana), el cual es enriquecido en acetogeninas, ha evidenciado actividad

anti-tumoral, citotoxicidad, disminución de la proliferación celular y disminución de los niveles de óxido nítrico en la línea celular de cáncer de seno 4T1 (38).

De forma similar, el extracto metanólico obtenido de las hojas de la planta *Morus alba* (Morera), el cual entre sus compuestos contiene epicatequinas, miricetinas, hidratos de quercetina, ácido gálico y kaempferoles, ha presentado actividad anti-proliferativa, citotóxica e inducción de apoptosis en líneas celulares de cáncer de colon humano (HCT-15) y de cáncer de seno (MCF-7), evidenciándose cambios morfológicos en las células, fragmentación del DNA y activación de caspasas-3, adicionalmente presentándose una disminución en los niveles de óxido nítrico asociado con una disminución de la activación de iNOS (39).

Por otro lado, otros compuestos como el lignano AP9-cd, derivado de *Cedrus deodara* (Cedro del Himalaya) y compuesto principalmente de matairesinol y dibencil butirolactol, ha evidenciado inhibición de la proliferación celular, inducción de muerte celular por apoptosis, formación de cuerpos apoptóticos, activación de caspasas, fraccionamiento del DNA y aumento constante en la producción de ON que deriva en disminución del potencial de membrana mitocondrial en las líneas celulares leucémicas MOLT-4 y HL-60 (40).

De manera contraria, previamente Kellner et al evidenciaron un incremento significativo en la producción de ON en las líneas celulares leucémicas SEM, RS4;11, Reh y CEM después de la exposición a los antioxidantes fenólicos Curcumina, Carnosol y Quercetina (Flavonoide). Además, evidenciaron que la inhibición de NOS incrementó el porcentaje de células con despolarización de membrana mitocondrial después del tratamiento con los antioxidantes, por lo que postulan que el ON podría estar protegiendo contra la despolarización de membrana mitocondrial inducida por antioxidantes (41).

De manera similar, Martino et al evidenciaron que la Quercetina-3 Metil Éter presente en el extracto de la planta *Larrea divaricata* aumento significativamente la producción endógena de ON sobre la línea celular de linfoma EL-4 T, disminuyó la proliferación celular, disminuyó el potencial de membrana mitocondrial y activó las caspasas-3 y caspasas-9, induciendo apoptosis intrínseca en las células (42).

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto de los extractos de *Petiveria alliacea* (SC) y *Caesalpinia spinosa* (P2Et), solos y en combinación con quimioterapia convencional, sobre los niveles de ON en las líneas celulares leucémicas K562 y Reh.

Objetivos específicos

1. Determinar los niveles basales de ON en las líneas celulares leucémicas K562 y Reh.
2. Establecer los niveles de ON en las líneas celulares leucémicas K562 y Reh expuestas a los extractos de *Petiveria alliacea* (SC) y *Caesalpinia spinosa* (P2Et).
3. Evaluar los niveles de ON en las líneas celulares leucémicas K562 y Reh expuestas a los extractos de *Petiveria alliacea* (SC) y *Caesalpinia spinosa* (P2Et) en combinación con quimioterapéuticos convencionales.

METODOLOGÍA

En este estudio se emplearon líneas celulares establecidas de leucemia mieloide y linfóide humana: leucemia mieloide crónica en crisis blástica eritroide (línea K562) y leucemia linfóide aguda (línea Reh), obtenidas de la *American Type Culture Collection* (ATCC).

Características generales y mantenimiento en cultivo de la línea celular K562 y Reh

La línea celular K562 se caracteriza por un crecimiento independiente de anclaje (crecimiento en suspensión o células no adherentes), morfológicamente corresponden a blastos y fenotípicamente corresponden a mieloblastos (CD45+, CD34+, CD33+, CD13+, CD117+, CD15+) (ATCC CCL-243) (30). Además, presentan el oncogén BCR-ABL (Cromosoma Filadelfia), el cual previamente ha sido asociado con inducción de apoptosis por parte del ON en células de leucemia mieloide (43). En la imagen 1 se presenta la morfología de las células K562:

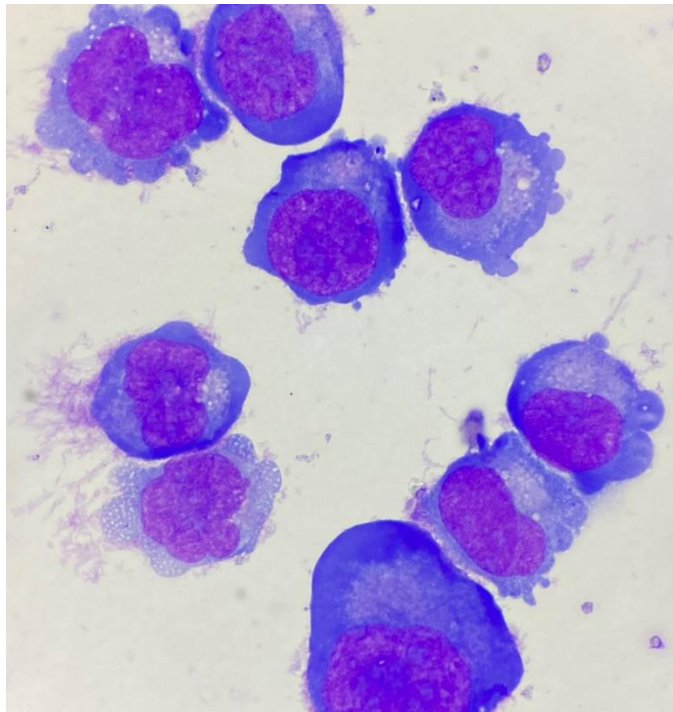


Imagen 1. Línea celular K562. Se observa morfología blástica, presencia de nucléolos y vacuolas en su citoplasma. Registro fotográfico obtenido con Cytospin (Coloración Wright, Microscopio Olympus objetivo x100)

La línea celular Reh se caracteriza por crecimiento en suspensión, morfológicamente también corresponden a blastos y desde el punto de vista inmunofenotípico corresponden a linfoblastos B (CD10+, CD19 +/-, CD33 +/-, CD45+, CD34-, CD38 +/-, CD2-, CD117-, CD20 +/-) (ATCC CRL-8286) (Arévalo C, 2021. Datos no publicados). En la imagen 2 se presenta la morfología de las células Reh.

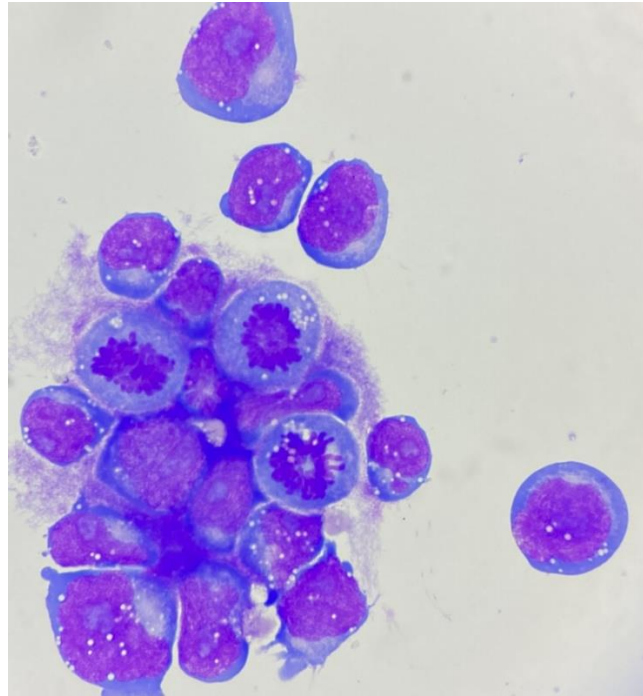


Imagen 2. Línea celular Reh. Se observa morfología blástica, presencia de algunos nucléolos y abundantes vacuolas. Registro fotográfico obtenido con Cytospin (Coloración Wright, Microscopio Olympus objetivo x100)

Las dos líneas celulares (K562 y Reh) se mantuvieron en cultivo en suspensión en cajas T25 y T75, medio RPMI 1640 EURO BIO suplementado con L-glutamina (2 mM), HEPES (10 mM), piruvato de sodio (1mM), Suero Fetal Bovino (SFB) (10 %-K562, 15 %-Reh) y Penicilina/estreptomicina (1 %), en incubadora a 37°C y 5 % de CO₂.

Los cultivos se mantuvieron mediante el pase de las células aproximadamente cada 2-3 días para la línea celular K562 y cada 3-4 días para la línea celular Reh, para esto se lavaron las células 5 minutos a 1800 r.p.m. y se resuspendieron con 4 ml de medio RPMI 1640 suplementado, posteriormente se evaluó la viabilidad celular con el uso del colorante Azul Tripano (0.4%) y se llevaron nuevamente a cultivo una densidad de siembra de 200.000 células/ml en flask T25 y 100.000 células/ml en flask T75 a 37°C, 5% CO₂. Todos los

experimentos se realizaron en el pase #2 para la línea celular K562 y en el pase #3 para la línea celular Reh.

Evaluación de la viabilidad celular

Para todos los ensayos se determinó la viabilidad de las líneas celulares por medio del uso del colorante de viabilidad Azul Tripano (0,4 %) en cámara de Neubauer mediante microscopía óptica y realizando una dilución $\frac{1}{2}$ de AT y células. Este colorante permite diferenciar células vivas (excluyen el colorante por la integridad de su membrana) de las no viables (absorben el colorante y se tiñen de color azul).

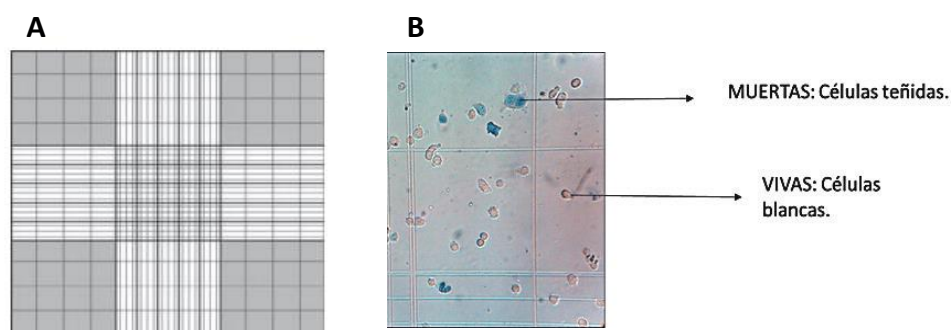


Imagen 3. Evaluación de la viabilidad celular mediante Azul Tripano (0.4%). (A) Representación cuadrícula de lectura celular de cámara de Neubauer (B) células vivas (refringentes) y células muertas (azules).

Adicionalmente, se determinó la viabilidad celular con el uso de la tinción con yoduro de propidio 1 mg/mL mediante citometría de flujo, realizando la marcación con IP inmediatamente antes de realizar la lectura en el citómetro y a una concentración de 1 mg/mL. El yoduro de propidio penetra solamente en las células que han perdido la integridad de su membrana plasmática y nuclear, intercalándose posteriormente entre las bases del ADN, permitiendo así diferenciar entre células vivas y muertas. Todos los ensayos se realizaron con una viabilidad superior al 90% en las líneas celulares.

Medición de óxido nítrico en las líneas celulares K562 y Reh

La sonda empleada en este estudio para la medición de ON fue 4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Difluorofluorescein Diacetate (DAF-FM DA); esta sonda es un compuesto no fluorescente y permeable a la membrana celular que es internalizada en la célula mediante difusión pasiva. Una vez dentro de la célula, la estructura es deacetilada por acción de las esterasas intracelulares para convertirse en 4-Amino-5-Methylamino-2',7'-

Difluorofluorescein (DAF-FM) y una vez reacciona con el ON forma un benzotriazol fluorescente, que puede cuantificarse mediante citometría de flujo (44).

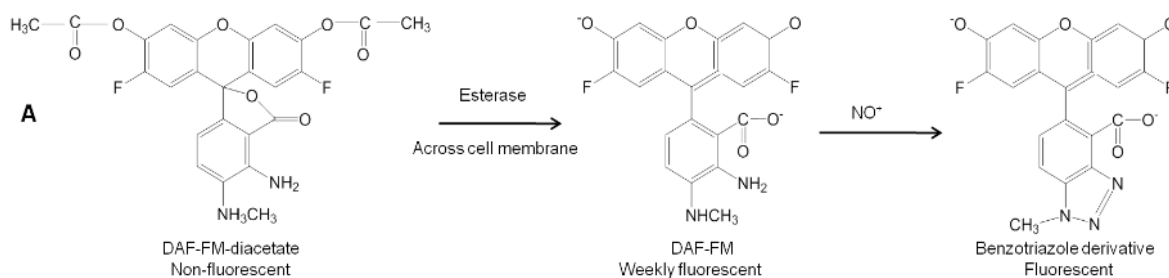


Imagen 4. Conversión de la sonda DAF-FM DA en un compuesto fluorescente (44).

En concordancia con el objetivo general de este proyecto, se incluyeron los extractos de *Petiveria alliacea* (SC) y *Caesalpinia spinosa* (P2Et), así como quimioterapéuticos que convencionalmente se usan para el tratamiento de leucemias mieloides y linfoides (Metotrexato, Vincristina, Doxorubicina, Idarrubicina y Citarabina) según las concentraciones descritas en la tabla 1 (Arévalo C, 2021. Datos no publicados). Las condiciones experimentales realizadas se describen en la tabla 2.

Tabla 2. Concentraciones de los extractos y quimioterapéuticos

Extracto/Quimioterapéutico	Concentración línea celular Reh	Concentración línea celular K562
IC ₅₀ P2Et	254 µg/ml	178 µg/ml
IC ₅₀ SC	54 µg/ml	294 µg/ml
IC ₅₀ Metotrexato	13 µM	-
IC ₅₀ Vincristina	10 nM	-
IC ₅₀ Doxorubicina	60 nM	-
IC ₅₀ Idarrubicina	-	0,13 µM
Citarabina	-	2 mM

Tabla 3. Condiciones experimentales del estudio.

Tratamientos	
K562	Reh
Idarrubicina	Doxorrubicina
	Vincristina
Citarabina	Metotrexato
	SC
SC	P2Et
	SC+Doxorrubicina
P2Et	SC+Vincristina
	SC+Metotrexato
SC+Idarrubicina	P2Et+Doxorrubicina
SC+Citarabina	P2Et+Vincristina
P2Et+Idarrubicina	P2Et+Metotrexato
P2Et+Citarabina	

La medición de ON en ambas líneas celulares se realizó de acuerdo con el siguiente protocolo (Arévalo C, 2021. Datos no publicados):

1. Sembrar 150.000 células por pozo en placas de 24 pozos, en 1 mL de medio RPMI 1640 EUROBIO Suplementado.
2. Agregar los tratamientos de acuerdo con las concentraciones establecidas en la tabla 1 y con las condiciones experimentales establecidas en la tabla 2 e incubar durante 12h.
3. Cumplido el tiempo, mezclar y recoger las células y transferir el contenido de cada pozo a tubos de citometría previamente marcados.
4. Centrifugar a 2000 r.p.m por 5 minutos, descartar el sobrenadante, resuspender, añadir 1 mL de PBS 1X y realizar el recuento celular y viabilidad por AT de cada uno

de los tubos. Si es necesario, ajustar el volumen de cada tubo a la densidad celular establecida para la marcación con la sonda (150.000 células).

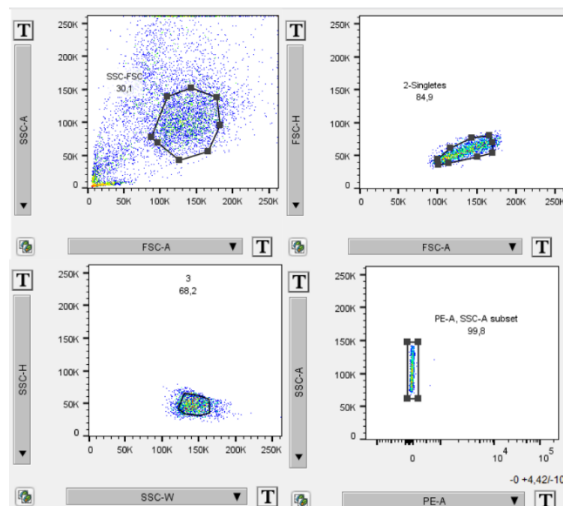
5. Centrifugar a 2000 r.p.m por 5 minutos, descartar el sobrenadante y resuspender.
6. Realizar la marcación con la sonda DAF-FM en medio RPMI sin rojo fenol a una concentración 2,5 μM , incubar durante 30 minutos a 37°C en oscuridad.
7. Agregar 500 μL de PBS 1X frio, centrifugar a 2000 r.p.m por 5 minutos, descartar el sobrenadante y añadir 1 mL de PBS 1X.
8. Centrifugar a 2000 r.p.m por 5 minutos y descartar el sobrenadante.
9. Agregar IP en un volumen final de 400 μL antes de realizar la lectura en el citómetro (1 μL por cada 1 mL de PBS 1X).
10. Realizar la lectura de los tubos en el citómetro, almacenando la información de aproximadamente 20.000 eventos.

Los datos se recolectaron en el citómetro de flujo FACSAria II (BDB), empleando el programa informático FACSDiva v.6.1.3 (BDB) y almacenando la información de aproximadamente 20.000 eventos totales. En ambas líneas celulares se realizaron mediciones en 3 experimentos independientes, montados por duplicado de tratamientos con el fin de obtener 6 datos por cada tratamiento.

Análisis de los datos de citometría de flujo

Para realizar el análisis de los datos obtenidos por citometría de flujo, se siguió el siguiente protocolo (Arévalo C, 2021. Datos no publicados):

1. Usando el software FlowJo, realizar las siguientes ventanas electrónicas sobre las células no marcadas:



2. Trazar la población de células SSC-A vs FSC-A.
3. Establecer la población de células individuales FSC-H vs FSC-A.
4. Trazar la población de células SSC-H vs SSC-W.
5. Seleccionar histograma FITC-A DAF-FM.
6. Copiar las configuraciones realizadas en ALL SAMPLES para aplicarlas a todos los tubos a analizar y verificar que todas las poblaciones se ubiquen dentro de las ventanas.
7. Crear un Layout y copiar el histograma de DAF-FM de las células no marcadas.
8. Copiar los histogramas de cada uno de los tratamientos, vehículos y controles, para sobreponerlos sobre el histograma de DAF-FM de las células no marcadas.
9. Seleccionar sobre la tabla al lado derecho y se escoge la opción de sumatoria y luego la media geométrica de DAF-FM FITC-A, adicionar y aplicar. Automáticamente, se determina la Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) en las células vivas de cada tratamiento.
10. Crear una tabla dentro del programa, añadir la estadística de IMF FITC-A DAF-FM y exportar los datos obtenidos a un archivo de Excel.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se realizó la prueba de normalidad Shapiro-Wilk en el programa IBM SPSS Statistics para todos los datos obtenidos, con el fin de poder establecer el tipo de prueba estadística requerida para analizar los datos. Para poder establecer si existían diferencias significativas en los valores de óxido nítrico entre las diferentes variables de interés y dado que los datos no presentaban una distribución normal, se realizó la prueba no paramétrica de Wilcoxon, con un nivel de significancia del 0.05.

RESULTADOS

El tratamiento con el extracto SC induce un aumento sobre los niveles de ON en la línea celular K562 independiente de su combinación con quimioterapéuticos convencionales

De acuerdo la descripción metodológica, la línea K562 fue tratada con los extractos SC y P2Et y la producción de ON fue determinada con el uso de la sonda DAF-FM DA mediante citometría de flujo. Se observó que el extracto SC incrementa los niveles de ON en comparación con los niveles basales ($*p \leq 0.05$) y la combinación del extracto con algunos de los quimioterapéuticos convencionales usados en leucemias mieloides (Idarrubicina y Ara-C) no modifican este efecto ($p \geq 0.05$) (Figura 1).

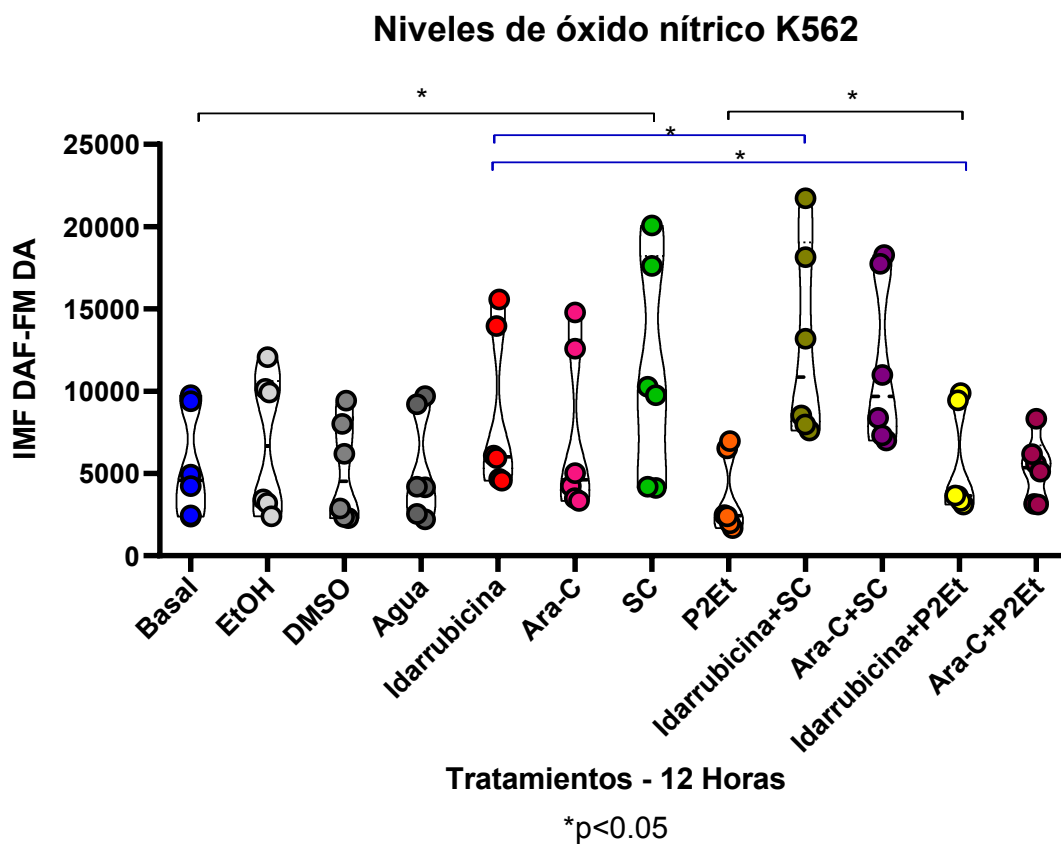


Figura 1. IMF del ON detectado con la sonda DAF-FM DA en la línea celular K562 después de 12h de exposición a los tratamientos. Se presentan las IMF de los tratamientos y sus respectivos vehículos.

Con respecto al tratamiento de las células K562 solo con Idarrubicina y en combinación con SC, se observó una tendencia al aumento en la producción de ON cuando el quimioterapéutico se combinó con SC en comparación al uso de la Idarrubicina sola (* $p \leq 0.05$), este efecto fue similar con el uso de Ara-C (* $p \leq 0.05$),

Por otro lado, el tratamiento con P2Et muestra una tendencia a disminuir los niveles de ON respecto a los niveles basales, aunque no se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p \geq 0.05$). La combinación de P2Et e Idarrubicina posee un aumento estadísticamente significativo frente al tratamiento con P2Et, por lo que el P2Et podría estar restando la tendencia al aumento de ON que presenta el tratamiento con Idarrubicina. De manera similar, la combinación de Ara-C+P2Et muestra una tendencia al aumento de ON comparado con el tratamiento con P2Et, por lo que este aumento parece ser dependiente de los quimioterapéuticos y no del extracto P2Et.

El tratamiento con SC disminuye la proliferación celular en la línea celular K562

La línea K562 fue tratada con los extractos SC y P2Et y el recuento celular se realizó mediante AT. Se observó que todos los tratamientos se asocian con una disminución en el número de células con respecto al recuento celular antes de iniciar los tratamientos (basal). (Figura 2). Sin embargo, la disminución más importante se presenta en el tratamiento con SC, donde se presenta una disminución estadísticamente significativa respecto a los niveles basales (* $p \leq 0.05$), Adicionalmente la combinación de SC+Idarrubicina y SC+Ara-C muestra una disminución estadísticamente significativa sobre la disminución de la proliferación celular frente al tratamiento sin SC, por lo que el SC podría estar potenciando el efecto sobre la disminución de la proliferación de los quimioterapéuticos.

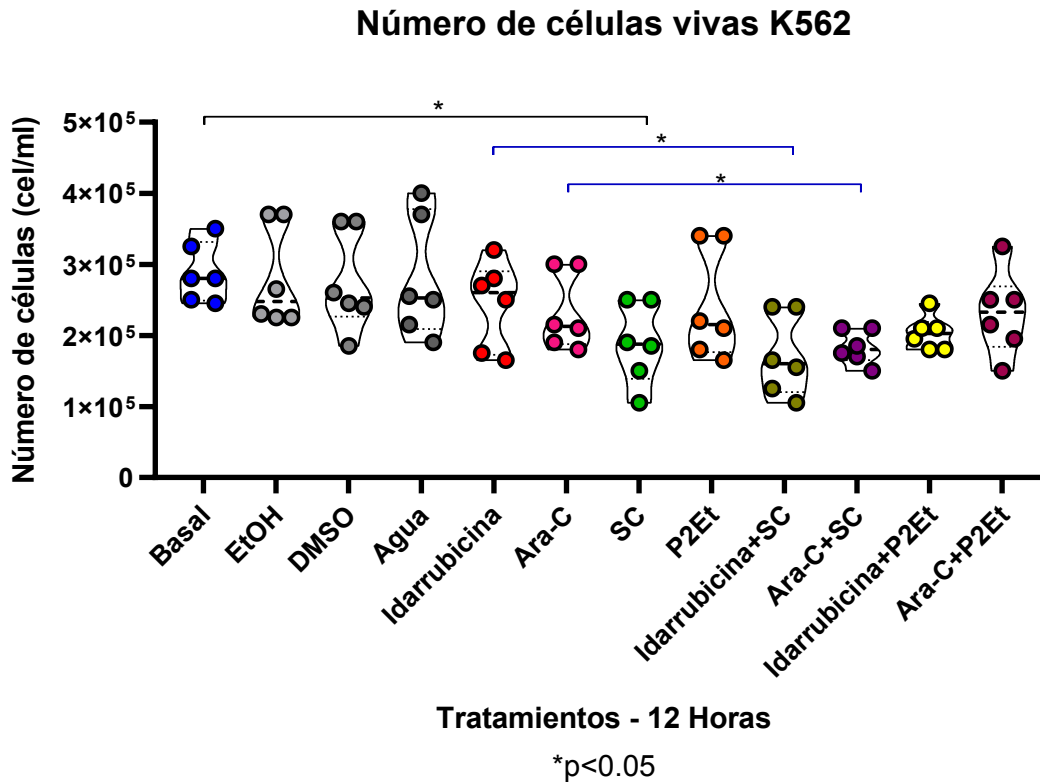


Figura 2. Número de células vivas por mL en la línea celular K562 después de 12h de exposición a los tratamientos. Se presentan los recuentos celulares de los tratamientos y sus respectivos vehículos

La viabilidad celular no se ve significativamente afectada con ningún tratamiento a 12 horas en la línea celular K562

La viabilidad celular no se afecta de forma significativa para ninguno de los tratamientos. Sin embargo, el tratamiento con SC y sus combinaciones con Idarrubicina y Ara-C muestran una tendencia a una disminución de la viabilidad celular respecto a los niveles basales y respecto a los demás tratamientos, aunque este efecto parece ser dependiente del tratamiento con SC y no del tratamiento con los quimioterapéuticos (Figura 3).

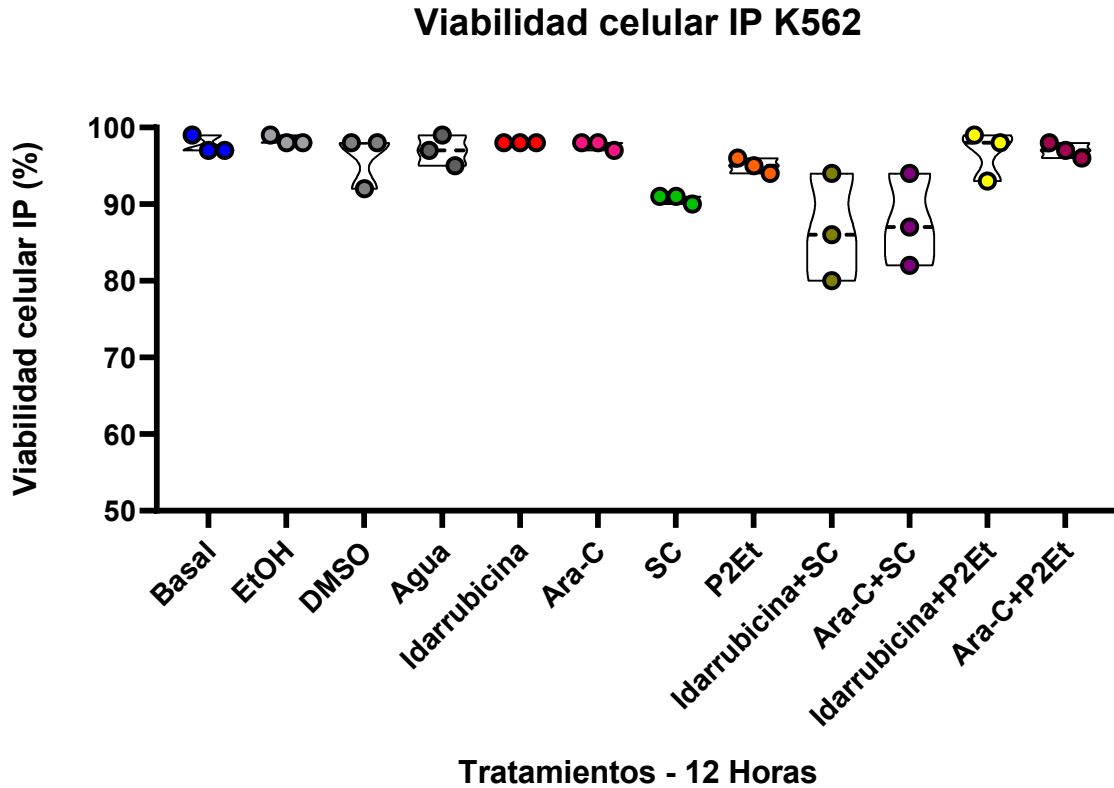


Figura 3. Porcentaje de viabilidad celular medido mediante IP en la línea celular K562 después de 12h de exposición a los tratamientos. Se presentan los porcentajes de viabilidad celular de los tratamientos y sus respectivos vehículos

La combinación de Metotrexato+SC disminuye los niveles de ON en comparación con el uso del Metotrexato solo en la línea celular Reh

De acuerdo con la metodología, la línea celular Reh fue tratada con los extractos SC y P2Et y la producción de ON fue determinada con el uso de la sonda DAF-FM DA mediante citometría de flujo. Se observó que ninguno de los tratamientos presenta diferencias estadísticamente significativas sobre los niveles de ON en la línea celular Reh, respecto a los niveles basales. Sin embargo, el uso de SC en combinación con Metotrexato disminuye significativamente los niveles de ON respecto al tratamiento con Metotrexato, por lo que el tratamiento con SC podría estar potenciando esta disminución.

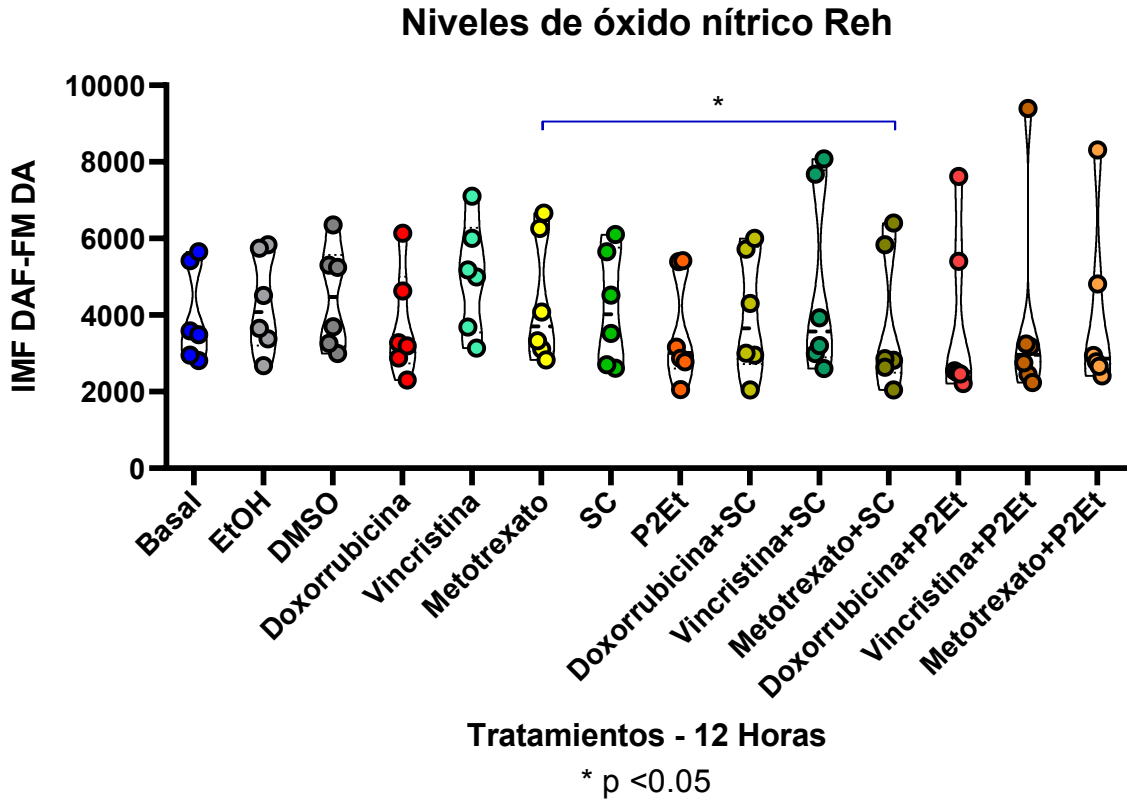


Figura 4. IMF de la sonda DAF-FM DA para la medición de ON en la línea celular Reh después de 12h de exposición a los tratamientos. Se presentan las IMF de los tratamientos y sus respectivos vehículos

El tratamiento con SC y P2Et disminuye significativamente la proliferación celular en la línea celular Reh

Todos los tratamientos evidencian disminuciones en el recuento celular. Ambos extractos, tanto SC como P2Et disminuyen la proliferación celular de manera significativa respecto a los niveles basales.

Número de células vivas Reh

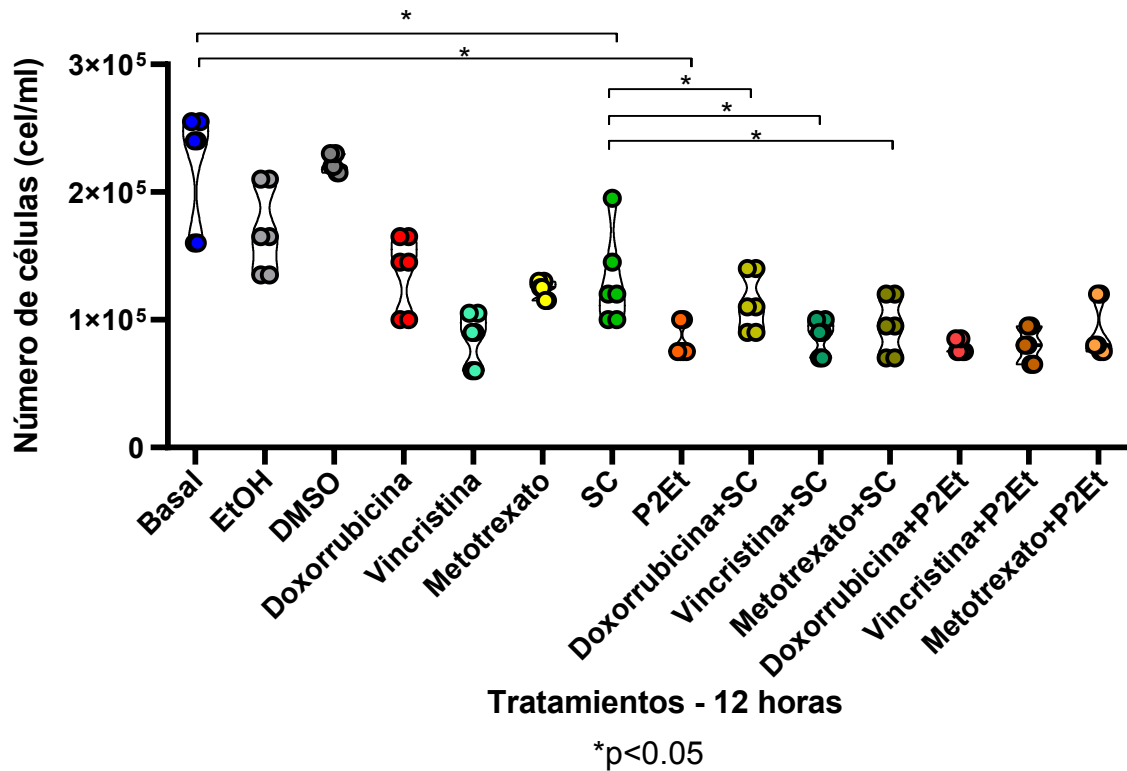


Figura 5. Número de células vivas por mL en la línea celular Reh después de 12h de exposición a los tratamientos. Se presentan los recuentos celulares de los tratamientos y sus respectivos vehículos

La combinación de SC con Doxorubicina, Vincristina y Metotrexato potencian de manera significativa el efecto inhibitorio de la proliferación ejercido por SC. Adicionalmente, P2Et podría estar potenciando el efecto sobre la disminución de la proliferación celular ejercido por el tratamiento con Doxorubicina de manera significativa. También, P2Et y SC empleados cada uno en combinación con Metotrexato potencian el efecto anti proliferativo ejercido por el tratamiento con Metotrexato.

La viabilidad celular no se ve significativamente afectada con ningún tratamiento a 12 horas en la línea celular Reh

La viabilidad celular no se afecta de manera significativa frente a ninguno de los tratamientos. Sin embargo, el tratamiento con P2Et y sus combinaciones con Doxorubicina, Vincristina y Metotrexato evidencian una tendencia a la disminución de la proliferación celular respecto a los niveles basales y otros tratamientos.

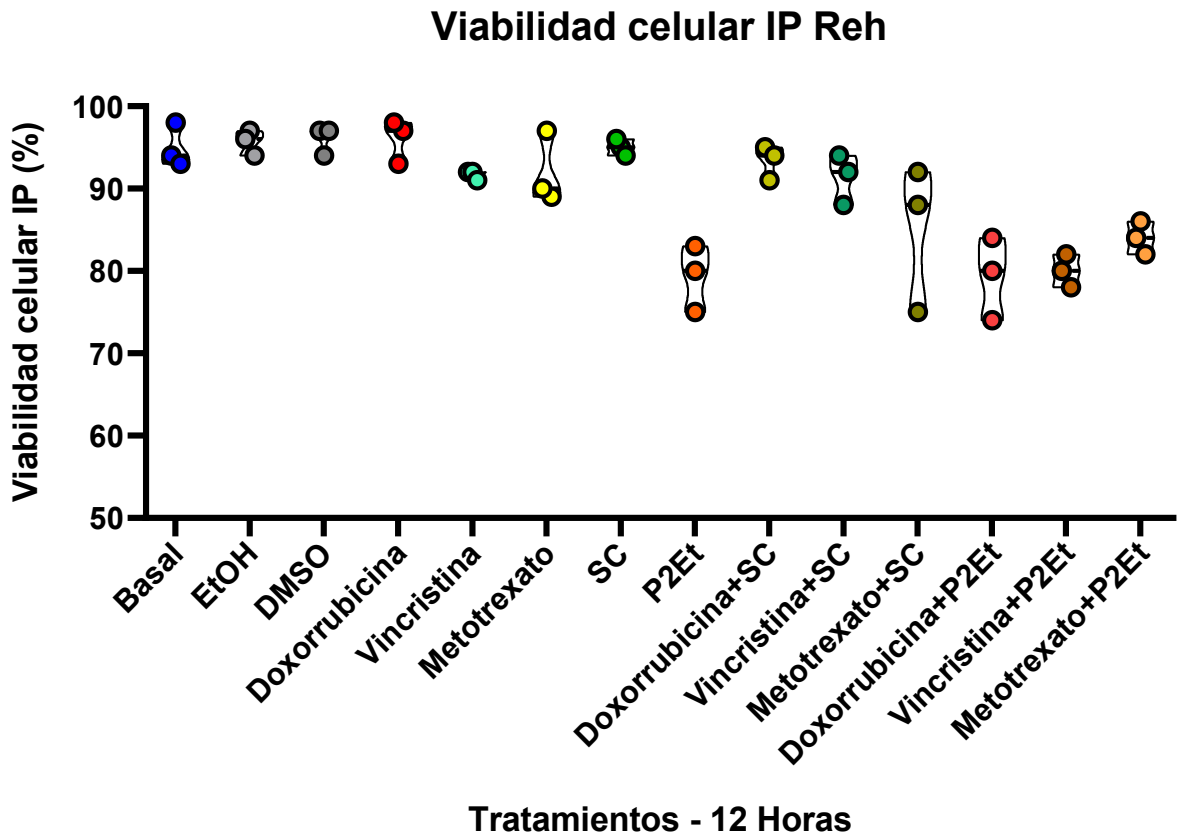


Figura 6. Porcentaje de viabilidad celular medido mediante IP en la línea celular Reh después de 12h de exposición a los tratamientos. Se presentan porcentajes de viabilidad celular de los tratamientos y sus respectivos vehículos

DISCUSIÓN

Mediante la realización de este trabajo se evaluó la modulación de los niveles de ON en dos líneas celulares leucémicas expuestas a dos extractos de plantas, con potencial antitumoral, estudiados en el grupo de Inmunobiología y Biología Celular. Los resultados obtenidos evidencian un aumento sobre la producción de ON en la línea celular K562 tratada con el extracto SC, el cual también aumenta la producción de ON al combinarse con Idarrubicina y Ara-C. Este efecto de extractos de plantas sobre el aumento de ON ha sido descrito previamente por Kellner et al (41) y por Martino et al (42) quienes describen compuestos similares a los que componen el extracto SC como Flavonoides, como inductores del aumento de ON (Figura 1) al usar Curcumina, Quercetina y Carnosol. Particularmente, Kellner et al evidenciaron que el aumento en los niveles de ON producido por los 3 compuestos podría ser un mecanismo protector contra la despolarización de la membrana mitocondria, ya que al realizar la inhibición de iNOS se presentó un aumento en el porcentaje de células con despolarización de membrana mitocondrial, por lo que el ON podría desempeñar un papel importante en el mantenimiento del equilibrio del potencial de membrana mitocondrial, dada su capacidad de inhibir temporalmente la enzima citocromo c oxidasa (41).

Por otro lado, se ha descrito el efecto de los compuestos sulfurados presentes en el extracto SC sobre la desregulación de proteínas asociadas al citoesqueleto como la actina y sobre la reorganización de los microtúbulos en otros modelos tumorales (31). Previamente se ha descrito la regulación que puede tener el citoesqueleto celular sobre las enzimas NOS, las cuales se pueden colocalizar en el mismo (45). La reorganización de las estructuras de polimerización puede ser inducida por estímulos extracelulares como el cizallamiento celular, hipoxia y algunos medicamentos, lo cual puede a su vez regular la expresión de las enzimas NOS, se ha descrito previamente en otros modelos celulares que la transcripción del gen que codifica para iNOS es regulado por cambios en la organización del citoesqueleto de actina y se ha evidenciado que alteraciones en la formación de las estructuras de los filamentos de actina pueden modular la actividad del factor de transcripción que regula la expresión de iNOS, aumentan los mRNA que codifican para iNOS y por lo tanto su expresión, que puede ser inducida por TNF- α e IL-1 β (45). Por lo anterior, una de las posibles causas del incremento de ON después del tratamiento con SC puede ser dada por la alteración en el citoesqueleto, que podría derivar en un potenciamiento de los mecanismos de expresión de iNOS.

Adicionalmente, el tratamiento con SC disminuyó de manera significativa la proliferación celular respecto a los niveles basales (Figura 2). Este efecto ha sido evidenciado previamente en estudios realizados en la línea celular K562 y en líneas celulares de melanoma humano, donde produce un arresto del ciclo celular en la fase G2 (32), y además este efecto anti proliferativo también fue evidenciado por Martino et al al evaluar el uso de Quercetina-3 Metil Éter (Flavonoide), donde también se evidenció un aumento importante en los niveles de ON. Previamente, diferentes autores han descrito el papel que puede tener el ON sobre la diferenciación y proliferación de las células leucémicas, donde el tratamiento con donadores de ON o compuestos que aumenten su producción endógena pueden inhibir la síntesis de DNA y RNA en células hematopoyéticas proliferantes (27), y aunque la mayoría de estudios donde se evidencia una disminución de la proliferación celular asociada con un aumento del ON se encuentra además un efecto citotóxico bastante importante, este efecto no se observó en este estudio (Figura 3) y puede estar asociado posiblemente al tiempo de exposición de las células al tratamiento, ya que las concentraciones IC₅₀ (concentración a la cual el 50% de las células expuestas mueren) que se emplearon en este estudio son calculadas a un tiempo de 48 horas, por lo que el efecto citotóxico o citostático de los tratamientos que modulan los niveles de ON podría variar de acuerdo al tiempo de exposición de las células a los tratamientos.

Por otro lado, el tratamiento con P2Et evidencia una tendencia a disminuir los niveles de ON en la línea K562 (Figura 1), aunque esta disminución no es estadísticamente significativa. Previamente se ha descrito el efecto que tiene el tratamiento con P2Et sobre la expresión de iNOS en otros modelos tumorales (12, 39), evidenciándose una disminución en la expresión de la enzima mediante la regulación de la producción de citoquinas por parte de las células tumorales. Además, P2Et no redujo de manera significativa la proliferación ni la viabilidad celular (Figura 2 y 3), lo cual difiere de lo evidenciado previamente sobre esta línea celular y posiblemente puede ser causado por el tiempo de exposición al tratamiento, ya que Castañeda et al empleando un tiempo de incubación de 24 horas evidenciaron una importante actividad citotóxica sobre esta línea celular (34).

En cuanto a las combinaciones de los quimioterapéuticos con los extractos en la línea celular K562, se observa que el tratamiento con SC+Idarrubicina aumenta significativamente los niveles de ON comparado con el tratamiento solo con Idarrubicina (Figura 1). Sin embargo, este aumento no es diferente al tratamiento con SC, por lo que este efecto podría ser dependiente del tratamiento con SC únicamente, al igual que el efecto observado en la proliferación celular (Figura 2). De manera similar, aunque el tratamiento con Ara-C no muestra variaciones en los niveles de ON, al combinarse con SC se observa un aumento significativo respecto a los niveles con Ara-C, el cual al igual que con el tratamiento con Idarrubicina podría ser dependiente del SC y no del uso de Ara-C, al igual que lo observado en la proliferación celular (Figura 2). Por otro lado, el aumento significativo evidenciado en la combinación Idarrubicina+P2Et comparado con el tratamiento con P2Et (Figura 1) podría estar siendo causado por la autofluorescencia que presenta la Idarrubicina, como se explicó previamente y no por un efecto biológico de aumento.

En la línea celular Reh, ninguno de los tratamientos presentó diferencias significativas en los niveles de ON respecto a los niveles basales. A pesar de que previamente Kellner et al evaluaron el efecto de flavonoides sobre los niveles de ON en la línea celular Reh evidenciando un aumento marcado a las 4 horas de tratamiento (41), este efecto no se observó para el tratamiento con SC ni tampoco para el tratamiento con P2Et (Figura 1), lo cual podría estar asociado al tiempo de exposición de las células frente a los tratamientos, por lo que la producción de ON en la línea celular Reh podría ser más rápida y menos sostenida en el tiempo, a diferencia de la línea celular K562. Adicionalmente, la disminución evidenciada en los niveles de ON de la combinación SC+Metotrexato a comparación del tratamiento con Metotrexato, aunque este efecto podría estar asociado a la dispersión de los datos y no realmente a un efecto biológico

En cuanto a la proliferación celular, todos los tratamientos disminuyeron la proliferación celular a 12 h (Figura 5), lo cual está ligado con cada uno de sus mecanismos de acción descritos previamente. A pesar de que SC no ha sido probado previamente en esta línea celular, en otros modelos tumorales y en la línea celular K562 ha demostrado e inducción de arresto en la fase G2 del ciclo celular (32). De manera similar, P2Et ha demostrado citotoxicidad y disminución de la clonogenicidad en la línea K562 (34). Doxorrubicina, por su parte y de manera similar con otros fármacos de la familia de las antraciclinas, se intercala entre las bases del DNA e inhibe la enzima de reparación Topoisomerasa II, lo cual lleva a mutagénesis que deriva en citotoxicidad. Vincristina, por otro lado, genera la

cristalización de proteínas de los microtúbulos a nivel del huso mitótico, lo cual lleva a un arresto del ciclo celular durante la metafase y por lo tanto a generar citotoxicidad. Por otro lado, Metotrexato es un inhibidor competitivo de la enzima dihidrofolato reductasa, afectando la síntesis de ácido tetrahidrofólico y el metabolismo de las purinas, además de que inhibe la síntesis de pirimidinas al bloquear la enzima timidilato sintetasa, finalmente afectando la síntesis de DNA e induciendo arresto del ciclo celular (46). En cuanto a la viabilidad celular, ningún tratamiento afectó de manera significativa la viabilidad celular a 12 h (Figura 6), posiblemente asociado a que es un tiempo corto comparado con los empleados en otros estudios.

Finalmente, los resultados obtenidos en ambas líneas celulares con los diferentes tratamientos demuestran diferencias importantes en el efecto de los extractos entre la línea celular mieloide K562 y la línea celular linfoide Reh. La sensibilidad de ambas líneas a los extractos es diferente y puede estar asociado a la interacción que puede estar teniendo el ON con otras moléculas. Entre ambas líneas celulares, la línea que posee niveles más elevados de ROS es la línea Reh (Arévalo C, 2021. Datos no publicados) y la interacción entre estos ROS y el ON podrían estar llevando a la formación de anión peroxinitrito, el cual es altamente tóxico para las células y por lo cual el efecto de disminución de la proliferación es más marcado en la línea Reh a comparación de la línea K562.

Los resultados reportados en la literatura en cuanto al efecto de diferentes extractos sobre los niveles de ON y su asociación con la proliferación y mortalidad celular resultan bastante contradictorios entre diferentes autores. Sin embargo, esta variación podría ser resultado de las técnicas empleadas en cada uno de los estudios, ya que algunos autores realizan la medición de ON por medio de métodos que evalúan los niveles de ON extracelular en el sobrenadante de los medios de cultivo, mientras que otros autores realizan la medición a nivel intracelular con sondas fluorescentes. Además, el tiempo al cual son expuestas las células a los tratamientos podría generar variaciones en los niveles de ON, ya que es un compuesto bastante volátil, su vida media es bastante corta y su producción puede ser modulada por múltiples mecanismos.

CONCLUSIONES

1. A nivel basal, la línea celular mieloide K562 posee niveles de ON más elevados a comparación de la línea celular linfocitoide Reh.
2. El tratamiento con SC induce un aumento significativo en los niveles de ON en la línea celular K562, lo cual se asocia con una importante disminución en la proliferación celular a 12 h. Además, el tratamiento con Idarrubicina y Ara-C no induce por sí solo un aumento significativo en los niveles de ON en la línea celular K562.
3. El tratamiento con P2Et en la línea celular K562 no modula de manera significativa los niveles de ON, ni se asocia con cambios en la proliferación y viabilidad celular.
4. Los extractos SC, P2Et y los quimioterapéuticos Doxorubicina, Vincristina y Metotrexato no modulan de manera significativa los niveles de ON en la línea celular Reh. Sin embargo, poseen un efecto importante en la disminución de la proliferación celular

RECOMENDACIONES

1. Es importante establecer controles, tanto positivos como negativos, que modulen los niveles de ON en ambas líneas celulares.
2. Para complementar los resultados obtenidos por citometría, se sugiere realizar un ensayo de Western Blot para determinar la expresión de la enzima iNOS en ambas líneas celulares bajo las diferentes condiciones.
3. Se sugiere realizar una cinética de tiempo de 6, 12, 24 y 48 h, con el fin de poder evaluar la cinética de producción de ON y su sostenimiento en el tiempo, así como poder evaluar mayores efectos sobre la viabilidad celular y su asociación con los niveles de ON.
4. Una vez se obtengan resultados significativos en cuanto a la viabilidad celular, podría realizarse un ensayo de Anexina-V para evaluar el proceso de muerte celular que están generando los extractos y los quimioterapéuticos sobre ambas líneas celulares.

REFERENCIAS

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2021;71(3):209-49.
2. Leucemias en Colombia, ¿cuál es el panorama de la enfermedad en la población adulta? | Cuenta de Alto Costo: Cuenta de alto costo; 2021 [actualizado 2021-09-01]. Disponible en: <https://cuentadealtocosto.org/site/cancer/leucemias-en-colombia-cual-es-el-panorama-de-la-enfermedad-en-la-poblacion-adulta/>.
3. Combariza-Vallejo JF. Cohorte de supervivencia en pacientes menores de 60 años con leucemia mieloide aguda de acuerdo con la citogenética y el tratamiento de consolidación. *Iatreia*. 2015;28:378-87.
4. Ballesteros-Ramírez R, Quijano S, Solano J, Ordoñez-Reyes C, Herrera MV, Murillo R, et al. Influence of Dose Intensity in Consolidation with HIDAC and Other Clinical and Biological Parameters in the Survival of AML. *J Cancer Epidemiol*. 2020:8021095.
5. Sossa CL, Abello V, Peña AM, Salazar LA, Quintero Vega G, Mantilla Duran WA, et al. Impact of Sociodemographic and Clinical Factors on the Survival of Patients with Acute Myeloid Leukemia: A Multicenter Experience in Colombia, on Behalf of Acho's Renehoc-Pethema Investigators. *Blood*. 2021;138(Supplement 1):3374.
6. Suarez Matos A, Aristizábal I, Infante AM, Narvaéz C, Barajas L, Piña M, et al. Mejoría en la supervivencia de los niños con leucemia mieloide aguda en el Instituto Nacional de Cancerología de Colombia. *Revista Colombiana de Cancerología*. 2020;24(2):72-9.
7. Posso Valencia HJ, Bautista Molano FG. Survival of acute lymphoid leukemia in Bogotá D.C. During 2008 - 2014. Repositorio institucional: Universidad El Bosque; 2016.
8. Sossa CL, Peña AM, Salazar LA, Chalela CM, Rey JJ, Rosales M, et al. Prognosis and Survival of Acute Myeloid Leukemia: Experience of a Single Center in Colombia. *Blood*. 2018;132(Supplement 1):5184.
9. Shallis RM, Wang R, Davidoff A, Ma X, Zeidan AM. Epidemiology of acute myeloid leukemia: Recent progress and enduring challenges. *Blood Reviews*. 2019;36:70-87.
10. DeBerardinis RJ, Chandel NS. Fundamentals of cancer metabolism. *Sci Adv*. 2016;2(5).
11. Vivarelli S, Falzone L, Basile MS, Candido S, Libra M. Nitric Oxide in Hematological Cancers: Partner or Rival? *Antioxid Redox Signal*. 2021;34(5):383-401.

12. Calderón JJ. Evaluación del efecto del tratamiento directo con el extracto P2Et de *Caesalpinia Spinosa* y el tratamiento con medios condicionados de células tumorales de melanoma murino (B16) tratadas con el extracto P2Et sobre la inducción de estrés de retículo en células mieloides supresoras y el impacto en su actividad supresora. Repositorio Institucional: Pontificia Universidad Javeriana; 2021.
13. Saisongkroh V, Maiuthed A, Chanvorachote P. Nitric oxide increases the migratory activity of non-small cell lung cancer cells via AKT-mediated integrin α v and β 1 upregulation. *Cellular Oncology*. 2016;39(5):449-62.
14. Wongvaranon P, Pongrakhananon V, Chunchacha P, Chanvorachote P. Acquired resistance to chemotherapy in lung cancer cells mediated by prolonged nitric oxide exposure. *Anticancer Res*. 2013;33(12):5433-44.
15. Bautista KAE, Ibarguen AFR, Terrazas A. Leucemias agudas. In: Herrera-Gómez Á, Ñamendys-Silva SA, Meneses-García A, editors. *Manual de Oncología*, 6e. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2018.
16. Deschler B, Lübbert M. Acute myeloid leukemia: Epidemiology and etiology. *Cancer*. 2006;107(9):2099-107.
17. Risk Factors and Primary Prevention of Acute Leukemia. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2006;7(4):515-7.
18. Mateos MK, Barbaric D, Byatt SA, Sutton R, Marshall GM. Down syndrome and leukemia: insights into leukemogenesis and translational targets. *Transl Pediatr*. 2015;4(2):76-92.
19. Tagaya Y, Gallo RC. The Exceptional Oncogenicity of HTLV-1. *Front Microbiol*. 2017;8:1425.
20. Verdonck K, González E, Van Dooren S, Vandamme A-M, Vanham G, Gotuzzo E. Human T-lymphotropic virus 1: recent knowledge about an ancient infection. *The Lancet Infectious Diseases*. 2007;7(4):266-81.
21. Kerr JR, Matthey DL. The role of parvovirus B19 and the immune response in the pathogenesis of acute leukemia. *Reviews in Medical Virology*. 2015;25(3):133-55.
22. Snyder R. Leukemia and Benzene. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2012;9(8):2875-93.
23. Eastmond DA, Mondrala ST, Hasegawa L. Topoisomerase II inhibition by myeloperoxidase-activated hydroquinone: a potential mechanism underlying the genotoxic and carcinogenic effects of benzene. *Chem Biol Interact*. 2005;153-154:207-16.

24. Pelcovits A, Niroula R. Acute Myeloid Leukemia: A Review. *R I Med J* (2013). 2020;103(3):38-40.
25. Hickok JR, Thomas DD. Nitric oxide and cancer therapy: the emperor has NO clothes. *Current pharmaceutical design*. 2010;16(4):381-91.
26. Novo E, Parola M. Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2008;1(1):5.
27. Kolb JP. Mechanisms involved in the pro- and anti-apoptotic role of NO in human leukemia. *Leukemia*. 2000;14(9):1685-94.
28. Sharina IG, Martin E. The Role of Reactive Oxygen and Nitrogen Species in the Expression and Splicing of Nitric Oxide Receptor. *Antioxid Redox Signal*. 2017;26(3):122-36.
29. Melo T, Montero-Bullón JF, Domingues P, Domingues MR. Discovery of bioactive nitrated lipids and nitro-lipid-protein adducts using mass spectrometry-based approaches. *Redox Biol*. 2019;23.
30. Murillo N. 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. Repositorio institucional: Pontificia Universidad Javeriana; 2018.
31. Ballesteros-Ramírez R, Aldana E, Herrera MV, Urueña C, Rojas LY, Echeverri LF, et al. Preferential Activity of *Petiveria alliacea* Extract on Primary Myeloid Leukemic Blast. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2020;2020:4736206.
32. Urueña C, Cifuentes C, Castañeda D, Arango A, Kaur P, Asea A, et al. *Petiveria alliacea* extracts uses multiple mechanisms to inhibit growth of human and mouse tumoral cells. *BMC Complement Altern Med*. 2008;8:60.
33. Santander SP, Hernández JF, Barreto CC, Masayuki A, Moins-Teisserenc H, Fiorentino S. Immunomodulatory effects of aqueous and organic fractions from *Petiveria alliacea* on human dendritic cells. *Am J Chin Med*. 2012;40(4):833-44.
34. Castañeda DM, Pombo LM, Urueña CP, Hernandez JF, Fiorentino S. A gallotannin-rich fraction from *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze displays cytotoxic activity and raises sensitivity to doxorubicin in a leukemia cell line. *BMC Complement Altern Med*. 2012;12:38.
35. Urueña C, Mancipe J, Hernandez J, Castañeda D, Pombo L, Gomez A, et al. Gallotannin-rich *Caesalpinia spinosa* fraction decreases the primary tumor and factors associated with poor prognosis in a murine breast cancer model. *BMC Complement Altern Med*. 2013;13:74.

36. Hernández JF, Urueña CP, Sandoval TA, Cifuentes MC, Formentini L, Cuezva JM, et al. 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*. 2017;27(3):306-14.
37. Lasso P, Gomez-Cadena A, Urueña C, Donda A, Martinez-Usatorre A, Romero P, et al. An Immunomodulatory Gallotanin-Rich Fraction From. *Front Immunol*. 2020;11:584959.
38. Syed Najmuddin SUF, Romli MF, Hamid M, Alitheen NB, Nik Abd Rahman NMA. Anti-cancer effect of *Annona Muricata* Linn Leaves Crude Extract (AMCE) on breast cancer cell line. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2016;16(1).
39. Deepa M, Sureshkumar T, Satheeshkumar PK, Priya S. Antioxidant Rich *Morus alba* leaf Extract Induces Apoptosis in Human Colon and Breast Cancer Cells by the Downregulation of Nitric Oxide Produced by Inducible Nitric Oxide Synthase. *Nutrition and Cancer*. 2013;65(2):305-10.
40. Shashi B, Jaswant S, Madhusudana RJ, Kumar SA, Nabi QG. A novel lignan composition from *Cedrus deodara* induces apoptosis and early nitric oxide generation in human leukemia Molt-4 and HL-60 cells. *Nitric Oxide*. 2006;14(1):72-88.
41. Kellner C, Zunino SJ. Nitric oxide is synthesized in acute leukemia cells after exposure to phenolic antioxidants and initially protects against mitochondrial membrane depolarization. *Cancer Lett*. 2004;215(1):43-52.
42. Martino R, Arcos MLB, Alonso R, Sülsen V, Cremaschi G, Anesini C. Polyphenol-Rich Fraction from *Larrea divaricata* and its Main Flavonoid Quercetin-3-Methyl Ether Induce Apoptosis in Lymphoma Cells Through Nitrosative Stress. *Phytotherapy Research*. 2016;30(7):1128-36.
43. Ferry-Dumazet H, Mamani-Matsuda M, Dupouy M, Belloc F, Thiolat D, Marit G, et al. Nitric oxide induces the apoptosis of human BCR-ABL-positive myeloid leukemia cells: evidence for the chelation of intracellular iron. *Leukemia*. 2002;16(4):708-15.
44. Goshi E, Zhou G, He Q. Nitric oxide detection methods in vitro and in vivo. *Medical Gas Research*. 2019;9(4):0.
45. Su Y, Kondrikov D, Block ER. Cytoskeletal Regulation of Nitric Oxide Synthase. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 2005;43(3):439-50.
46. Maksimovic V, Pavlovic-Popovic Z, Vukmirovic S, Cvejic J, Mooranian A, Al-Salami H, et al. Molecular mechanism of action and pharmacokinetic properties of methotrexate. *Molecular Biology Reports*. 2020;47(6):4699-708.