

Cinvestav

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**“EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO Y α -
TOCOFEROL EN EL ESTATUS ANTIOXIDANTE Y CITOCINAS
PROINFLAMATORIAS EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON LEUCEMIA
LINFOBLÁSTICA AGUDA”**

Tesis doctoral que presenta:

M. en C. Carlos Cruz Cortés

**Programa de Doctorado en Ciencias
en la especialidad de Bioquímica**

Director de tesis:

Dr. José Víctor Calderón Salinas

Ciudad de México

Julio, 2020

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Bioquímica del Cinvestav- IPN, Unidad Zacatenco, en el laboratorio de Bioquímica Médica a cargo del investigador Dr. José Víctor Calderón Salinas. Se contó con la ayuda técnica de la Q.F.B Margarita Rosas Flores y la asistencia técnica del Sr. Héctor Camacho.

Para los ensayos de citometría de flujo se contó con la ayuda técnica del M. en C. Víctor Hugo Rosales García de la Unidad de Citometría de Flujo del LaNSE-Cinvestav-IPN.

Durante el desarrollo de la presente tesis fui becario de CONACYT con el número 336948.

AGRADECIMIENTOS

A mi madre Enriqueta Cortés Villarreal y a mi padre Carlos Cruz Sánchez, por todas sus enseñanzas y su paciencia y los consejos que han guiado mi camino.

A mis hermanas Nareli por su gran ejemplo y Alma Lilia por su cariño y alegría.

A mis sobrinos Fer, Iremi, Mirko, Andrés y Narelita por darnos tanta felicidad.

A Huguet Landa todo mi respeto, agradecimiento y admiración, gracias totales para ti...

A Francisco Rodríguez por los buenos consejos y ánimos.

Al Dr. Víctor Calderón por aceptarme en su laboratorio, por su gran apoyo, su confianza y por todas sus enseñanzas.

A la Dra. Angélica Rueda por sus enseñanzas y confianza en mí.

Al Dr. Jesús Olivares y Judith Hernández por su apoyo y su amistad.

A mis compañeras del laboratorio 25 Sandra, Mireille y Nadia por el apoyo y tiempo compartido.

A Margarita Rosas y Héctor Camacho por su gran ayuda en el laboratorio y buena convivencia.

ÍNDICE

RESUMEN	6
ABSTRACT	7
ABREVIATURAS.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 Leucemia	2
1.2 Epidemiología y etiología de la Leucemia linfoblástica aguda.....	3
1.3 Diagnóstico y clasificación.....	4
1.4 Tratamiento: fármacos y sus mecanismos de acción.....	4
1.5 Estrés oxidativo y cáncer	7
1.6 Mecanismos de defensa antioxidante	9
1.7 Generación de ERO por el metabolismo de fármacos.....	12
1.8 Daño oxidativo y apoptosis en leucocitos y eritrocitos	13
1.9 Leucemia y citocinas.....	14
2. ANTECEDENTES	17
2.1 Estudios de estrés oxidativo y defensa antioxidante en leucemia.....	18
3. JUSTIFICACIÓN	22
4. HIPÓTESIS.....	23
5. OBJETIVO GENERAL	23
5.1 Objetivos Específicos	23
6. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	24
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
7.1 Evaluación de la concentración de glutatión reducido	26
7.2 Análisis de la actividad de la enzima Catalasa	27
7.3 Análisis de la peroxidación lipídica	28
7.4 Ensayos de oxidación <i>in vitro</i>	29
7.5 Análisis de la Eriptosis y apoptosis leucocitaria por daño oxidativo	29
7.6 Análisis de la capacidad antioxidante total.....	30
7.7 Análisis de la actividad de la enzima glutatión peroxidasa.....	30
7.8 Análisis para evaluar las concentraciones de citocinas.....	32
7.9 Análisis de la concentración de proteínas.....	32
7.10 Concentraciones de vitamina C y E.	32
8. RESULTADOS	33
8.1 Población de estudio	33
8.2 Lipoperoxidación.....	35
8.3 Actividad de Catalasa.....	36
8.4 Actividad de Glutatión peroxidasa	37
8.5 Capacidad antioxidante total.....	38

8.6 Glutación	39
8.7 Apoptosis de leucocitos	40
8.8 Eriptosis	40
8.9 Citocinas proinflamatorias.....	41
8.10 Correlaciones entre los efectos de la quimioterapia y el estatus antioxidante...	42
9. DISCUSIÓN	43
9.1 Estrés oxidativo en el diagnóstico	44
9.2 Estrés oxidativo y respuesta inflamatoria en las diferentes fases de la quimioterapia	46
9.3 Estrés oxidativo y respuesta inflamatoria tras el co-tratamiento con antioxidantes	49
10. CONCLUSIONES.....	51
11. PERSPECTIVAS	53
12. BIBLIOGRAFÍA	54

RESUMEN

La leucemia es un tipo de cáncer que afecta a componentes sanguíneos y se ha propuesto que cursa con un proceso oxidativo; la quimioterapia ha probado ser la opción más exitosa para alcanzar la remisión, pero se ha relacionado con efectos negativos debido, entre otros factores, al daño oxidativo.

Se ha sugerido que el establecer co-tratamientos antioxidantes podría brindar un beneficio para los pacientes con quimioterapia, disminuyendo el estrés oxidativo y mejorando la evolución del tratamiento.

En el presente trabajo, estudiamos el daño oxidativo y componentes de la defensa antioxidante en niños con diagnóstico de leucemia en diferentes etapas: al diagnóstico, durante la quimioterapia, y después de un co-tratamiento con vitamina E y vitamina C en el mantenimiento, etapa final de la quimioterapia. Además, evaluamos el efecto del co-tratamiento con vitaminas sobre las concentraciones de citocinas proinflamatorias relacionadas con el pronóstico y la recaída en otros tipos de cáncer.

Se incluyeron en el estudio 78 niños y niñas de 9.2 ± 4.5 años con LLA-B, y 52 niños y niñas clínicamente sanos de la misma edad y condición socioeconómica. Los parámetros evaluados fueron: la actividad de catalasa (CAT), la actividad de la glutatión peroxidasa (GPX), la concentración de glutatión (GSH) y la capacidad antioxidante total (TAC), así como la concentración de malondialdehído (MDA), el porcentaje de eriptosis y la concentración plasmática de las citocinas TNF- α , IL-6, IL-8 y SDF-1.

Nuestros resultados indicaron alteraciones de la defensa antioxidante, evidenciada por una menor actividad enzimática de CAT y de GPX en el diagnóstico de leucemia, en comparación con los resultados encontrados en niños sanos, sin que esto provocara daño oxidativo. Sin embargo, en la etapa de inducción de la quimioterapia los niveles de oxidación sobrepasaron la capacidad de los mecanismos antioxidantes (menor actividad de CAT y GPX, y menor TAC) produciéndose lipoperoxidación en las membranas de los eritrocitos.

Tras el co-tratamiento con antioxidantes no encontramos un efecto sobre las citocinas proinflamatorias, la concentración de GSH, ni la actividad de GPX.

Sin embargo, encontramos un aumento en la actividad de CAT y una disminución de la eriptosis; además, de que no encontramos evidencias de mayor lipoperoxidación. Estos hallazgos sugieren que el co-tratamiento con antioxidantes tiene un efecto protector ante el estrés oxidativo cuando se administra en la etapa de mantenimiento de quimioterapia.

ABSTRACT

Leukemia is a type of cancer that affects blood components and has been proposed as an oxidative disease; the election treatment is chemotherapy and has proven to be a successful option to achieve remission, but it has also been associated with oxidative damage.

It has been suggested that establishing antioxidant co-treatments could provide a benefit for patients receiving chemotherapy by reducing oxidative stress and improving the course of treatment.

In the present work, we studied oxidative damage and components of the antioxidant defense in children diagnosed with leukemia at different stages: at diagnosis, during chemotherapy, and after co-treatment with vitamin E and vitamin C in maintenance, the last stage of chemotherapy. Furthermore, we evaluated the vitamin co-treatment effect on proinflammatory cytokine concentrations related to prognosis and relapse in other types of cancer.

A total 78 boys and girls of 9.2 ± 4.5 years with B-ALL, and 52 clinically healthy boys and girls of the same age and socioeconomic status were included in the study. The parameters evaluated were: catalase activity (CAT), glutathione peroxidase activity (GPX), glutathione concentration (GSH) and total antioxidant capacity (TAC), as well as malondialdehyde concentration (MDA), eryptosis percentage and plasma concentration of the cytokines TNF- α , IL-6, IL-8, and SDF-1.

Our results showed alterations of the antioxidant defense, evidenced by a lower enzymatic activity of CAT and GPX in the diagnosis of leukemia, compared to the results found in healthy children, without causing oxidative damage. However, in the induction phase of chemotherapy, the oxidation levels exceeded the capacity of the antioxidant mechanisms (less activity of CAT and GPX, as well as lower TAC), producing lipoperoxidation in the erythrocyte membranes.

After co-treatment with antioxidants, we found no effect on proinflammatory cytokines concentration, GSH concentration, or GPX activity.

However, we found an increase in CAT activity and a decrease in eryptosis; furthermore, there was no evidence of higher lipid peroxidation. These findings suggest that co-treatment with antioxidants has a protective effect against oxidative stress when administered at the maintenance phase of chemotherapy.

ABREVIATURAS

LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LMA	Leucemia mieloblástica aguda
ERO	Especies reactivas de oxígeno
MDA	Malondialdehído
GSH	Glutación reducido
SOD	Superóxido dismutasa
TAC	Capacidad antioxidante total
CAT	Catalasa
GPX	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
FS	Fosfatidilserina
SL	Sin leucemia (Se refiere a niños clínicamente sanos)
IP	Ioduro de propidio
Dx	Diagnóstico
QTx	Quimioterapia

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Leucemia

En la médula ósea de un ser humano adulto, durante el proceso de hematopoyesis se generan una variedad de células de diferentes linajes y etapas de diferenciación (Doulatov et al., 2012). Las células madre pluripotenciales de la médula ósea se autorreplican lentamente, y se diferencian a un estadio de compromiso mieloide o linfoide; el primer estadio de compromiso produce una célula madre mieloide o linfoide capaz de proliferar y también de diferenciarse a todos los progenitores de las diferentes células sanguíneas (Jaime Pérez & Gómez Almaguer, 2009)

En la leucemia, un tipo de cáncer de los componentes de la sangre que se origina en la médula ósea, el proceso de hematopoyesis se encuentra afectado, causando una proliferación celular anormal y la presencia de células inmaduras en circulación derivadas de la clona hematopoyética (Ahmad et al., 2008). La infiltración de células neoplásicas causa disfunción en diferentes órganos y manifestaciones sistémicas de la enfermedad, tales como: anorexia, náuseas, vómito, diarrea, desnutrición y pérdida de peso. Estos fenómenos pueden conducir a estrés sistémico de carácter energético, oxidativo e inflamatorio (Mitchell et al., 2009).

La clasificación de la leucemia se basa: 1. En el tipo celular afectado (mieloide ó linfoide); el mieloide comprende a los granulocitos (neutrófilos, basófilos y eosinófilos), monocitos, eritrocitos y trombocitos; el linfoide comprende a los linfocitos T, linfocitos B y células NK (Mayani H. & Pelayo R., Montesinos J., 2007). 2. Al curso de la enfermedad, aguda si es de una progresión acelerada como consecuencia de un fallo severo en la medula ósea ó crónica, si el proceso de evolución es lento (**figura 1**) (Irwin et al., 2013).

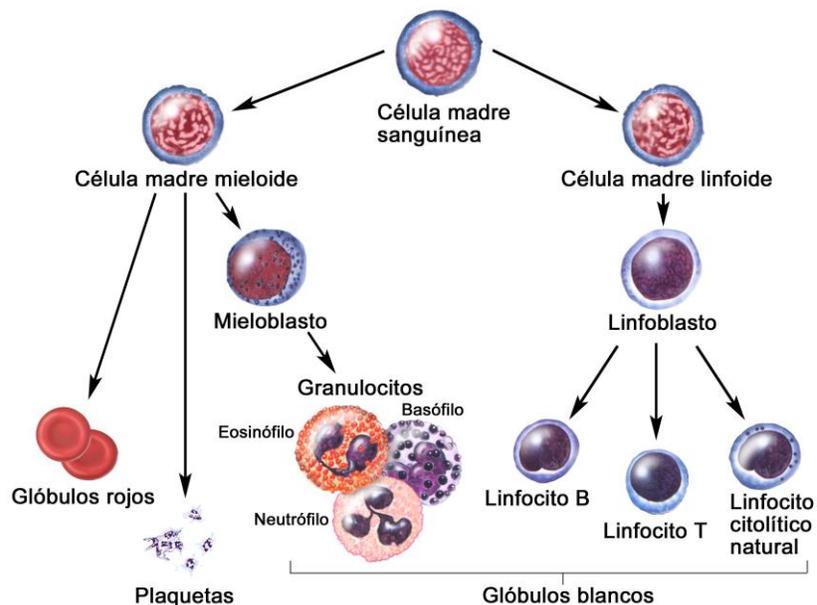


Figura 1. Hematopoyesis. Desarrollo de las células sanguíneas a partir de una célula progenitora. Tomado de: (Winslow, 2007).

La leucemia es el cáncer pediátrico más común, desde los 0 hasta los 14 años corresponde en hasta un 36% del total de cánceres registrados mundialmente (**figura 2**)(Steliarova-Foucher et al., 2017). Su incidencia anual se ha incrementado en las últimas décadas, y en mayor velocidad en la población latina (Whitehead et al., 2016).

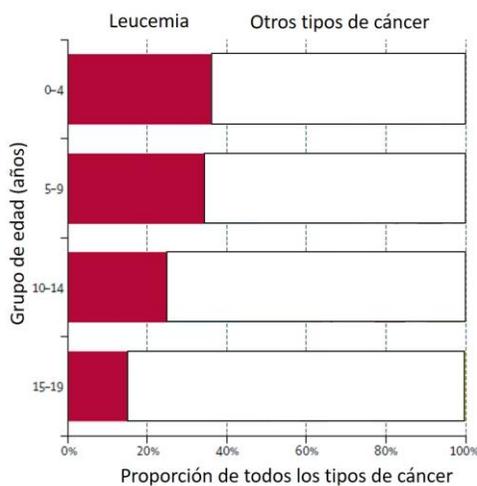


Figura 2. Porcentaje de leucemia en los diferentes grupos de edad con respecto a otros tipos de cáncer en todo el mundo de 2001 a 2010. Leucemia (todos los fenotipos); otros tipos de cáncer (linfoma, tumores de SNC, retinoblastoma, tumores renales, hepáticos, de hueso, sarcomas, y otros). modificado de (Steliarova-Foucher et al., 2017).

1.2 Epidemiología y etiología de la Leucemia linfoblástica aguda

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) tiene un anormal y rápido desarrollo de células del estirpe linfoblástico T ó B en la médula ósea (Jaime Pérez & Gómez Almaguer, 2009) induciendo una alta proporción de células inmaduras en la circulación (linfoblastos o blastos). La LLA es cinco veces más frecuente que la leucemia mieloblástica aguda (LMA) y corresponde al 78% de todas las leucemias diagnosticadas en la infancia (Rasool et al., 2015). Algunas variaciones biológicas en la población de América Latina podrían estar relacionadas con la mayor incidencia LLA con respecto a la reportada en otras partes del mundo, con tasas de hasta 120 pacientes por millón por año (Pérez-Saldivar et al., 2011). La incidencia en México de cáncer es de 122 casos nuevos por millón de habitantes al año, en niños menores de 15 años. La mayoría de las neoplasias de la infancia son más comunes en niños que en niñas. En los países industrializados la posibilidad de muerte por cáncer en menores de 18 años es menor al 15%, mientras que en México se ha propuesto que en la actualidad es de 30% (Rivera-Luna et al., 2015).

Se desconoce la etiología de la LLA, sin embargo, se ha reportado que su desarrollo se puede atribuir en un porcentaje menor al 5% a síndromes de origen genético, tales como: síndrome

de Down, síndrome de Klinefelter, anemia de Fanconi, síndrome de Bloom, síndrome de Louis-Barr, síndrome de Nijmegen (Stieglitz & Loh, 2013). Además se ha asociado el desarrollo de leucemia a la exposición a radiaciones y a fármacos durante el periodo de gestación (Paul et al., 2016). Así como a diversos factores ambientales, infecciosos y dietéticos como la exposición a pesticidas, el humo del tabaco, los solventes y las emisiones de automóviles (Whitehead et al., 2016). Se ha reportado que pacientes árabes con LLA presentan mutaciones en el DNA mitocondrial específicamente en la subunidad 6 de la ATP sintasa por lo que se propone que el hallazgo de dichas mutaciones puede utilizarse como un factor de diagnóstico para detección temprana de LLA (Yacoub et al., 2014). De manera interesante, la suplementación con vitaminas y folatos durante el periodo previo a la concepción, embarazo y lactancia han mostrado reducir el riesgo de desarrollo de leucemia (Whitehead et al., 2016).

1.3 Diagnóstico y clasificación

En el diagnóstico de la leucemia, los pacientes pueden presentar una serie de malestares y molestias denominados “síntomas B” (fiebre $>38^{\circ}\text{C}$, sudoración nocturna y pérdida de peso) además de infecciones, sangrados, disnea y fatiga debido al bajo conteo de células sanguíneas maduras (American Cancer Society, 2016)(NCCN Guidelines ALL versión 1.20149). También, durante la exploración física pueden encontrarse petequias, palidez y equimosis. Dado que aproximadamente el 20% de los pacientes tienen infiltración leucémica al bazo o al hígado, pueden presentar también esplenomegalia o hepatomegalia, con posibles inflamaciones en testículos, piel y mediastino en el caso específico de LLA de estirpe T; para el caso de pacientes que presentan LLA de estirpe B se pueden presentar tumores abdominales y síndrome inflamatorio sistémico por lisis tumoral (Paul et al., 2016).

El diagnóstico de la leucemia se establece cuando se observa un porcentaje de linfoblastos del 20% o mayor en los análisis de médula ósea. Históricamente, los blastos se clasificaban mediante los criterios de la FAB (French-American-British, clasificaciones de las enfermedades hematológicas), basados en sus características morfológicas (Jaime Pérez & Gómez Almaguer, 2009; Paul et al., 2016).

Actualmente, además de la clasificación morfológica se realizan análisis citogenéticos donde se buscan alteraciones cromosómicas y de inmunofenotipo mediante citometría de flujo, los cuales determinan la estirpe y etapa de la diferenciación celular, lo cual es de gran importancia en el pronóstico, tratamiento y evolución clínica del paciente (Ciudad & Orfao, 2007).

1.4 Tratamiento: fármacos y sus mecanismos de acción

La quimioterapia ha resultado exitosa en disminuir la mortalidad por leucemia; sin embargo, el efecto citotóxico de los fármacos así como la posible formación de radicales libres, pueden afectar el estado redox de los pacientes durante la terapia (Ammar et al., 2020; ben Mahmoud et al., 2017)

Los medicamentos utilizados en la quimioterapia promueven la apoptosis de las células neoplásicas y, por lo tanto, controlan o conducen a la remisión de la enfermedad; sin embargo, sus efectos colaterales y su metabolismo se han asociado con una mayor producción de ERO (Conklin, 2002).

Adicionalmente, se han reportado diferentes efectos adversos a causa de la quimioterapia, una de estas descripciones fue emitida y descrita ampliamente por el Instituto Nacional de Cáncer de Estados Unidos (NCI), en el CTEP (“Common Terminology Criteria for Adverse Events,” 2016). Los efectos adversos incluyen infecciones, alteraciones cardíacas, hematológicas, endócrinas, gastrointestinales, nutricionales, renales, respiratorias y en piel y cabello entre otras, principalmente en células de rápido desarrollo.

Las complicaciones hepáticas y hematológicas son muy comunes, especialmente durante el periodo intensivo de la quimioterapia de inducción. A causa de estas complicaciones, los médicos optan por discontinuar o posponer los tratamientos y prolongar la estancia de los pacientes internados, lo que puede afectar el pronóstico, evolución y costos de la enfermedad (Al-Tonbary et al., 2009).

La quimioterapia se divide en 3 fases, que tienen objetivos precisos:

Durante la primera fase se incluye una ventana terapéutica durante una semana con esteroides (Prednisona) y es utilizada para evaluar la respuesta al medicamento como factor pronóstico y para reducir las complicaciones metabólicas relacionadas con la carga tumoral que pueden presentarse al inicio de la quimioterapia. A continuación se inicia la fase de inducción a la remisión (4 semanas); La finalidad de esta fase es eliminar la mayor cantidad de células neoplásicas en la médula ósea y regresar el conteo de células sanguíneas a niveles normales. Existen diversos esquemas para las diferentes etapas, pero están basados en estructuras de fármacos similares (vincristina, daunorrubicina o doxorubicina, l-asparaginasa), con ligeras diferencias en el calendario de administración. Posteriormente, continúa la fase de consolidación (4 semanas), en ésta se utilizan fármacos como metrotexato, mercaptopurina y citarabina. El propósito de esta fase consiste en eliminar las células leucémicas residuales tanto en sangre como en médula ósea después de la fase de inducción (Dy G., 2004; Kennedy et al., 2005; Udensi & Tchounwou, 2014).

Finalmente, los pacientes entran en la fase de mantenimiento, esta etapa consiste en un periodo largo (2-3 años) de fármacos como etopósido, metrotexato y mercaptopurina donde se busca reducir el riesgo de un evento recurrente y prolongar la remisión (Naz et al., 2013).

Tras el periodo de quimioterapia de mantenimiento y bajo una continua vigilancia, la remisión completa de la enfermedad se obtiene cuando:

- a) La médula ósea presenta celularidad normal, evidencia de hematopoyesis adecuada y la suma de blastos menor al 5%.

- b) El examen de biometría hemática muestra un aumento de la concentración de hemoglobina y ausencia de blastos
- c) Falta de síntomas y signos atribuibles a leucemia

De acuerdo con la clasificación de riesgo, el esquema de tratamiento varía, sin embargo los agentes quimioterapéuticos más utilizados en el tratamiento de leucemias y sus mecanismos de acción se mencionan en la **tabla 1**.

Tabla 1. Esquema de fármacos utilizados comúnmente en el tratamiento de LLA.	
Fármaco	Mecanismo de acción
Vincristina	Inhibe la polimerización de los microtúbulos
L-Asparaginasa	Hidroliza al aminoácido asparagina inhibiendo el crecimiento tumoral
Metrotexato (MTX)	Inhibe la enzima dihidrofolato reductasa
Citarabina de arabinósido	Inhibe la síntesis de DNA bloqueando a la polimerasa
Daunorrubicina y Doxorrubicina	Antraciclinas intercalantes de DNA, bloquean el avance de la topoisomerasa II
Ciclofosfamida	Alquilante de DNA
Mercaptopurina	Antimetabolito, inhibe la síntesis de purinas
Etopósido	Inhibe a la topoisomerasa II
(American Cancer Society, 2016; Dy G., 2004)	

En el esquema de tratamiento para LLA se incluyen fármacos alquilantes de DNA como la ciclofosfamida, cuyo mecanismo de acción consiste en substituir un grupo alquilo por un protón en una base nitrogenada, lo que impide la replicación del DNA y de esta forma ejerce su efecto citotóxico (Labriola & Livingston, 1999).

La daunorrubicina y doxorrubicina pertenecen al grupo de las antraciclinas, son antibióticos cuyo mecanismo de acción citotóxico es el de funcionar como agente intercalante de DNA inhibiendo el avance de la topoisomerasa II (McGowan et al., 2017).

El metrotexato (MTX) y la mercaptopurina pertenecen a un grupo de fármacos llamados antimetabolitos estructuralmente similares a las purinas y pirimidinas. Actúan como sustratos competitivos en la vía de síntesis de nucleótidos, por lo tanto impiden la síntesis de DNA, particularmente, su efecto es durante la fase S de división celular (Dy G., 2004).

La vincristina es uno de los inhibidores de la polimerización de tubulina que impiden la formación de microtúbulos, afectando a componentes integrales del citoesqueleto y del aparato mitótico en la metafase durante la división celular S (Dy G., 2004).

1.5 Estrés oxidativo y cáncer

La leucemia aguda es un estado hiper-catabólico que se ha propuesto que puede generar un exceso de especies reactivas derivadas del oxígeno (Papageorgiou et al., 2005), tal como se ha demostrado en otros estudios en donde las células neoplásicas producen mayores cantidades de ERO que las células no cancerosas (Sentürker et al., 1997). Esta sobreproducción de ERO puede comprometer al sistema de defensa antioxidante, derivando a un estado de estrés oxidativo (EO), el cual se caracteriza como un desbalance entre la producción de radicales libres y metabolitos reactivos (a los que se les llama oxidantes) y las moléculas encargadas de su eliminación y de los mecanismos de protección (antioxidantes) (Barry Halliwell, 2001; Salehi et al., 2018).

El desarrollo de EO es potencialmente dañino para las células, conduce al daño a lípidos, proteínas y al DNA, con un impacto potencialmente negativo en todo el organismo (Reuter et al., 2011); el daño a lípidos produce alteraciones en la permeabilidad de la membrana celular, el daño al DNA puede producir mutaciones y cambios en la expresión génica, y el daño a proteínas puede producir cambios o pérdida de la función conduciendo a modificaciones en rutas de señalización (Samoylenko et al., 2013). Se ha propuesto que los mecanismos que podrían contribuir al desarrollo de EO en pacientes con cáncer, son las alteraciones del metabolismo energético, los mecanismos no específicos de la activación crónica del sistema inmune, (provocando una excesiva cantidad de citocinas proinflamatorias), y el uso de agentes antineoplásicos (Abdul-Aziz et al., 2015; Mantovani, et al., 2003; U. Singh et al., 2005).

Las ERO se encuentran implicadas en la etiología y progresión de diversas enfermedades con características oxidativas tales como las crónico-degenerativas, metabólicas, infecciosas y las producidas por tóxicos, incluyendo el cáncer (Conklin & Conklin, 2000; Udensi & Tchounwou, 2014). Las ERO son todos los metabolitos inestables del oxígeno molecular (O_2) que tienen reactividad tales como el ion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el radical hidroxilo (HO^{\cdot}) y moléculas oxidantes no radicales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) entre otros (**figura 3**) (Rahal et al., 2014; Samoylenko et al., 2013). El radical HO^{\cdot} es el más reactivo de las ERO, reacciona rápidamente con lípidos de membrana y tioles de proteínas produciendo eventos oxidativos que tienen un profundo impacto en la homeostasis, este radical se puede formar en presencia de metales de transición, principalmente cobre y hierro, por reacciones de transferencia de electrones (reacción de Fenton = $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^{\cdot}$) (B. Halliwell, 1989).

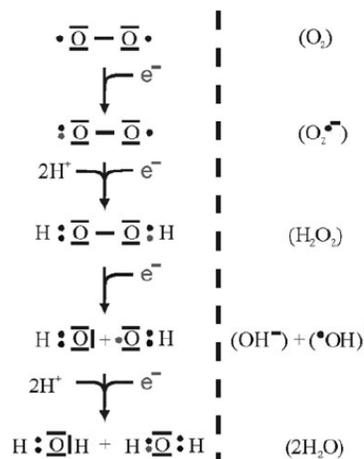


Figura 3. Subproductos de la reducción del oxígeno. De arriba hacia abajo: oxígeno molecular (O_2), anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), anión hidroxilo (OH^-) y radical hidroxilo ($\cdot OH$), agua. (modificado de: Samoylenko *et al.*, 2013).

De manera fisiológica también se producen especies reactivas de nitrógeno (ERN) y cuando existe una sobreproducción de estas, contribuyen también al desarrollo de un ambiente oxidante. El óxido nítrico (NO^{\bullet}) es un radical involucrado en numerosos procesos tales como neurotransmisión, presión sanguínea, relajación muscular y regulación inmune (Bergendi' et al., 1999), sin embargo, el NO^{\bullet} puede reaccionar con el $O_2^{\bullet-}$ y formar un radical más potente, el peroxinitrito ($ONOO^-$) cuya reactividad produce mayor daño a biomoléculas (Valko et al., 2007).

Tanto las ERO como las ERN pueden generarse de manera endógena por procesos enzimáticos o no enzimáticos, en el caso de las ERO (de mayor importancia en este trabajo), éstas pueden formarse como subproductos de la función de la cadena respiratoria, de enzimas como NADPH oxidasas, xantina oxidoreductasas (XOR), diversas oxidasas peroxisomales, enzimas de la familia del citocromo P450, ciclooxigenasas y lipooxigenasas, así como a partir de desencadenantes exógenos como radiaciones ionizantes, tóxicos y fármacos (**figura 4**) (Samoylenko et al., 2013).

Las ERO tienen función como moléculas de señalización en importantes vías sensibles al estado redox, sin embargo, en altas concentraciones tienen un efecto tóxico y de daño celular, por lo que, a través de mecanismos antioxidantes se mantiene el equilibrio entre su producción y eliminación conservando así la homeostasis (Irwin et al., 2013).

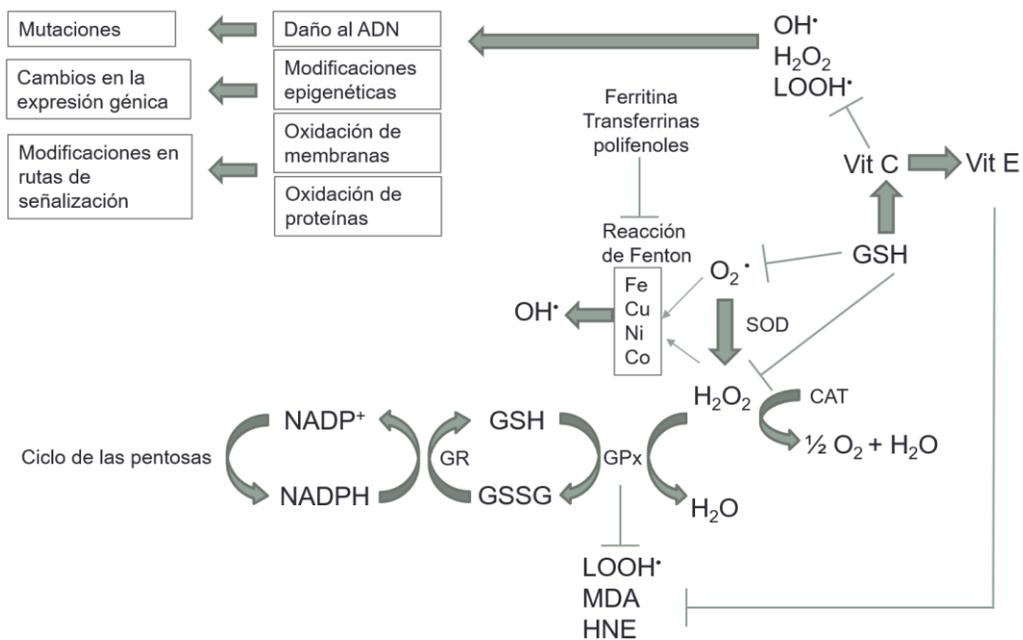


Figura 5. Enzimas antioxidantes y micronutrientes que regulan los niveles de ERO. Modificado de: (Samoylenko et al., 2013).

En el caso de prevención de formación de ERO, existen importantes proteínas que se unen al hierro libre secuestrándolo e impidiendo la formación de la reacción de Fenton que produce el radical OH^\bullet este es el caso de ferritina y transferrina (figura 5) (Samoylenko et al., 2013).

Cuando no son suficientes los medios de prevención, la acción de la defensa enzimática resulta muy eficiente en reducir las especies oxidantes dado sus altas afinidades y velocidades de reacción.

La SOD es una enzima capaz de catalizar la dismutación de superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) en oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno $2\text{O}_2^{\bullet-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ aún sin la presencia de SOD el $\text{O}_2^{\bullet-}$ se puede dismutar a H_2O_2 de manera mucho más lenta (Irwin et al., 2013). En mamíferos existen 3 isoformas de SOD: una citoplasmática dependiente de cobre y zinc Cu/ZnSOD1 (SOD1), una mitocondrial dependiente de manganeso MnSOD2 (SOD2) y una extracelular Cu/ZnSOD3 (SOD3) (Oberley & Buettner, 1979). Aunque se ha propuesto que el $\text{O}_2^{\bullet-}$ puede difundir a través de membranas, éste es muy reactivo y reacciona inmediatamente con lípidos o proteínas y en el caso de exponerse a metales de transición como el Fe, se forma el radical OH^\bullet , el desarrollo de esta reacción tiene varias consecuencias no sólo el daño oxidante que genera, si no también muchas reacciones enzimáticas que requieren metales como cofactores, y al modificar el estado redox de estos pueden modificarse también estas reacciones (**figura 5**) (Fukai & Ushio-Fukai, 2011).

La CAT es un componente crucial de la defensa enzimática antioxidante, al ser una de las primeras enzimas en ser cristalizada, ha sido estudiada a profundidad y es uno de los

referentes analizados en diversas enfermedades de carácter oxidante para evaluar estrés oxidativo (Glorieux et al., 2015; Glorieux & Calderon, 2017; Reuter S., Gupta S., Chaturvedi M., 2011), en pacientes con leucemia se reportó una relación entre las alteraciones en la actividad de la CAT y el desarrollo de estrés oxidativo (Al-Gayyar et al., 2007; Y. Zhou et al., 2003). CAT es un homotetrámero de entre 200 a 340 KDa, cada subunidad tiene un grupo hemo como grupo prostético además de NADPH que funciona como protección, evitando su inactivación por oxidación debido a las condiciones del medio (Kirkman & Gaetani, 1984). La CAT lleva a cabo la reacción en la cual se reducen dos moléculas de H_2O_2 en 2 moléculas de H_2O y una de O_2 (Díaz et al., 2012; Zamocky et al., 2008). El H_2O_2 puede formar el radical hidroxilo mediante la reacción de Fenton con metales de transición considerado un compuesto más dañino y altamente reactivo (figura 5). Adicional a su capacidad de reducir el H_2O_2 , en líneas celulares se ha demostrado que CAT puede degradar al peroxinitrito ($ONOO^-$) formado por el ion $O_2^{\cdot-} + NO$; en ensayos *in vitro*, se ha reportado una forma extracelular que puede translocarse a la membrana, unida mediante una transglutaminasa y con esto favorecer la protección contra la lipoperoxidación (Böhm et al., 2015).

La GPX es otra importante enzima que tiene la función de reducir el H_2O_2 así como otros hidroperóxidos, esta enzima consiste en 4 monómeros de 22 a 23 kDa y es dependiente de selenio y cisteína, cataliza la siguiente reacción $ROOH + 2GSH \rightarrow ROH + GSSG + H_2O$ (Paglia, D.E. and Valentine, 1967)(figura 5). Se han reportado isoformas tejido-específicas, la GPX1 es una isoforma ubicua que contribuye a la mayor actividad de peroxidasa citosólica y mitocondrial. La GPX2 es una isoforma con una distribución limitada, se encuentra principalmente en la mucosa epitelial del tracto gastrointestinal. La GPX3 es una forma extracelular del plasma sanguíneo, también se expresa en tejido pulmonar y riñón, éste último donde se lleva a cabo su síntesis antes de ser liberada al espacio extracelular (Rush & Sandiford, 2003). La GPX4 es la única isoforma constituida de un solo monómero, se encuentra en la mayoría de los tipos celulares y se ha reportado que tiene acción principalmente sobre hidroperóxidos formados de la oxidación de fosfolípidos, es probable que debido a estas función es la única isoforma cuyo *knockout* es letal (Lubos et al., 2011).

La reducción del H_2O_2 puede llevarse a cabo por la CAT o la GPX (Nagababu et al., 2003). GPX tiene una K_m más baja que CAT por lo que es capaz de reaccionar con este a una concentración menor. La CAT tiene una afinidad menor por H_2O_2 que actúa a mayores concentraciones, a diferencia de GPX, CAT para su ciclo de actividad no necesita el glutatión ni el poder reductor del NADPH (figura 5) (Lei et al., 2015).

Además de las enzimas antioxidantes, los elementos antioxidantes no enzimáticos son una importante respuesta contra fenómenos oxidativos, entre estos se encuentra el ácido ascórbico (vitamina C), el α -tocoferol (vitamina E), el glutatión (GSH), los carotenoides, flavonoides y otros antioxidantes. Algunos antioxidantes tienen la capacidad de regenerarse resaltando el dinamismo de la defensa antioxidante, tal es caso del ácido ascórbico oxidado

que puede ser regenerado a su composición reducida por el NADPH o glutatión, y una vez reducido éste puede regenerar a la vitamina E oxidada (Valko et al., 2007).

El principal tiol intracelular es el tripéptido glutatión, compuesto por glutamina, cisteína y glicina y cuyas concentraciones intracelulares alcanzan valores del orden mM, mientras que en plasma se encuentran en el rango μM (Zitka et al., 2012). El glutatión tiene una importante participación contra el estrés oxidante dado que puede reaccionar con ERO como el radical OH^{\bullet} y los peroxinitritos, además de intervenir en un gran número de funciones celulares tales como síntesis proteica, crecimiento celular (Griffith, 1999) y co-transporte de fármacos a través de membranas (figura 5) (Sodani et al., 2012).

En plasma o fluidos corporales la capacidad antioxidante total es una medida que considera la acción combinada de los antioxidantes presentes tanto no enzimáticos (el glutatión, el ácido ascórbico, el alfa-tocoferol, los betacarotenos, el ácido úrico, la bilirrubina y la albúmina) como enzimáticos (SOD, GPX y CAT) (Al-Tonbary et al., 2011). Esta combinación de antioxidantes en el plasma provee una mayor protección contra los ataques de radicales libres cualquier antioxidante de manera aislada (Al-Gayyar et al., 2007). En plasma se han hecho estimaciones de que podrían tener las siguientes contribuciones: glutatión reducido 53%, ácido úrico 33%, vitamina C 4.7%, bilirrubina 2.4%, vitamina E 1.7% y otros 5.2% contando entre estos últimos a los polifenoles, flavonoides y otros compuestos con capacidad antioxidante no enzimática (Erel, 2004).

1.7 Generación de ERO por el metabolismo de fármacos

Se han propuesto diversos mecanismos que pueden provocar estrés oxidativo en pacientes con cáncer, uno podría ser resultado del uso de agentes antineoplásicos, ya que varios de ellos, particularmente los agentes alquilantes y el cisplatino, pueden producir ERO y por lo tanto propiciar o aumentar el desarrollo de estrés oxidativo (Mantovani, Macciò, Madeddu, Mura, Gramignano, Lusso, Massa, et al., 2003). Los fármacos administrados en la quimioterapia pueden causar un desbalance entre la producción de ERO y la capacidad de las defensas antioxidantes para removerlas provocando que los mecanismos de defensa no sean suficientes para contener los efectos dañinos de las ERO sobre los procesos celulares, y a su vez esto podría estar relacionado con la frecuencia de recaídas o con la resistencia a fármacos (Conklin, 2004).

El Citocromo P450 es una gran familia de hemoproteínas cuya función es la de convertir agentes xenobióticos así como otros compuestos endógenos en moléculas que pueden ser excretadas más fácilmente. En el proceso del metabolismo de fármacos llevado a cabo a través de algunas enzimas de esta familia se pueden generar metabolitos tóxicos y radicales libres. (Donato, 2000). Dado que todos los quimioterápicos inducen apoptosis en las células neoplásicas, lo que involucra que el citocromo C sea liberado de la mitocondria, esto produce que un flujo de electrones se desvíe de la cadena respiratoria al oxígeno mediante la NADH deshidrogenasa y la coenzima Q10, resultando en la formación de $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Conklin, 2004).

1.8 Daño oxidativo y apoptosis en leucocitos y eritrocitos

La sobreproducción de ERO y el agotamiento de los sistemas de defensa antioxidante produce un estado de estrés oxidativo el cual daña a componentes celulares como el DNA, el cual es susceptible a reacciones de oxidación en componentes como la desoxirribosa y en las bases nitrogenadas pudiendo generar mutaciones somáticas; el daño a proteínas cuya oxidación recae principalmente en residuos de cisteína, metionina, histidina, tirosina, fenilalanina y triptófano puede provocar pérdida o cambios en su función o promover su degradación y el daño a lípidos membranales donde los ácidos grasos poli-insaturados son particularmente susceptibles a la oxidación, provocando alteraciones en la permeabilidad y pérdida de la integridad membranal, así como de organelos celulares (Cárdenas & Pedraza, 2005; González-torres & Ortiz-muñiz, 2000).

Los daños a macromoléculas, se ha propuesto que son factores desencadenantes de apoptosis, y se han agrupado con base en el componente celular que afectan, 1) membrana, 2) citosol, 3) citoesqueleto, 4) mitocondria y 5) núcleo (Kannan & Jain, 2000).

En el caso del daño a membranas, existen estudios que demuestran que la externalización de fosfatidilserina es un evento de aparición temprana durante la apoptosis de diversos tipos celulares de murinos y células humanas, independientemente del estímulo por el cual se haya producido, y se manifiesta previo a muchos otros eventos asociados con este modo de muerte celular (Martín et al., 1995).

La eritosis es un mecanismo empleado fisiológicamente por el organismo para destruir eritrocitos envejecidos sin daño hemolítico, evitando de esta manera la hemólisis dentro del sistema circulatorio, lo que ocasionaría cambios similares a un proceso inflamatorio, con daños renales y alteraciones en la coagulación (Herlax et al., 2011).

Debido a su alto contenido de hierro y ácidos grasos poliinsaturados, y a su rol como transportadores de O₂ con una alta exposición a radicales libres, los eritrocitos son un marcador importante de daño oxidativo sistémico, cuantificable al evaluar su estado redox. La correlación entre el estrés oxidativo y la externalización de fosfatidilserina sugiere que el estrés oxidativo tanto *in vitro*, como *in vivo* induce a la eritosis (Calderón-Salinas et al., 2011). El envejecimiento del eritrocito se caracteriza por un incremento en la concentración de calcio intracelular libre, debido a un incremento en las permeabilidades a calcio que pueden iniciarse por choque osmótico, estrés mecánico, depleción de energía o incremento de los procesos oxidativos que sobrepasen los sistemas de protección antioxidante (Quintanar-Escorza et al., 2010). La muerte suicida de los eritrocitos se caracteriza por una disminución del tamaño y encogimiento de la membrana. Además, la fosfatidilserina, un fosfolípido que normalmente se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática, se transloca a la cara externa. Los eritrocitos que exponen fosfatidilserina hacia la membrana son reconocidos por macrófagos, los cuales engullen y degradan a los eritrocitos en eritosis (Föller et al., 2008; Lang et al., 2005).

Por otro lado, la externalización de fosfatidilserina también se ha usado como un marcador de apoptosis en leucocitos y en diferentes líneas celulares de leucemia aguda humana

(Maioral et al., 2013). Se ha observado que la apoptosis es inducida por diversos fármacos como cicloheximida, actinomicina D y estaurosporina en neutrófilos humanos aislados de sangre periférica, utilizando el conjugado anexina V y fosfatidilserina y citometría de flujo (Martin et al., 1995), sin embargo, no se tiene información de la apoptosis durante las etapas de quimioterapia.

Por lo anterior, en el presente estudio se pretende evaluar dicho parámetro como marcador de daño oxidativo tanto en eritrocitos como en leucocitos, considerando que los primeros están altamente expuestos a oxidación y los segundos son células muy importantes en el proceso de la leucemia.

1.9 Leucemia y citocinas

La transcripción de citocinas proinflamatorias así como de factores involucrados en la adhesión intracelular promueven un ambiente pro-tumorigénico y pueden inducir la metástasis, estos eventos se encuentran regulados por el factor transcripcional NFκB, el cual es clave en el desarrollo de la inflamación y de la respuesta inmune, su activación sostenida es una característica en diversos tipos de cáncer y en leucemia, se encuentra asociada al crecimiento y supervivencia de las células neoplásicas (Rayet & Gélinas, 1999; Zeligs et al., 2016). Se ha descrito que esta activación sostenida del proceso inflamatorio mediado por el desbalance entre citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias conduce a un estado de estrés inflamatorio lo que ha sido reconocido como una base molecular fundamental en la patogénesis de muchas enfermedades (Liu et al., 2017).

Las citocinas son pequeñas proteínas solubles secretadas por diversos tipos celulares que tienen un efecto específico en las comunicaciones celulares. Estas proteínas, al llevar información específica a la célula blanco, actúan sobre receptores en la superficie celular y ocasionan una respuesta, la cual puede ser inflamatoria, causar proliferación o inducir apoptosis. “Citocina” es el término general, existiendo grupos específicos como las linfocinas (citocinas secretadas por linfocitos), monocinas (citocinas secretadas por monocitos), quimiocinas (citocinas con actividad quimiotáctica) e interleucinas (citocinas secretadas por un leucocito y con acción sobre otros leucocitos) (J.-M. Zhang & An, 2009). Tanto las citocinas como las moléculas de adhesión celular han sido estudiadas como marcadores de la activación del sistema inmune en diferentes enfermedades, incluyendo las enfermedades de tipo hematológicas tales como la leucemia (Kupsa et al., 2014); en el caso de las leucemias, el crecimiento y supervivencia de las células neoplásicas, depende de una compleja red de señales intercelulares que se encuentran reguladas a través de “microambientes”, formados en regiones de proliferación como la médula ósea, ganglios linfáticos o tejido adiposo, en donde las citocinas, el acople de moléculas co-estimuladoras y antígenos o una combinación de éstos son una parte esencial en los estímulos proliferativos (Trimarco et al., 2015).

Las citocinas tienen también un papel importante en el desarrollo de las leucemias, tanto en la persistencia de las células malignas, así como en el resultado del tratamiento (Yan et al., 2011). La modulación de la compleja red de citocinas puede alterar la activación de rutas de señalización, lo que podría impactar en el desarrollo de las células neoplásicas al tratamiento (Lippitz, 2013). Los microambientes en los que se desarrollan las células leucémicas tienen gran importancia en la supervivencia y proliferación. En estos “nichos” pueden existir factores solubles que promueven la “comunicación” entre las células leucémicas y las células constituyentes de dichos microambientes lo que puede resultar en la transformación de un nicho celular normal en un nicho celular leucémico, en el que las células leucémicas obtienen ventajas en su desarrollo y en el que rápidamente pueden substituir a las células no neoplásicas (**figura 6**).

Se ha propuesto que las citocinas pueden ser las encargadas de esta comunicación celular y se ha reportado una elevada expresión de diversas citocinas y quimiocinas en el suero, plasma o ambos de pacientes con leucemia linfocítica crónica (CLL) lo cual se ha correlacionado con la evolución clínica de los pacientes (ten Hacken & Burger, 2016).

El factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) es una citocina que tiene un amplio abanico de efectos en una población variada de células y existe evidencia de que TNF- α pudiera ser una citocina constitutivamente producida por células neoplásicas, además de tener importante participación en diversos procesos que controlan la inflamación y en el desarrollo y progreso de enfermedades hematológicas (Tian et al., 2014). TNF- α también ha sido relacionado con efectos clínicos adversos e infiltración extramedular de las células neoplásicas (X. Zhou et al., 2017). La citocina proinflamatoria TNF- α es producida mayormente por los monocitos y macrófagos, aunque también puede ser liberada por linfocitos T y B. Algunas de sus funciones son mediar el factor de expresión tisular en células endoteliales, inducir la activación de neutrófilos, suprimir las células madre hematopoyéticas, mejorar el efecto citolítico de las células *natural killer* e incrementar la citotoxicidad de monocitos y eosinófilos, además se ha reportado que puede inducir diferenciación celular en líneas celulares de leucemia humana (Foa et al., 1990).

La interleucina-6 (IL-6), es una citocina pleiotrópica implicada en la respuesta inmune, y la respuesta de fase aguda. Es producida por una variedad de células, incluidos fibroblastos, células endoteliales, monocitos, células hematopoyéticas y linfocitos (Yu et al., 2008). La IL-6 está involucrada en el reclutamiento de neutrófilos y promueve la migración y proliferación de linfocitos T hacia los tejidos afectados. Los fibroblastos residentes producen metaloproteasas tras la estimulación con IL-6 y degradan la matriz extracelular; la IL-6 también induce la diferenciación y activación de células T. En diferentes tipos de cáncer incluyendo CLL, se han encontrado incrementos en las concentraciones en suero de esta citocina. Su alta concentración se ha relacionado con transformación aguda y mayor proliferación de células neoplásicas, causando una respuesta más agresiva de la enfermedad en LLA y LMA (Sharma et al., 2020).

La interleucina-8 (IL-8) es una citocina que pertenece a la familia de quimiocinas CXC y tiene una función como activador y quimio-atractor de neutrófilos. La IL-8 se produce por diferentes tipos de células tumorales y se ha asociado una concentración elevada de esta citocina en suero con incrementos en el tamaño del tumor, profundidad de la infiltración de las células neoplásicas o en la evolución de la enfermedad (Lippitz, 2013). La concentración de IL-8 ha sido usada como predictivo de la evolución de la enfermedad (Molica et al., 1999); además, en niños con LLA-B se asoció una alta concentración de esta citocina con el desarrollo de síntomas más severos de la enfermedad (fatiga, dolor y nausea) (Hockenberry et al., 2019).

La quimiocina factor 1 (SDF-1), también conocida como CXCL12 es producida por células estromales, se une a su receptor CXCR4, el cual se expresa en células tumorales, mientras que su ligando CXCL12 se expresa en diversos órganos como pulmón, hígado, cerebro, riñón, piel y médula ósea. Se ha reportado que, tras la activación del receptor por su ligando, estos se encuentran involucrados en el desarrollo de metástasis en diversos tipos de cáncer (de Lourdes Perim et al., 2015). El SDF-1, fue inicialmente identificado en células estromales de médula ósea; sin embargo, existe evidencia de su expresión en otros tipos celulares como fibroblastos, adipocitos y células endoteliales (Gelmini et al., 2008). Se ha propuesto que las células neoplásicas migran probablemente tras la estimulación de ésta y otras quimiocinas a microambientes como la médula ósea o el tejido adiposo, lo cual les confiere resistencia ante las drogas quimioterapéuticas (Sheng et al., 2016; Sheng & Mittelman, 2014). Se ha reportado que en niños con leucemia, una alta concentración del receptor de SDF-1, se ha asociado con riesgo clínico de recaída de la enfermedad (Wu et al., 2006). En modelos animales e *in vitro* SDF-1 puede extender la vida de las células leucémicas en la médula ósea y en nichos extracelulares (Barretina et al., 2003; Juarez et al., 2007). Un resumen de las citocinas evaluadas en el presente trabajo se resume en la **tabla 2**.

Tabla 2. Citocinas proinflamatorias relacionadas con la evolución de la leucemia			
Citocina	Fuentes principales	Acción	Relación clínica LLA
TNF- α	Monocitos/macrófagos. Células neoplásicas	Proinflamatoria y autoinmune	En estudios clínicos se ha asociado su mayor concentración con hiperleucocitosis, y parámetros clínicos adversos. En AML se ha asociado con infiltración extramedular de las células neoplásicas (X. Zhou et al., 2017).
IL-6	Monocitos, fibroblastos, linfocitos B y T, y algunas células tumorales	Proinflamatoria y autoinmune	Tanto en ALL como en AML altas concentraciones se han asociado con mayor proliferación de las células neoplásicas y una menor respuesta al tratamiento (Sharma et al., 2020).
IL-8	Monocitos y fagocitos mononucleares.	Quimiotáctica e inflamatoria	Concentraciones elevadas han sido asociadas con síntomas más severos de la enfermedad (Hockenberry et al., 2019).
SDF-1	Células endoteliales, fibroblastos estromales, osteoblastos.	Quimiotáctica y angiogénesis	Concentraciones elevadas se han asociado con infiltración de las células neoplásicas a nichos extramedulares y sistema nervioso central (Bouyssou et al., 2016; Gelmini et al., 2008)

Por lo anterior se ha propuesto que la evaluación de las concentraciones de citocinas en pacientes con leucemia puede tener utilidad en el pronóstico y para evaluar la evolución de la enfermedad y la respuesta a los tratamientos quimioterapéuticos y antioxidantes.

En distintos tipos de cáncer se ha encontrado que el aumento de las concentraciones de citocinas proinflamatorias pueden ser indicadores de mal pronóstico o recaída de la enfermedad, en cáncer de mama se ha reportado, que la mayor concentración de IL-6, IL-2 y TNF- α tiene un pronóstico negativo, siendo este riesgo mayor, cuando el aumento de la concentración es en combinación con alguna de las otras citocinas mencionadas (Esquivel-Velázquez et al., 2015).

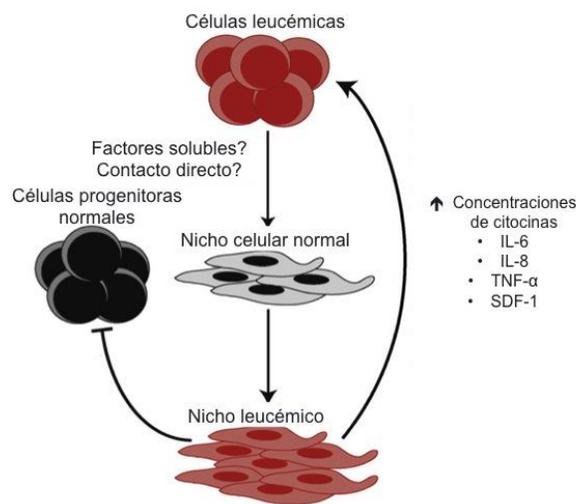


Figura 6. La comunicación celular mediada por factores solubles. Las interacciones entre las células estromales y las células neoplásicas podrían conferirles resistencia, estas interacciones pueden ser mediadas por citocinas circulantes. Modificado de (Kumar et al., 2016).

2. ANTECEDENTES

En un estudio realizado sobre el estado oxidativo/antioxidante en pacientes diagnosticados con diferentes tipos de cáncer (cabeza, cuello, mama, páncreas, colorectal, ovarios, endometrio, melanoma, riñón y mieloma) sin quimioterapia (Mantovani et al., 2003), además de evaluar la concentración de ERO, la actividad de la enzima GPX y las concentraciones de citocinas proinflamatorias (IL-6, TNF- α , IL-1 β , IL-2), se les administró un co-tratamiento de combinaciones de antioxidantes durante diez días (ALA ácido alfa-lipoico 200 mg/día oral; N-acetilcisteína 1800 mg/día intravenoso (I.V); sal de carboxicisteína-lisina 2.7 g/día oral; Amifostina 375 mg/día I.V; GSH 600 mg/día I.V, Vit. A 30000 IU/día oral, vit. E 70 mg/día oral, vit. C 500 mg/día oral).

Cuando los pacientes con cáncer no recibieron el tratamiento con antioxidantes se encontró que tuvieron una mayor concentración de ERO y de las citocinas IL-6, TNF- α y IL-1 β , así como menor actividad de la GPX e IL-2 al ser comparados con los individuos sanos. Posterior al co-tratamiento con antioxidantes, los pacientes con cáncer registraron menor concentración de ERO, y mayor actividad de la GPX (**tabla 3**). Los resultados encontrados sugieren que la suplementación con antioxidantes en pacientes con cáncer podría reducir el estrés oxidativo, disminuyendo las concentraciones de ERO y favoreciendo la respuesta antioxidante (GPX), además de reducir el estrés inflamatorio (menores concentraciones de IL-6 y TNF- α).

Los autores concluyen que la administración de agentes antioxidantes como terapia coadyuvante en el tratamiento del cáncer es segura, al no encontrar ningún efecto adverso en los casos estudiados.

En otros tipos de cáncer, no leucemia, se han realizado estudios del estatus oxidativo e inflamatorio y co-tratamientos con antioxidantes, y se ha discutido ampliamente en artículos de revisión (Block et al., 2008; Fuchs-Tarlovsky, 2013).

Tabla 3. Antioxidantes y citocinas proinflamatorias con pacientes con cáncer sin tratamiento comparados con controles sanos.		
	Comparativo de los pacientes respecto a individuos sanos	Comparativo de los pacientes después de la administración de antioxidantes
ERO	↑	↓
GPX	↓	↑
IL-6	↑	↓
TNF- α	↑	↓
IL-1B	↑	S.C
IL-2	↓	S.C

ERO; especies reactivas de oxígeno. GPx; GPX. Pacientes adultos con cáncer hombres y mujeres entre 34 y 75 años (n=56), controles hombres y mujeres sanos del mismo rango de edad (n=20). S.C, sin cambios. Datos tomados de (Mantovani et al., 2003).

2.1 Estudios de estrés oxidativo y defensa antioxidante en leucemia

Los estudios que se han realizado en leucemia tienen resultados heterogéneos acerca de la evaluación del daño oxidativo y de la defensa antioxidante (enzimática o no enzimática) esto como consecuencia de los diferentes fenotipos de leucemia y del grupo de edad analizados. En la **tabla 4** se presenta un resumen de resultados de 27 publicaciones donde el análisis principal son estatus antioxidante y estrés oxidativo en pacientes con leucemia con poblaciones de n=7 hasta 218.

Los estudios han sido realizados tanto en adultos (9 estudios) como en niños (14 estudios), aunque también se reportan mixtos (4 estudios). El fenotipo más frecuentemente analizado es LLA (14 estudios), para LLC (2), LMC (2), y de más de un fenotipo (9). En estos trabajos 4 han sido estudiados sin los efectos de la quimioterapia, 11 con quimioterapia y 12 han evaluado los resultados al diagnóstico de la enfermedad y después los cambios durante la quimioterapia.

Únicamente en 2 estudios de leucemia se ha evaluado el impacto de un co-tratamiento con antioxidantes. Los análisis de alguna citocina o marcador proinflamatorio son escasos, solo en 3 estudios. Así mismo para la evaluación de apoptosis únicamente en 2 publicaciones.

En algunos de los estudios analizados no es posible realizar conclusiones acerca del estatus antioxidante o del desarrollo de estrés oxidativo debido a la limitación de parámetros evaluados. Además, en algunos resultados es complicado interpretar apropiadamente los datos dado la falta de controles adecuados, o la inexistencia de estos.

En los estudios analizados principalmente se estudian parámetros de daño oxidativo (15 estudios), tales como la concentración de malondialdehído, la carbonilación de proteínas y el daño al DNA. Las concentraciones de especies reactivas de oxígeno son evaluadas en 5 estudios. Se analizan con mayor frecuencia SOD (11), CAT (7), GPX (7), GR (1). Los antioxidantes no enzimáticos más evaluados son las concentraciones de GSH en 9 estudios, Vitamina E en 4 y vitamina C en 1, además de la capacidad antioxidante total, una estimación de la respuesta enzimática y no enzimática combinada se evalúa en 9 trabajos.

Algunos autores han sugerido que el aumento de las respuestas antioxidantes enzimáticas o no enzimáticas es un mecanismo adaptativo a mayores concentraciones de radicales libres generadas por la enfermedad y que esa respuesta logra evitar el daño oxidativo a componentes celulares, sin embargo, los resultados son variables y no siempre se ha reportado una mayor respuesta antioxidante.

Tabla 4. Resumen de estudios en pacientes con leucemia en relación con daño oxidativo, estatus antioxidante y estrés oxidativo y/o proinflamatorio.

Autor	Tipo de leucemia	Etapas de estudio	Resultados	Tratamiento con antioxidantes
(Ahmad et al., 2008)	LMC – adultos (47)	QTx	Mayor carbonilación de proteínas y concentraciones de MDA e hidroperóxidos; menores concentraciones de GSH comparados con 20 adultos sanos.	NO
(Akhgarjand et al., 2018)	LLA – (30) adultos y niños	Antes y después de QTx (2 años)	Después de la QTx mayor actividad de SOD, mayor concentración de Vit E y TAC; menor MDA, sin cambios en concentraciones de proteína C reactiva. No reportan comparaciones con individuos sanos.	NO
(Al-Tonbary et al., 2009)	LLA – niños (40)	QTx	Después de co-tratamiento con antioxidantes en etapas de inducción y consolidación de QTx, mayor actividad de GPX, sin cambios en concentraciones de MDA y TNF- α . Menores complicaciones hematológicas que cuando no se administraron antioxidantes. No reportan comparaciones con individuos sanos.	SI Vit. E y N-acetilcisteína.
(Al-Tonbary et al., 2011)	LLA – niños (50)	Dx y QTx	Mayor concentración de MDA y menor de TAC en suero. Mayor apoptosis en linfocitos comparados con 10 niños sanos.	NO
(Al-Gayyar et al., 2007)	LLC (9) y LMC (11) - adultos	Dx y QTx	Mayor concentración de H ₂ O ₂ en leucocitos y MDA en suero, mayor TAC y GSH. Mayor actividad de SOD y CAT. Menores concentraciones de ácido ascórbico. antes y después del tratamiento comparado con 10 adultos sanos.	NO
(Battisti et al., 2008)	LLA – niños (80)	Dx y QTx y vigilancia	Dx mayor daño oxidativo (carbonilación de proteínas y MDA). Menor actividad SOD y CAT y concentraciones de tioles y vit E en plasma. Tioles en eritrocitos sin cambios pero menores en QTx. Todos los parámetros comparados con 50 niños sanos.	NO
(Demir C., Demir H., Esen R., Atmaca M., 2010)	LMA (25) y LLA (6) - adultos	Dx	Menor actividad de CAT en eritrocitos de pacientes con leucemia.	NO
(Devi et al., 2000)	LLA, y LMC – niños (27) y adultos (3)	Sin QTx	Mayores concentraciones de O ₂ ^{•-} en leucocitos, sin cambios en H ₂ O ₂ . Mayor actividad de GPX y SOD en eritrocitos comparado con 15 individuos sanos.	NO
(Gaman et al., 2014)	LLC – adultos (84)	Dx y QTx	Al Dx menor capacidad antioxidante y mayor ERO. Grupo que recibió antioxidantes tuvo menor TAC sin cambios en ERO y menores infecciones respiratorias bacterianas y virales. No reportan comparaciones con individuos sanos.	SI Vit C
(Hockenberry et al., 2019)	LLA – niños (218)	Durante 18 meses de QTx	Mayor concentración de IL-8 en líquido cefalorraquídeo (LCR) durante los primeros meses de QTx relacionado con el aumento de fatiga, dolor y náusea. No reportan comparaciones con niños sanos.	NO
(Hooke et al., 2020)	LLA – niños (132)	Durante 1 año de QTx	Menores concentraciones de GSH en LCR en las primeras etapas de quimioterapia. No reportan comparaciones con niños sanos.	NO

(Krawczuk-Rybak et al., 2012)	LLA – niños (100)	Dx y QTx	8 niños tuvieron menor TAC antes y durante la QTx comparados con 22 niños sanos.	NO
(ben Mahmoud et al., 2017)	LLA – (34) niños y adultos	Dx y QTx	Mayor actividad de SOD y CAT y menor de GPX; mayores concentraciones de GSH, MDA y carbonilación de proteínas al Dx y QTx comparados con individuos sanos.	NO
(Mazor D., Abucoider A., Meyerstein N., 2008)	LLA – 7 niños	QTx	Menor capacidad antioxidante total evaluada por 3 métodos en suero y comparada con adultos sanos.	NO
(I. M. Moore et al., 2015)	LLA – niños (55)	Al Dx y en etapas de QTx intratecal	Mayor concentración de fosfatidilcolina y fosfatidilinositol en LCR en la quimioterapia. No reportan comparaciones con niños sanos.	NO
(I. M. (Ki) Moore et al., 2018)	LLA – niños (71)	Al Dx y en etapas de QTx intratecal	Mayores concentraciones de GSH y mayor actividad de caspasas 8 y 3/7 en leucocitos de LCR en la quimioterapia. No reportan comparaciones con niños sanos.	NO
(Naz et al., 2013)	LLA (50) y LMA (30) - adultos y niños	Dx y QTx	Al Dx mayor actividad de SOD, GR y TAC. Después del tratamiento mayor SOD y menores GR y TAC comparada con 40 individuos sanos.	NO
(Papageorgiou et al., 2005)	LLA (15) y LMA (2) - niños	Dx y QTx	TAC sin cambios al Dx, pero menor en la quimioterapia comparada con niños sanos.	NO
(Raber et al., 2019)	Leucemias y linfoma – niños (32)	Dx y QTx	Mayores concentraciones en leucocitos mononucleares de H ₂ O ₂ , O ₂ ⁻ , y de GSH durante la QTx. No reportan comparaciones con niños sanos.	NO
(Rasool et al., 2015)	LLA y LMA – adultos (50)	QTx	Mayor concentración de MDA; Menores concentraciones de GSH y Vit E; Menores actividades de SOD, CAT y GPX comparados con 20 adultos sanos.	NO
(Rodgers et al., 2016)	LLA – niños (38)	Al Dx y QTx	Menor tasa de GSH/GSSG en LCR en la quimioterapia, relacionado con anemia, malnutrición e infecciones. No reportan comparaciones con niños sanos.	NO
(Sarmiento-Ribeiro et al., 2012)	LLC (29) y LLA (23) - adultos	Dx y QTx	Al Dx menores actividades de SOD y GPX; menores concentraciones de Vit E y GSH; mayores concentraciones de peróxidos dependientes del fenotipo de leucemia. Resultados comparados con 49 individuos sanos	NO
(Sentürker et al., 1997)	LLA - 9 niños	QTx	Menores actividades de SOD, CAT y GPX y mayor daño a DNA en linfocitos de pacientes comparados con 10 niños sanos.	NO
(R. K. Singh et al., 2009)	LMC – adultos (40)	QTx	En QTx mayor carbonilación de proteínas, concentraciones de MDA e hidroperóxidos de lípidos en plasma comparados con 20 individuos sanos.	NO

(Fayh et al., 2018)	LLA – niños (19)	Antes y después de QTx	Después de QTx de inducción menor concentración de proteína C reactiva y MDA.	NO
(Zelen et al., 2010)	LLC – adultos (29)	Dx	Mayor actividad de CAT y concentración de MDA en plasma. Sin diferencias en las concentraciones de H ₂ O ₂ , O ₂ [•] , ni las actividades de SOD y GPX comparado con individuos sanos.	NO
(F. Zhou et al., 2007)	LLA (62) y LMA (30) – adultos	Sin QTx	Menor actividad de SOD y menor TAC; mayores concentraciones de ERO y de MDA comparados con adultos sanos.	NO

En los estudios que se muestran en la **tabla 4** los cuales corresponden a diferentes tipos de leucemia se puede observar que son escasos los estudios con intervención que emplean co-tratamientos con antioxidantes, por lo que no se pueden generar conclusiones del estado antioxidante dadas las diferentes poblaciones, condiciones y parámetros evaluados. Y aún resultan más limitados los estudios donde se evalúen condiciones inflamatorias o de apoptosis.

3. JUSTIFICACIÓN

Tanto la leucemia como la quimioterapia pueden generar estrés oxidativo; además, se ha propuesto que la respuesta inflamatoria sostenida tiene un papel importante en el desarrollo y persistencia de la leucemia. El desarrollo de un estado oxidante y proinflamatorio, así como los efectos tóxicos del tratamiento, pueden producir la disminución o la interrupción de la dosis de la quimioterapia, provocando resistencia y recaída de la leucemia.

Algunos co-tratamientos con antioxidantes han mostrado resultados positivos reduciendo el estrés oxidativo en otras enfermedades de carácter oxidativo, incluidos otros tipos de cáncer. Una menor concentración de las citocinas proinflamatorias y un menor estrés oxidativo podría estar relacionado con un estado menos agresivo de la enfermedad y una mejor evolución del tratamiento conduciendo a la remisión de los pacientes.

Por lo antes dicho, resulta de interés establecer estudios que evalúen si el co-tratamiento con antioxidantes exógenos modifica parámetros del estado oxidativo e inflamatorio en pacientes con LLA-B.

4. HIPÓTESIS

La administración de ácido ascórbico y α -tocoferol como terapia de apoyo al tratamiento quimioterapéutico en pacientes pediátricos diagnosticados con LLA-B, mejorará la respuesta enzimática y no enzimática antioxidante, lo que permitirá reducir el estrés oxidativo y el estado proinflamatorio de los pacientes, evitando el daño oxidativo.

5. OBJETIVO GENERAL

Estudiar si el co-tratamiento con antioxidantes (vitaminas C y vitamina E) mejora la respuesta antioxidante de los pacientes y evita o disminuye el estrés oxidativo y proinflamatorio en pacientes pediátricos con LLA-B al diagnóstico y durante la quimioterapia. Asimismo, comprender los mecanismos y alteraciones del estatus antioxidante-oxidante ocurridas durante el desarrollo de LLA-B y su tratamiento.

5.1 Objetivos Específicos

1. Conformar un grupo de niños diagnosticados con LLA-B por primera vez en el HRAEB
2. Establecer un programa de tratamiento con antioxidantes vitamina C y vitamina E.

Al diagnóstico de LLA, durante las fases de la quimioterapia y tras el co-tratamiento con antioxidantes se realizaron los siguientes objetivos:

3. Evaluar el desarrollo de daño oxidativo, analizando la lipoperoxidación en eritrocitos.
4. Determinar si se genera estrés oxidativo en plasma y eritrocitos a partir del análisis de elementos de la defensa antioxidante, la actividad de las enzimas CAT y GPX, así como la respuesta antioxidante total en plasma y la concentración de GSH.
5. Evaluar la apoptosis de eritrocitos y leucocitos mediante la externalización de FS.
6. Analizar las concentraciones de citocinas proinflamatorias TNF- α , IL-6 e IL-8 y quimiocina SDF-1 en plasma.
7. Efectuar una correlación entre los parámetros de estrés oxidativo, estatus antioxidante y pro-inflamatorio en el diagnóstico y diferentes fases de la quimioterapia, así como tras el co-tratamiento con antioxidantes.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL

El presente trabajo se llevó a cabo en colaboración con el Hospital Regional de Alta Especialidad del Bajío. El protocolo se conformó por niños y niñas diagnosticados con leucemia en el servicio de pediatría oncológica del Hospital HRAEB-León, Guanajuato. Realizamos un estudio clínico longitudinal descriptivo y de seguimiento con una duración de 3 años. Los resultados se compararon con niños clínicamente sanos de la misma región y con condiciones socioeconómicas similares, sin tratamiento farmacológico ni evidencia de ingesta de antioxidantes en los últimos 2 meses. El protocolo fue aprobado por los comités de investigación científica y ética (CI-HRAEB-2015-025 y CNBCEI-11-000-2009.05.01/CEI-02-15); se obtuvo el consentimiento de los padres para todos los participantes. El número de pruebas varió debido a las diferencias en el volumen de muestra de sangre obtenida, el estado clínico de los pacientes y el programa de consultas por parte de los médicos tratantes.

Criterios de inclusión:

- Niños o niñas del área de oncología pediátrica (0-18 años) del hospital HRAEB.
- Diagnóstico inicial de leucemia
- Consentimiento de los tutores a participar en el estudio

Criterios de exclusión:

- Pacientes con leucemia mayores de 18 años
- Niños con diagnóstico de leucemia más enfermedades adicionales (síndrome de Down, de Klinefelter, cirugías recientes, otros tipos de cáncer).
- Sin consentimiento a participar en el estudio

Las muestras de sangre fueron obtenidas en tubos vacutainer con heparina como anticoagulante y conservadas en refrigeración a una temperatura de 4 °C hasta su recepción en el laboratorio de bioquímica médica en donde se procesaron en un lapso no mayor a 48 h a partir de ser obtenidas. Antes de la toma de muestra de los pacientes incluidos en el protocolo, siempre se valoró primero si la condición clínica de los niños permitía el procedimiento mediante los criterios médicos a cargo del consejo de oncopediatria del HRAEB.

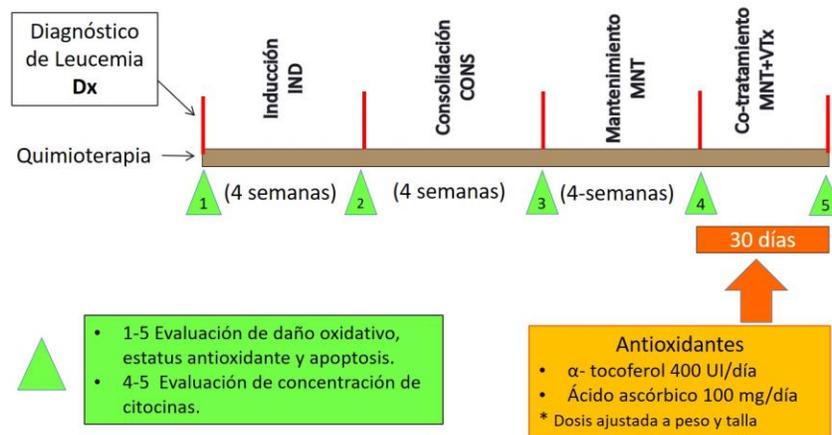


Figura 8. Diseño del estudio. Al diagnóstico así como en las diferentes fases de la quimioterapia (barra sólida) se obtuvieron muestras sanguíneas de niños con leucemia (triángulos numerados 1-5); se realizaron pruebas para determinar daño oxidativo (MDA 1-5), estatus antioxidante (actividad de CAT y GPX, y capacidad antioxidante total 1-5), concentraciones de glutatión (4-5) y estatus proinflamatorio (concentraciones de TNF- α , IL-6, IL-8 y SDF-1 4-5). Los antioxidantes se administraron 4 semanas después de iniciar la quimioterapia de mantenimiento MNT y se evaluó una siguiente etapa MNT+VTx después de 30 días (4-5).

La estructura del estudio se llevó a cabo mediante el análisis de muestras de sangre en el diagnóstico y tras 4 semanas del curso de las diferentes etapas del tratamiento (inducción, consolidación y mantenimiento) de los niños. Durante la quimioterapia de mantenimiento (30 días después de su inicio) les fue administrado un co-tratamiento con antioxidantes compuesto por vitamina E y C (alfa-tocoferol acetato 400 UI y ácido ascórbico 100 mg acorde a peso y talla, diariamente por vía oral) durante 30 días. En la **figura 8** se muestra un esquema de la estrategia experimental.

El hospital administró a los pacientes un tratamiento estándar para leucemia, el protocolo de quimioterapia “Total XV modificado para su adaptación a países en vías de desarrollo”, emitido por el St. Jude Children’s Research Hospital. Este tratamiento clasifica a los pacientes según el factor de riesgo mediante factores pronósticos como la edad, el recuento leucocitario, la presencia de anomalías citogenéticas, la presencia o ausencia de enfermedad en el sistema nervioso central y el cariotipo al momento del diagnóstico.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Evaluación de la concentración de glutatión reducido

Se determinó la concentración de glutatión en su forma reducida en plasma. Mediante espectrofotometría se cuantifica la formación del aducto GSH-DTNB, (glutatión reducido-5,5'-dithio-bis (2-ácido nitrobenzoico)) a 412 nm, este compuesto de coloración amarilla proporciona una estimación de la cantidad de glutatión reducido presente en la muestra; a este ensayo se le conoce también como “ensayo de reciclamiento” y se describe a continuación (Rahman et al., 2007).

A partir de sangre total, se separó la fracción de plasma centrifugando a 1000 xg durante 10 min a 4° C, posteriormente se tomaron 400 µL de la región superior del plasma y se trasladó a un tubo eppendorf añadiendo el mismo volumen de ácido sulfosalicílico al 0.6%, esta mezcla se centrifugó a 8000 xg por 10 min a 4° C, posteriormente se recupera el sobrenadante en un tubo eppendorf y se usa para el ensayo inmediatamente o se reserva a -80° C. El ácido sulfosalicílico inhibe la actividad de la enzima glutatión transferasa lo que previene la pérdida de glutatión reducido.

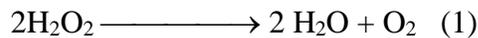
Se prepararon los estándares para construir una curva disolviendo 5 mg de glutatión reducido en 5 mL de buffer KPE (solución stock), esta mezcla se puede preservar a -20° C. Al realizar el ensayo se prepara la solución de trabajo diluyendo la solución stock 1:100 en buffer KPE (solución de trabajo 10 µg/mL), a partir de esta e inmediatamente previo al ensayo se diluyeron 800 µL de la solución de trabajo en 20 µL de buffer KPE obteniendo la concentración más alta de glutatión reducido 26.4 nM a partir de la cual se realizaron diluciones seriadas hasta obtener 0.103 nM. Se utilizó el buffer KPE como blanco del ensayo.

El ensayo se llevó a cabo en cajas de 96 pozos, en cada pozo se agregó 20 µL de buffer KPE (16 mL de solución A+84 mL de solución B y se ajustó el pH a 7.5 con 0.327 g de EDTA). El buffer KPE se prepara fresco cada vez. La solución A contiene 6.8 g de KH_2PO_4 en 500 mL de H_2O , la solución B contiene 8.5 g de K_2HPO_4 o 11.4g de $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ en 500 mL de H_2O (ambas soluciones pueden preservarse a 4 °C). Posteriormente se agregaron 20 µL de los estándares o de muestra según corresponda por duplicado, se recomienda utilizar sólo la mitad de la placa dado que se trata de un ensayo enzimático. Después se agregaron 120 µL de una mezcla de volúmenes iguales de DTNB (2 mg de DTNB en 3 mL de KPE) y GR glutatión reductasa (40 µl de GR (250 unidades/mL) en 3 mL de KPE, mezcla sensible a la luz), a los 30 seg se añaden 60 µl de NADPH (2 mg de NADPH en 3 mL de KPE). Inmediatamente se leyó la absorbancia a 412 nm en un lector de microplacas tomando lecturas cada 30 seg durante 2 min. La tasa de formación del compuesto GSH-DTNB expresa la cantidad de GSH la cual se calculó utilizando una regresión lineal a partir de los valores obtenidos en la curva. Cada lectura por intervalo de tiempo genera una ecuación de la que posteriormente se grafican las pendientes para obtener una curva general. Los valores se

expresaron en μM tras normalizar el valor de la concentración de proteínas en plasma mediante el método de Lowry el cual se describe más adelante.

7.2 Análisis de la actividad de la enzima Catalasa

La actividad enzimática de la CAT se determinó en eritrocitos mediante un ensayo de colorimetría previamente reportado. Se basa en evaluar el consumo del peróxido de hidrógeno, sustrato de dicha enzima el cual reduce a agua y oxígeno (reacción 1) y su disminución se monitorea a 240 nm. La diferencia en la absorbancia por unidad de tiempo es una medida de la actividad de la CAT. Los valores se expresan en unidades por gramo de hemoglobina (U/g Hb) (Aebi H., 1984). El ensayo se describe a continuación.



Se separó una fracción de sangre total en un tubo Eppendorf de 2 mL y se realizaron 3 lavados con NaCl al 0.1 % para obtener un concentrado eritrocitario al retirar el plasma y leucocitos (la capa blanca intermedia entre el plasma y el paquete eritrocitario) mediante un aspirado del sobrenadante.

Se realizó una dilución de 200 μL del concentrado eritrocitario en 800 μL de H_2O a 4° C para lisar los eritrocitos, adicionalmente fueron sometidos a agitación mecánica en vortex a su máxima velocidad durante 2 min. Con el lisado celular obtenido se prepara una dilución de 10 μL en 4990 μL de PBS (en mM): 16 de Na_2HPO_4 , 137 de NaCl y 1.4 de NaH_2PO_4 pH ajustado a 7.4 con HCl.

Para iniciar la reacción, se utilizó una concentración de 30 mM de H_2O_2 en PBS y en una celda de cuarzo se adicionaron 350 μL de esta preparación en 750 μL de la preparación de lisado celular y se midió la ABS a una longitud de onda de 240 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-600 durante 60 seg en intervalos de 15 seg.

En la **figura 9** se muestran los resultados de la estandarización del ensayo de actividad de CAT. En el recuadro A se probaron concentraciones crecientes de H_2O_2 registrando la absorbancia a 240 nm para determinar la concentración óptima, la cual se obtuvo entre ABS= 0.45-0.55. En el recuadro B, se muestra una curva representativa del consumo de H_2O_2 en el ciclo de actividad de CAT durante 60 segundos.

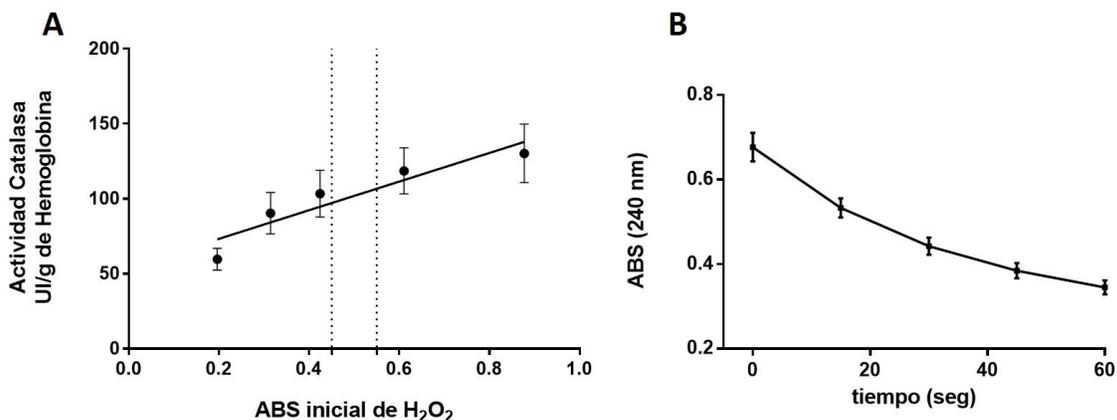


Figura 9. Estandarización del ensayo de la actividad de CAT con eritrocitos control. A) Absorbancias crecientes de H₂O₂ a 240 nm para optimizar la actividad de CAT. Entre líneas punteadas absorbancia óptima usada en los experimentos sucesivos (n=4). B) Curva del consumo de H₂O₂ a 240 nm por la actividad de CAT (n=5).

7.3 Análisis de la peroxidación lipídica

Se determinaron los niveles de lipoperoxidación en eritrocitos mediante la concentración de MDA, un producto final de la lipoperoxidación puede reaccionar con el TBA (ácido tiobarbitúrico) formando un complejo colorido cuya absorbancia puede detectarse a 532 nm mediante espectrofotometría (Jain et al., 1989).

El ensayo se realizó en un concentrado de eritrocitos los cuales se obtuvieron mediante lavados de un volumen de sangre total con una solución de NaCl al 0.1 % en H₂O y centrifugando cada vez a 3500 rpm durante 5 min, retirando el plasma y leucocitos. Se realizó una dilución de 200 µL del concentrado de eritrocitos en 800 µL de PBS 10 mM, en g: (8.1NaCl, 2.302 Na₂HPO₄, 0.194 NaH₂PO₄ aforando en 1 L de H₂O y se ajustó el pH a 7.4) y se adicionaron 0.025 µL de butil hidroxitolueno (BHT) en EtOH (88 mg de BHT en 10 mL de etanol) más 500 µL de ácido tricloroacético (TCA) al 30% en H₂O se colocó en agitación con vortex entre la adición de cada reactivo. Esta mezcla fue incubada en baño de hielo protegida de la luz durante 2 h y posteriormente sometida a centrifugación 3000 RPM durante 15 min, el sobrenadante se recuperó en tubos de ensayo de cristal y se les adicionó 0.075 µL de EDTA 0.1M en H₂O más 500 µL de TBA al 1% en NaOH 0.05 N y la mezcla fue agitada en un vortex. La mezcla se incubó en baño maría a ebullición durante 15 min semicubierta para disminuir la pérdida de material por evaporación y después se permitió enfriar para finalmente leer la absorbancia a 532 y 600 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-600. Se restó la absorbancia de 600 nm para disminuir la interferencia en el resultado debido a la formación de complejos no específicos. Los valores se expresan en nmol de MDA por mL de eritrocitos utilizando el valor de hematocrito para calcular el volumen de células y el coeficiente de extinción molar del complejo TBA-MDA $1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} * \text{M}^{-1}$.

7.4 Ensayos de oxidación *in vitro*

Se realizaron los ensayos de oxidación *in vitro* en muestras de sangre de individuos clínicamente sanos, se utilizó la técnica de lipoperoxidación descrita. Posterior a la separación de eritrocitos, los concentrados eritrocitarios fueron incubados a diferentes concentraciones y tiempos con los compuestos oxidantes descritos en la **tabla 5**. Posteriormente a la incubación, se realizó un lavado con búfer de fosfatos PBS 10 mM centrifugando cada vez a 3500 RMP para retirar la solución con oxidantes y proceder con los pasos siguientes del ensayo de lipoperoxidación.

Reactivo oxidante	Tiempo (min)	Concentración (mM)
Peróxido de hidrógeno H ₂ O ₂	5	[0.5, 15]
Hidroperóxido de cumeno	60	[0.1, 0.5, 15]
Menadiona	60	[0.1, 0.25, 0.45]

7.5 Análisis de la Eriptosis y apoptosis leucocitaria por daño oxidativo

Este ensayo es utilizado para la detección de la apoptosis en leucocitos y en eritrocitos (eriptosis). Un evento característico de la apoptosis es la externalización de la fosfatidilserina (FS) desde el lado citosólico hacia la superficie externa de la membrana plasmática (Abed et al., 2017; Lang et al., 2005). La anexina V-FITC es un conjugado proteína-fluoróforo que se une a la FS con especificidad en presencia de CaCl₂ y dado que no es permeable a la membrana únicamente tiene la unión en la cara externa de las células. El conjugado anexina V-FITC puede cuantificarse mediante citometría de flujo (Vermes et al., 2000).

Para el ensayo de eriptosis, se utilizó un concentrado de eritrocitos obtenidos a partir de sangre total mediante 3 lavados con una solución de NaCl al 0.1 % en H₂O centrifugando cada vez a 3500 rpm durante 5 min y se retiró el sobrenadante de plasma y leucocitos. Se realizó una dilución de 10 µL de los eritrocitos en 4990 µL de búfer de fosfatos PBS 10 mM y se transfirieron 200 µL de la mezcla de eritrocitos a un tubo eppendorf en el que se realizaron 3 lavados con buffer de unión para favorecer la unión con anexina V. El buffer de unión tiene la siguiente composición (mM): Hepes 10, NaCl 140, CaCl₂ 2.5 y pH 7.4 con NaOH. Posteriormente, 200 µL de la suspensión de eritrocitos y el búfer de unión fueron incubados con 1 µg/ µL de anexina V-FITC protegidos de la luz durante 5 min, cumplido este tiempo el proceso de lavado con buffer de unión 3 veces se repitió para retirar el exceso del fluorocromo. Fueron analizados mediante citometría de flujo 20000 eventos en un citómetro de flujo marca Calibur. Los resultados se expresan como porcentaje de células positivas al fluorocromo.

El ensayo para la detección de la apoptosis de leucocitos se realizó en sangre total mediante un panel multiparamétrico para detección por citometría de flujo. En tubos eppendorf, se incubaron 0.4 µL del fluorocromo (**tabla 6**) con 20 µL de sangre total protegidos de la luz durante 20 min. Se preparó un buffer de lisis 10X para eritrocitos que contiene (en g/10 mL H₂O): NH₄Cl 8, NaHCO₃ 0.84, EDTA disódico 0.37 (preservar a 4°C), al momento del ensayo se ajusta la solución a 1X. Se añadieron 200 µL del búfer de lisis a la mezcla

incubando durante 20 min, posteriormente, se añadieron 200 µL de buffer de unión y 1 µg/µL de anexina V acoplado al fluoróforo FITC y 1 µL de yoduro de propidio y fueron incubados protegidos de la luz durante 5 min. Se realizó lectura de 20000 eventos en un citómetro de flujo Fortessa.

Tabla 6. Fluorocromos para detección de leucocitos en apoptosis y necrosis.	
Detección	Fluorocromo
CD19 - linfocitos B	APCCy7 (633-784 nm)
CD45 - leucocitos	VB450
Anexina V - Apoptosis	FITC (488-530 nm)
Yoduro de propidio - necrosis	PECy7 (488-776 nm)

7.6 Análisis de la capacidad antioxidante total

La capacidad antioxidante total fue determinada mediante la formación del radical catión 2,2'-azino-di (3-etilbenzotiazohín sulfonato (ABTS) debido a la acción de la metamioglobina/H₂O₂. Este radical presenta una coloración verde azulada que se cuantifica en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm. La presencia de antioxidante en la mezcla evita la formación del radical y por ende de la coloración, siendo ésta proporcional a la actividad antioxidante. El método utiliza el Trolox (un derivado sintético de la vitamina E) como comparativo a la capacidad antioxidante de la muestra (Kambayashi et al., 2009).

El ensayo se realizó en plasma en una dilución 1:25 en búfer de fosfatos PBS 10 mM pH 7.2 y fueron utilizadas cajas de 96 pozos. Se preparó un stock de trolox 2.56 mM en PBS que puede preservarse a -80°C. Al momento del experimento se realizó una dilución 1:10 para obtener una concentración de 256 µM y se construyó una curva mediante diluciones seriadas utilizando el PBS como blanco. En cada pozo se colocaron 90 µL de PBS, 50 µL de mioglobina de bovino 4.5 µM, 20 µL de ABTS 3mM y 20 µL de la muestra o de las diluciones de trolox. La reacción se inició con 20 µL de H₂O₂ 250 µM en PBS y se leyó la absorbancia a 600 nm en un lector de microplacas por 8 min. Los valores se expresan como µM equivalentes de trolox y se obtienen utilizando una regresión lineal a partir de los valores obtenidos en la curva.

7.7 Análisis de la actividad de la enzima glutatión peroxidasa

La actividad de la enzima GPX se cuantificó en plasma (Paglia, D.E. and Valentine, 1967), la isoforma predominante de GPX en plasma corresponde mayoritariamente a la 3 y cataliza la siguiente reacción:



El consumo de NADPH (reacción 2) se siguió mediante reacciones acopladas a una longitud de onda de 340 nm mediante espectrofotometría, se consume por la glutatión reductasa en la siguiente reacción:



El consumo de NADPH es proporcional a la formación de GSH necesario para llevar a cabo la reacción 1 por la GPX, lo que proporciona una estimación de su actividad, el ensayo se describe a continuación.

Las muestras de plasma fueron procesadas inmediatamente después de separarlas del paquete eritrocitario o bien se mantuvieron preservadas a -80°C hasta su procesamiento. Durante todo el ensayo tanto las soluciones como las muestras se mantuvieron en baño de hielo y se prepararon con H_2O . Se rotularon tubos de ensayo y por duplicado se les agregó: $640\ \mu\text{L}$ de PBS ($50\ \text{mM}$ pH 7.0), $100\ \mu\text{L}$ de glutatión reducido (GSH $30\ \text{mM}$), $100\ \mu\text{L}$ de NADPH ($2\ \text{mM}$), $10\ \mu\text{L}$ de glutatión reductasa $100\ \text{U/mL}$, $100\ \mu\text{L}$ de la muestra diluida 1:50 en PBS y $30\ \mu\text{L}$ de azida de sodio para una concentración final de $15\ \text{mM}$ y fue agitado en vortex. La mezcla fue incubada durante $15\ \text{min}$ a temperatura ambiente para permitir la conversión del glutatión oxidado a reducido y se registró la absorbancia del NADPH en una celda de cuarzo a una longitud de onda de $340\ \text{nm}$ en un espectrofotómetro. La absorbancia del NADPH debe registrarse mayor a 1 ($1-1.2$) de manera equilibrada con la finalidad de evitar el agotamiento del NADPH durante el ensayo, en caso contrario se agregó una cantidad del NADPH recién preparado. Posteriormente se transfirió la mezcla del tubo de ensayo a la celda de cuarzo y se inició la reacción añadiendo $50\ \mu\text{L}$ de hidróperóxido de cumeno ($30\ \text{mM}$) mezclando con la pipeta e inmediatamente se tomaron lecturas a $340\ \text{nm}$ cada $30\ \text{seg}$ durante $5\ \text{min}$ en la modalidad *kinetics time*. Los valores se expresan en unidades por litro de plasma, 1 unidad se define como la cantidad de enzima que oxida a $1\ \mu\text{mol}$ de NADPH a NADP^+ por minuto por mg de proteína. Los valores de proteína fueron estandarizados mediante el método de Lowry. Se calculó el diferencial entre la absorbancia del NADPH a los diferentes tiempos utilizando en coeficiente de extinción molar del NADPH $6.22\ \text{mM}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$.

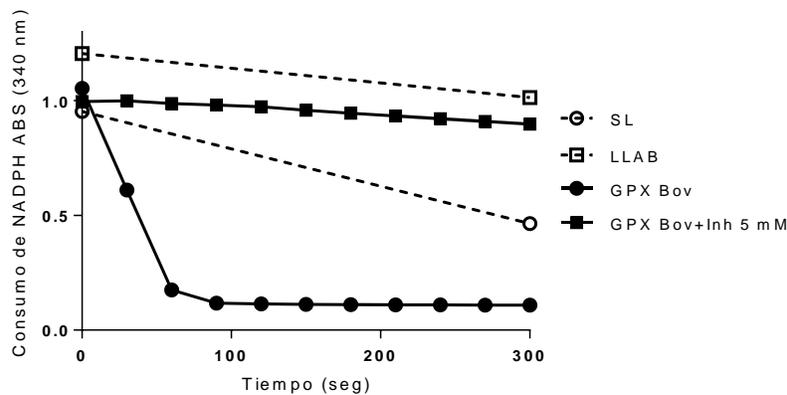


Figura 10. Experimentos representativos de la actividad de GPX en plasma evaluada mediante el consumo de NADPH. (SL) plasma de un niño sin leucemia, (LLAB) paciente con LLA-B, (GPX Bov) GPX purificada de eritrocito de bovino y GPX purificada de eritrocito de bovino+inhibidor (iodoacetamida).

En ensayo de GPX se comprobó usando diferentes condiciones. En la **figura 10** se muestra el gráfico del consumo de NADPH a diferentes tiempos, el cual es inversamente proporcional

a la actividad de la GPX; se usaron muestras de plasma de pacientes sanos y con leucemia, y como control positivo la GPX purificada de eritrocitos de bovino y una concentración de 5 mM de iodoacetamida como un inhibidor de GPX.

7.8 Análisis para evaluar las concentraciones de citocinas

Las concentraciones de citocinas TNF α , IL-6, IL-8 y SDF-1 fueron cuantificados mediante la técnica de ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) con kits comerciales (Biolegend para TNF-alfa humano, IL-6, IL-8 e Invitrogen para quimiocina humana SDF-1a). Esta técnica, es un inmunoensayo donde se utilizan reacciones antígeno-anticuerpo enlazados a una enzima; al estar presente un sustrato específico de dicha enzima se puede cuantificar su actividad, y de manera indirecta la citocina de interés, por espectrofotometría. Las citocinas y las quimiocinas proinflamatorias se cuantificaron mediante la prueba ELISA “Sandwich”. La absorbancia se midió a 450 nm en un lector de microplacas. Se preparó una curva estándar trazando el valor de absorbancia de los estándares contra las concentraciones correspondientes. La concentración de la citocina en la muestra se determinó extrapolando a partir de la curva estándar (Al-Tonbary et al., 2009; López-Vanegas et al., 2020).

7.9 Análisis de la concentración de proteínas

Algunos de los ensayos previamente descritos, fueron ajustados de acuerdo con la concentración de proteína presente en la muestra, mediante el método de Lowry con desoxicolato (Lowry O., Rosebrough A., Farr A.L., 1951).

Se prepararon las siguientes soluciones:

Solución A: 10 g de Na₂CO₃, 2 g de NaOH, 0.134 g de KNaC₄H₄O₆ • 4 H₂O, en 500 ml de H₂O_D. Solución B: 0.125 g de CuSO₄ • 5H₂O en 25 mL de H₂O_D. Desoxicolato de Na⁺ al 1% en H₂O_D. Reactivo de Folin en una dilución 1:1 con agua desionizada. BSA (1mg/mL). Solución C: se prepara al momento de usar, 100 mL de solución A con 1 mL de Sol. B.

Se utilizó un volumen de 5 μ L de muestra en un tubo Eppendorf y se aforó a 800 μ L, se adicionaron 100 μ L de desoxicolato, 2 mL de sol. C, y 100 μ L de reactivo de Folin diluido, se agitó en vortex y se incubó 15 min a temperatura ambiente y se midió la ABS a 750 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-600. La cantidad de proteínas en la muestra se estimó interpolando los valores en una curva de calibración que se construyó determinando la ABS, de cantidades conocidas de albúmina sérica bovina (BSA).

7.10 Concentraciones de vitamina C y E.

Los ensayos de determinación de la concentración de vitaminas en plasma fueron realizados en las instalaciones del HRAEB. Las concentraciones de Vit C fueron determinadas mediante una técnica colorimétrica en kit comercial de la marca DRG (ENZ 4888). Las concentraciones de Vit E se determinaron mediante HPLC.

8. RESULTADOS

8.1 Población de estudio

Se realizó un estudio clínico de seguimiento longitudinal y descriptivo, el protocolo se conformó con 92 niños diagnosticados con leucemia, en diferentes fases de quimioterapia. De los cuales fueron 51 niños de edades de 9 ± 4.5 y 41 niñas de edades de 10 ± 5 . Fallecieron a la fecha final del estudio 20 pacientes de los cuales 12 eran niños con LLA-B y 1 con LMA; además de 6 niñas con LLA-B y 1 CrPh+.

De acuerdo con el riesgo los pacientes se clasificaron de la siguiente manera: 27 de riesgo bajo y habitual, 59 de riesgo alto y 6 de riesgo muy alto.

En la clasificación por fenotipo de leucemia se encontraron 70 pacientes diagnosticados con leucemia linfoblástica aguda fenotipo LLA-B. 6 pacientes con LLA-B con expresión mieloide aberrante, 4 LLA-B con presencia de cromosoma filadelfia, 8 leucemia mieloblástica aguda, 4 leucemia linfoblástica fenotipo T. LLA-B 37 niños y 33 niñas, LLA-B exp LMA 3 niños y 3 niñas, LLA-B CrPh+ 3 niños y 1 niña, LMA 5 niños y 3 niñas y LLA-T 3 niños y 1 niña.

39 pacientes tuvieron 3 o más etapas analizadas, 25 tuvieron 2 etapas y el resto (28) solo tuvieron una etapa analizada por causas diferentes: paciente en remisión, vigilancia, por abandono de tratamiento, sin seguimiento, estado de gravedad crítico o fallecimiento o bien por recomendación del consejo de oncopediatria.

29 se estudiaron en la etapa de diagnóstico, 34 en inducción, 27 en consolidación, 49 en mantenimiento, 41 recibieron co-tratamiento con antioxidantes, 14 recaídas y 7 fueron analizados en etapa de vigilancia. De acuerdo con los resultados al momento en que se concluyó este protocolo, el porcentaje de pacientes que tuvieron una evolución clínica favorable correspondió al 78%, en reportes con mayor número de niños se ha indicado que la tasa de supervivencia para el fenotipo LLA-B es superior al 90% no obstante esta tasa de varía según el subtipo (American Cancer Society, 2018).

Se administró a los niños del protocolo de leucemia un co-tratamiento con vitaminas antioxidantes C y E, 1 mes después de comenzar la fase del mantenimiento de quimioterapia con una duración de 4 semanas, de acuerdo con el peso y la talla se estableció una dosis de ácido ascórbico 100 mg/día y alfa-tocoferol en dosis de 400 U.I/día ambos administrados por vía oral.

Para establecer parámetros de comparación de los resultados del grupo de pacientes con leucemia se obtuvieron muestras de sangre de 52 niños y niñas sanos de edades similares (9.4 ± 3.3), de la misma región geográfica y de condiciones socioeconómicas similares. Todos fueron revisados por el equipo médico del laboratorio confirmando mediante exploración e historia clínica que se trató de niños clínicamente sanos, además, ninguno de ellos se encontró bajo tratamiento farmacológico o con ingesta de vitaminas.

Previo a la quimioterapia, se evaluaron las concentraciones de vitaminas C y E en plasma de pacientes integrados al protocolo de estudio (**figura 11**). Según lo reportado por la FAD en 2017, los valores óptimos en plasma de estos micronutrientes son (señalados en la figura entre líneas punteadas transversales), para vitamina C (panel A) entre 12.5 y 20 mg/L, para la vitamina E entre 5 y 12 $\mu\text{g/mL}$ (panel B). Los resultados obtenidos se presentan en gráficos de dispersión (media \pm DE). En el caso de la vitamina C el 31% de los niños tuvo deficiencia; en el caso de la vitamina E, todos los pacientes analizados presentaron deficiencia del micronutriente.

No fue posible realizar el análisis posterior al tratamiento.

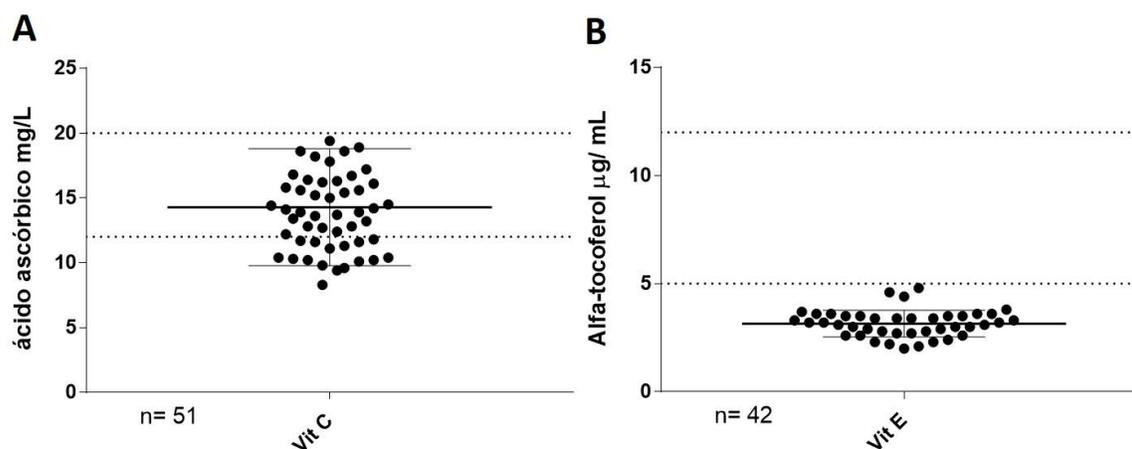


Figura 11. Gráficos de dispersión de la concentración de vitaminas en plasma de niños con leucemia previo a la quimioterapia; media \pm DE. A) Vitamina C. B) Vitamina E. Entre líneas punteadas (eje Y), valores reportados como normales (FAD, 2017).

Con la finalidad de analizar el efecto tanto de la enfermedad, como de la quimioterapia en diferentes fenotipos de leucemia y de las condiciones de los pacientes que fallecieron, contrastamos todos los valores con los obtenidos en niños sin leucemia (panel A). En la figura se muestran los valores obtenidos para niños SL, al diagnóstico de LLAB (Dx LLAB), durante las diferentes etapas de quimioterapia de LLAB (QTx LLAB), durante las diferentes etapas de quimioterapia de otros fenotipos de leucemia (LLAT, LMA, CrPh+) (QTx otros F) y de los pacientes que fallecieron (Fallecidos).

Posteriormente, para profundizar en el efecto de la quimioterapia únicamente en los niños diagnosticados con LLA-B, además de evaluar el resultado de la administración del co-tratamiento con vitaminas, estudiamos por separado cada fase del tratamiento, analizando a los mismos pacientes en el cambio de MNT a MNT+VTx (panel B). En la figura se muestran los valores obtenidos para niños SL, con LLA-B durante la quimioterapia de inducción, consolidación y mantenimiento (IND, CONS y MNT), y en el seguimiento de los mismos niños que cursaron MNT y después el co-tratamiento con vitaminas MNT y MNT+VTx.

8.2 Lipoperoxidación

Al agrupar todas las fases de la quimioterapia, los niños con LLA-B (QTx LLAB), a pesar de la gran dispersión, presentaron una significativa ($P<0.05$) mayor lipoperoxidación en eritrocitos (concentración de MDA) comparado con niños SL (1.35 ± 0.4 vs 1.2 ± 0.1 , media \pm DE). No se encontraron diferencias en la lipoperoxidación en el diagnóstico de LLA-B (Dx LLAB) (1.4 ± 0.5), en otros fenotipos de leucemia (QTx otros F) (1.3 ± 0.3) ni en pacientes fallecidos (1.2 ± 0.4) al compararlos con niños SL (1.2 ± 0.1) (**figura 12A**).

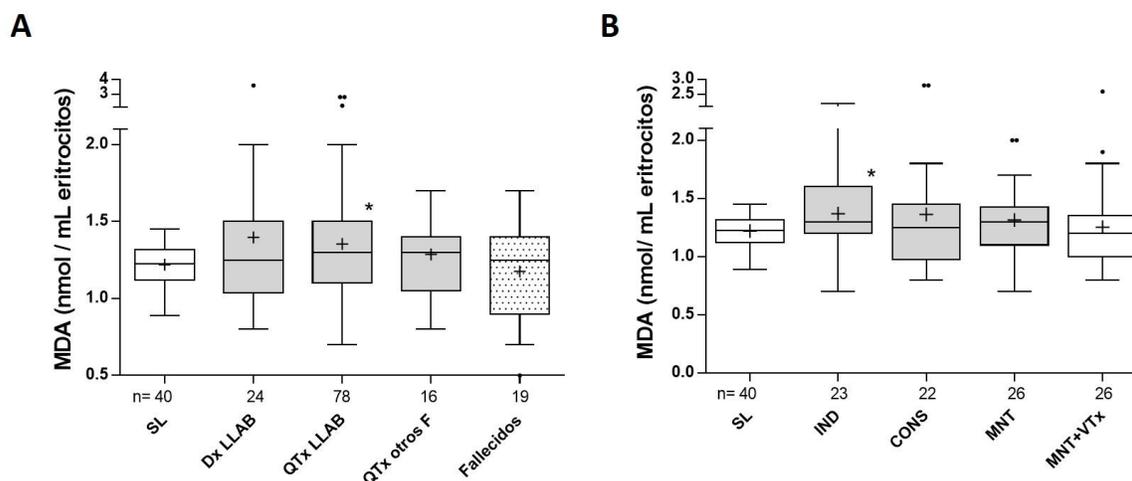


Figura 12. Box plot de la lipoperoxidación de eritrocitos en niños con leucemia. Concentración de MDA A) En pacientes con LLA-B al diagnóstico (Dx LLAB), quimioterapia total (QTx LLAB), quimioterapia total de otros fenotipos de leucemia (QTx otros F), niños que fallecieron y niños SL. B) LLA-B en diferentes fases de la quimioterapia (IND-inducción; CONS-consolidación, MNT-mantenimiento y mantenimiento+co-tratamiento con vitaminas MNT+VTx) y niños SL. Seguimiento de los mismos niños de MNT a MNT+VTx. (n) indicada debajo de cada grupo. (+) media. * $P<0.05$ comparado con niños SL según Mann-Whitney.

Al dividir los resultados por fases de la quimioterapia, inducción (IND), consolidación (CONS), mantenimiento (MNT) y mantenimiento+co-tratamiento con vitaminas (MNT+VTx), sólo se encontró mayor lipoperoxidación ($P<0.05$) en la fase de inducción (1.4 ± 0.3) comparada con niños SL (1.2 ± 0.1) (panel B). Las fases de MNT y MNT+VTx no fueron estadísticamente diferentes a niños SL (**figura 12B**).

Después de realizar los análisis de oxidación en eritrocitos, con la finalidad de verificar nuestro ensayo de lipoperoxidación, se realizaron pruebas de oxidación *in vitro* con H_2O_2 como oxidante a diferentes concentraciones. Adicionalmente en este ensayo, se usó un inhibidor de la enzima CAT para estimar su contribución en la respuesta antioxidante en eritrocitos (**figura 13**). Los resultados mostraron una discreta mayor lipoperoxidación que no fue significativa a una concentración de 0.5 mM de oxidante y que además fue incubada con el inhibidor de CAT. Cuando los eritrocitos fueron incubados con 15 mM de H_2O_2 existe un evidente daño oxidativo, únicamente si CAT está inhibida con azida de sodio (**figura 13A**).

Además, se probaron otros oxidantes, menadiona e hidroperóxido de cumeno, en concentraciones crecientes. La menadiona en concentraciones de 0.25 y 0.45 mM, produjo valores de lipoperoxidación arriba de 2 nmol/mL de eritrocitos sin ser estos significativos. En el caso del hidroperóxido de cumeno, concentraciones de 0.5 y 15 mM generaron los mayores valores de oxidación (**figura 13B**). Los experimentos *in vitro* nos permitieron comprobar la eficacia de nuestro ensayo en la detección de malondialdehído, producto de la lipoperoxidación. Además, del notable efecto protector de la CAT en eritrocitos contra el H₂O₂ a alta concentración (15mM), así como la participación de otros elementos antioxidantes a concentraciones menores (0.5mM).

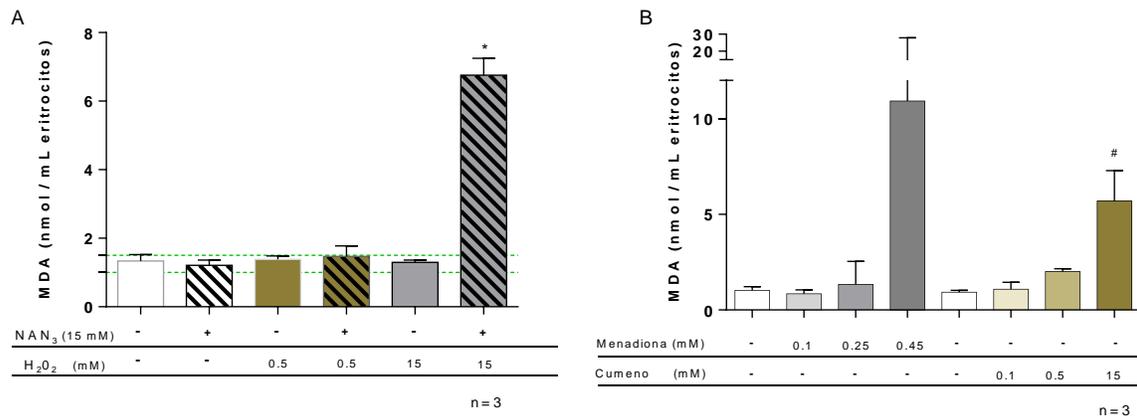


Figura 13. Oxidación *in vitro* en eritrocitos. MDA en A) eritrocitos de niños SL incubados con (+) o sin (-) diferentes concentraciones de H₂O₂ como agente oxidante (15 min) y azida de sodio NaN₃ para inhibir la CAT. Líneas punteadas indican valores control en niños SL. B) eritrocitos incubados con diferentes concentraciones de menadiona o hidroperóxido de cumeno. media±DE. (n) repeticiones del experimento indicada debajo la figura. * p< 0.05 respecto al resto; #<0.05 vs sin oxidante. Según ANOVA.

8.3 Actividad de Catalasa

En el primer análisis de todos los fenotipos, la actividad de CAT en eritrocitos fue menor, ($P<0.05$) tanto en los niños con LLA-B al diagnóstico (117 ± 21), así como en los grupos con quimioterapia, QTx LLAB (114.5 ± 21), QTx otros F (110 ± 32) y de los niños que fallecieron (104 ± 30) al compararlos con niños SL (129 ± 9) (**figura 14A**).

Por otro lado, el grupo de niños de LLA-B en todas las fases de QTx tuvieron menor actividad de CAT (IND 115 ± 23 , CONS 112 ± 28 y MNT 116 ± 14) comparados con niños SL (129 ± 9). El co-tratamiento de antioxidantes causó que el seguimiento de niños de MNT (116 ± 14) a MNT+VTx (126 ± 13) tuviera un incremento significativo de la actividad de CAT, recuperando valores similares a los de niños SL (129 ± 9) (**figura 14B**).

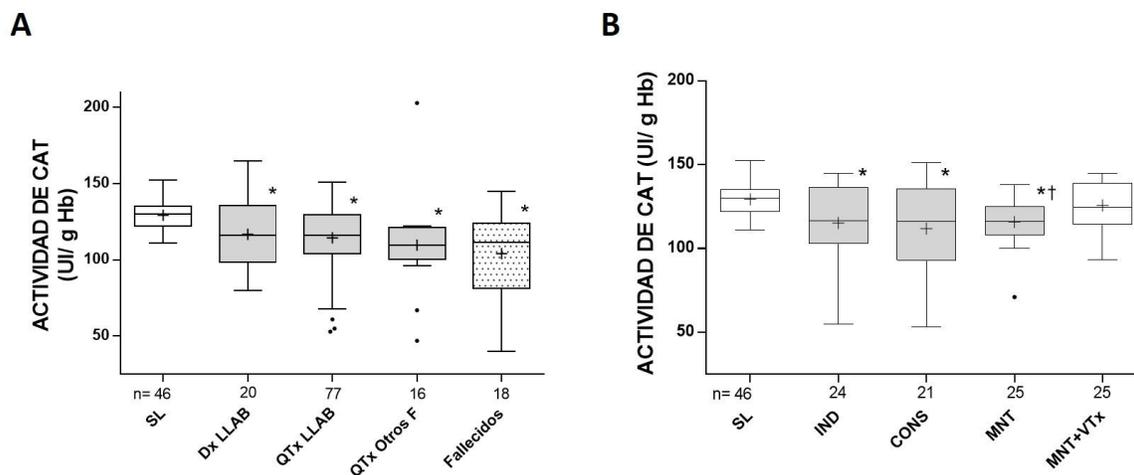


Figura 14. Box plot de la actividad de catalasa en eritrocitos de niños con leucemia. Actividad de CAT A) En pacientes con LLA-B al diagnóstico (Dx LLAB), quimioterapia total (QTx LLAB), quimioterapia total de otros fenotipos de leucemia (QTx otros F), niños que fallecieron y niños SL. B) LLA-B en diferentes fases de la quimioterapia (IND-inducción; CONS-consolidación, MNT-mantenimiento y mantenimiento+co-tratamiento con vitaminas MNT+VTx) y niños SL. Seguimiento de los mismos niños de MNT a MNT+VTx. (n) indicada debajo de cada grupo. (+) media. * $P < 0.05$ comparado con SL, † < 0.05 comparado con MNT+VTx según Mann-Whitney.

8.4 Actividad de Glutación peroxidasa

El análisis general de la actividad de la GPX (**figura 15A**) en plasma de niños con LLA-B al diagnóstico Dx LLAB (682 ± 247) y en la quimioterapia QTx LLAB (712 ± 285) así como en los niños que fallecieron (883 ± 499) fue menor ($P < 0.05$) comparada con los niños SL (866 ± 162). Contrario a estos hallazgos, en otros fenotipos de leucemia (QTx otros F), la actividad de GPX fue mayor (1025 ± 214) que en niños SL y significativamente diferente a la de QTx LLAB, sin embargo, se resalta que estos resultados fueron obtenidos en un grupo pequeño ($n=6$).

Al evaluar la quimioterapia únicamente de niños con LLA-B, con excepción de la fase de CONS (699 ± 286), el resto de las fases (IND, 744 ± 359 ; MNT, 709 ± 212 ; y MNT+VTx, 671 ± 212) tuvieron una actividad de GPX significativamente menor ($P < 0.05$) que los niños SL (866 ± 162). En el seguimiento del co-tratamiento con antioxidantes de MNT y MNT+VTx no hubo diferencias significativas, sin embargo los valores se mantuvieron menores a los obtenidos en niños SL (**figura 15B**).

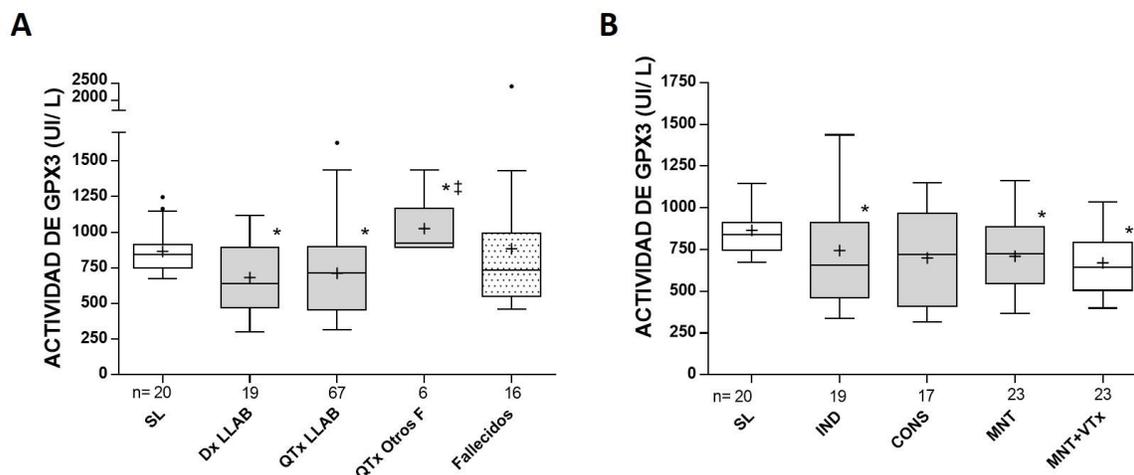


Figura 15. Box plot de la actividad de GPX en niños con leucemia. Actividad de GPx3 en plasma A) De pacientes con LLA-B al diagnóstico (Dx LLAB), quimioterapia total (QTx LLAB), quimioterapia total de otros fenotipos de leucemia (QTx otros F), niños que fallecieron y niños SL. B) LLA-B en diferentes fases de la quimioterapia (IND-inducción; CONS-consolidación, MNT-mantenimiento y mantenimiento+co-tratamiento con vitaminas MNT+VTx) y niños SL. Seguimiento de los mismos niños de MNT a MNT+VTx. (+) media. * $P < 0.05$ comparados con SL, ‡ < 0.05 comparados con QTx LLAB según Mann-Whitney.

8.5 Capacidad antioxidante total

El efecto acumulativo de los antioxidantes plasmáticos, enzimáticos y no enzimáticos se estima mediante la capacidad antioxidante total (TAC) (en μM equivalentes de Trolox). El estudio general de TAC, incluyendo el grupo de diagnóstico de LLA-B (205 ± 22), los distintos fenotipos de leucemia en quimioterapia (QTx LLAB, 189 ± 55 ; QTx otros F, 207 ± 58) así como los niños que fallecieron (196 ± 57) no tuvo diferencias al compararla con los resultados de niños SL (205 ± 22) (**figura 16A**).

En el análisis de niños con LLA-B en las distintas fases de la quimioterapia, la TAC exhibió valores significativamente menores durante la fase IND (179 ± 54) y en MNT+VTx (189 ± 27) comparado con el grupo de niños SL. El co-tratamiento con vitaminas en el seguimiento de los mismos niños de MNT (191 ± 43) y MNT+VTx presentó una disminución significativa (**figura 16B**).

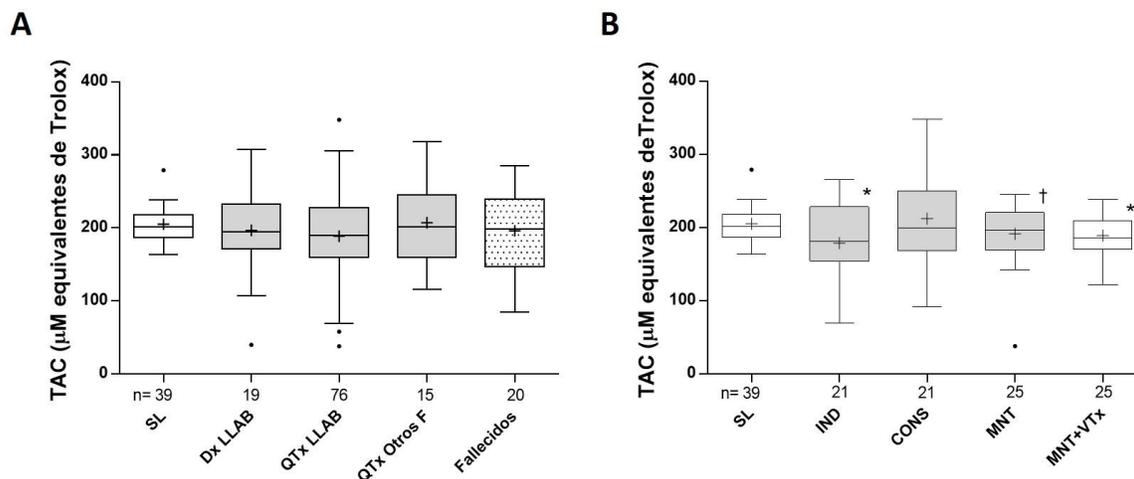


Figure 16. Box plot de la capacidad antioxidante total en niños con leucemia. TAC en plasma A) En pacientes con LLA-B al diagnóstico (Dx LLAB), quimioterapia total (QTx LLAB), quimioterapia total de otros fenotipos de leucemia (QTx otros F), niños que fallecieron y niños SL. B) De LLA-B en diferentes fases de la quimioterapia (IND-inducción; CONS-consolidación, MNT-mantenimiento y mantenimiento+co-tratamiento con vitaminas MNT+VTx) y niños SL. Seguimiento de los mismos niños de MNT a MNT+VTx. (n) indicada debajo de cada grupo. (+) media. * $P < 0.05$ comparado con niños SL y † < 0.05 comparado con MNT+VTx según Mann-Whitney.

8.6 Glutación

La concentración de glutación en plasma fue evaluada únicamente en la quimioterapia de mantenimiento, y fue menor ($P < 0.05$) en MNT (16 ± 12) y después del co-tratamiento con vitaminas en MNT+VTx (19 ± 14) al compararse con los niños sin leucemia SL (55 ± 31.5) (figura 17). No se evaluó este parámetro en los niños que fallecieron.

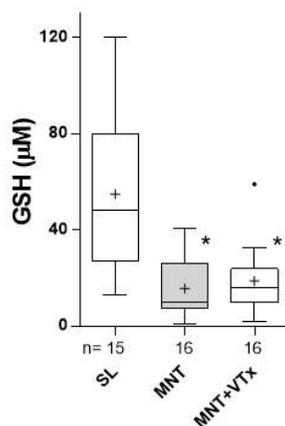


Figura 17. Box plot de las concentraciones de glutación reducido en niños con LLA-B. Concentración de GSH en plasma en la etapa del mantenimiento (MNT), y mantenimiento+co-tratamiento con vitaminas (MNT+VTx) y en niños SL. (n) indicado debajo de cada grupo. (+) media. * $P < 0.05$ comparado con niños SL según Mann-Whitney.

8.7 Apoptosis de leucocitos

La disminución de la población de leucocitos en las fases de quimioterapia no permitió obtener suficientes resultados para generar conclusiones del proceso de apoptosis en estas células. El reducido número de leucocitos por volumen de muestra sanguínea impidió evaluar este parámetro de manera consistente, por lo que se presentan resultados representativos. En la **figura 18A** se muestra un *dot plot* con la población de leucocitos obtenido por citometría de flujo mediante el marcaje con un anticuerpo específico de leucocitos acoplado a un fluoróforo (CD45/VB500), y el parámetro de granularidad celular (*side scatter*). Dentro de la región N se obtuvo la población de células positivas para CD45, granulocitos, monocitos y linfocitos B y T resultando en un 81% del total. Fuera de la región N se registra la población de células negativas para CD45 (eritrocitos, plaquetas y detritus).

El porcentaje de la población de leucocitos CD45+ obtenido en niños SL fue de (81±12), el cual resultó similar en el Dx (73), sin embargo, en la quimioterapia de IND (24±1) y MNT (12±12) fueron menores alrededor de un 75%. Los pacientes cursando quimioterapia (IND, MNT) tuvieron menor porcentaje de la población total de leucocitos (CD45+), además, también reflejaron un mayor porcentaje de células externalizando fosfatidilserina (anexina V+) en IND (28±40) y MNT (14±18), pero menor en el grupo de niños SL (5±2) y en el Dx (9±3). Los resultados de necrosis (ioduro de propidio +) en niños SL fueron menores al 10%, en el caso de pacientes en el Dx y quimioterapia fueron muy bajos, incluso no detectables (**figura 18B**).

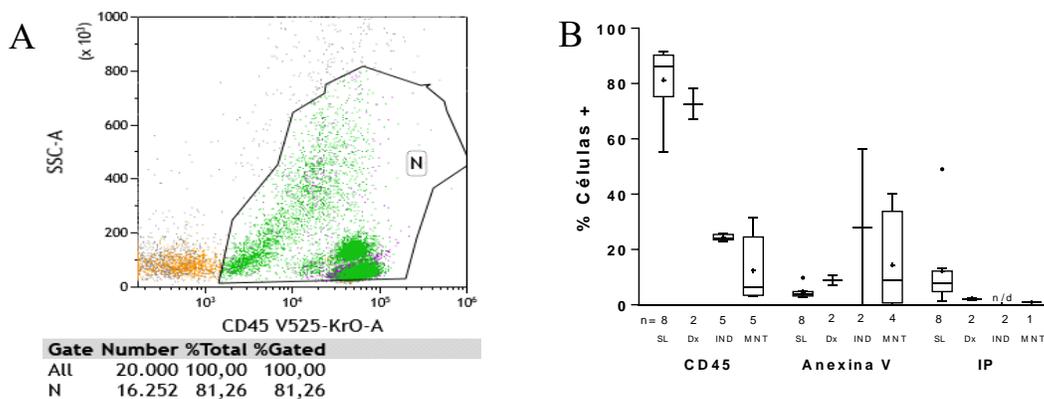


Figura 18. Evaluación de poblaciones de leucocitos totales y en apoptosis y necrosis en sangre total. A) Dot plot representativo de conteo de leucocitos CD45+ y side scatter, de un niño SL. Dentro de la región N se encuentran las poblaciones de granulocitos, monocitos y linfocitos. Fuera de la región N, eritrocitos, plaquetas y detritus. B) Box plot representativo de leucocitos en apoptosis y en necrosis de niños con LLA-B. Leucocitos totales (CD45), apoptosis (anexina V+) y necrosis (IP+). Niños sin leucemia (SL), en diagnóstico (Dx) y en fases de la quimioterapia (IND inducción; MNT mantenimiento). (número de niños indicada debajo de cada grupo). valor no detectado (n/d).

8.8 Eriptosis

Al comparar la eriptosis en todos los fenotipos de leucemia con niños SL (0.5±0.1) no encontramos diferencias significativas en ninguna de las fases evaluadas, al Dx B-ALL

(0.8 ± 0.8), en la quimioterapia QTx LLA-B (0.8 ± 0.8) y QTx otros F (0.6 ± 0.5) y en los pacientes que fallecieron (1.2 ± 1) (**figura 19A**).

En el análisis únicamente del grupo de niños LLA-B en las fases de quimioterapia (**figura 19B**), el MNT+VTx (0.4 ± 0.4) resultó en menor eriptosis al compararse con todas las fases de la quimioterapia IND (0.9 ± 0.9), CONS (0.8 ± 0.7) y MNT (0.5 ± 0.5). Los niños que recibieron antioxidantes en el seguimiento de la quimioterapia de MNT (0.4 ± 0.4) a MNT+VTx (0.5 ± 0.5) tuvieron una disminución significativa en la eriptosis; además, se observó una mayor tendencia de este parámetro (observada mediante el incremento en la DE) en la inducción, comparada con los niños sin leucemia aunque ésta no resultó estadísticamente significativa, sin embargo, estos resultados se obtuvieron en un grupo pequeño de niños SL ($n=9$).

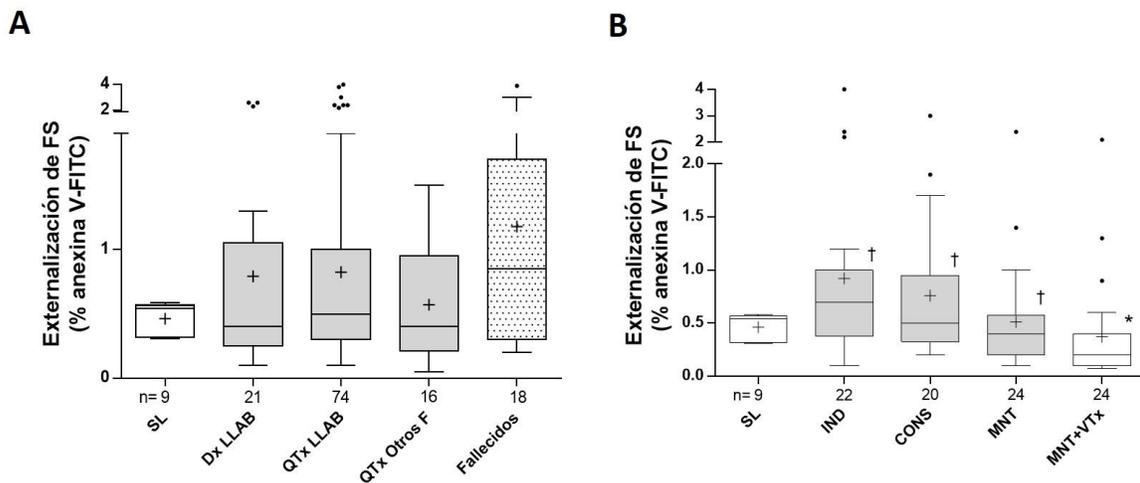


Figure 19. Box plot del porcentaje de eriptosis en niños con leucemia. Externalización de FS A) En pacientes con LLA-B al diagnóstico (Dx LLA-B), quimioterapia total (QTx LLA-B), quimioterapia total de otros fenotipos de leucemia (QTx otros F), niños fallecidos y niños sin leucemia (SL). B) De LLA-B en diferentes fases de la quimioterapia (IND-inducción; CONS-consolidación, MNT-mantenimiento y mantenimiento+co-tratamiento con vitaminas MNT+VTx) y niños SL. Seguimiento de los mismos niños de MNT a MNT+VTx. (n) indicado debajo de cada grupo. (+) media. * $P < 0.05$ comparado con niños SL, † < 0.05 comparado con MNT+VTx según Mann-Whitney.

8.9 Citocinas proinflamatorias

El estado proinflamatorio se evaluó a través de las concentraciones de citocinas y quimiocinas mostrados en la **figura 20**. La citocina TNF- α en MNT+VTx (17 ± 7) presentó diferencias estadísticas ($P < 0.05$) comparadas con los resultados de niños SL (10 ± 6), estos valores fueron mayores en un 50% que en niños SL (**figura 20A**). Las concentraciones de las otras citocinas IL-6 (HC 11 ± 5 , MNT 10 ± 7 y MNT+VTx 9 ± 4); IL-8 (HC 8 ± 6 , MNT 10 ± 7 y MNT+VTx 9 ± 6); y SDF-1 (HC 277 ± 137 , MNT 277 ± 234 and MNT+VTx 237 ± 222) no fueron estadísticamente diferentes que en los niños SL (**figura 20 B, C, y D**).

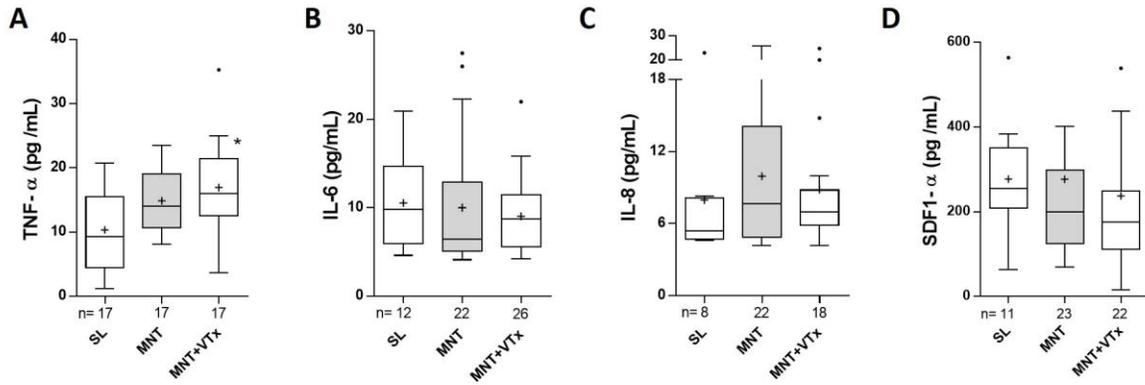


Figure 20. Box plot de las concentraciones en plasma de TNF- α (A), IL-6 (B), IL-8 (C) y SDF-1 (D) en niños con LLA-B. Concentración de citocinas y quimiocinas en la etapa de mantenimiento (MNT), en mantenimiento+co-tratamiento con vitaminas (MNT+VTx) y en niños sin leucemia (SL). (n) indicado debajo de cada grupo (+) media. * $P < 0.05$ comparado con niños SL según Mann-Whitney.

8.10 Correlaciones entre los efectos de la quimioterapia y el estatus antioxidante

Al realizar un análisis mediante correlaciones de los parámetros evaluados, se encontró en los niños con LLA-B una correlación negativa entre la eriptosis y la actividad de CAT en las fases de quimioterapia de IND y CONS con una $r^2 = 0.0632$ y 0.2243 y éstas fueron significativas estadísticamente ($P < 0.05$) (figura 21 A y B).

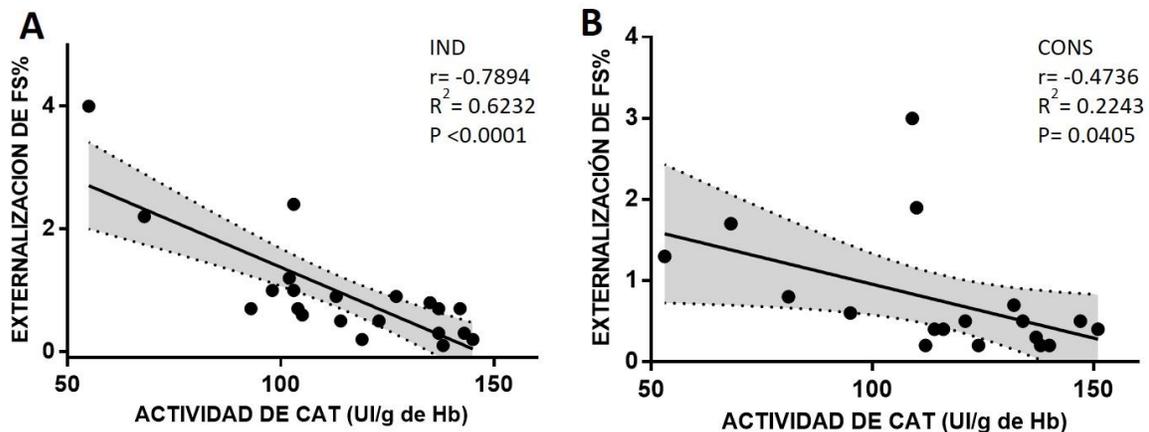


Figura 21. Correlación entre la actividad de catalasa y la eriptosis en eritrocitos de niños con LLA-B en la etapa de inducción (A) y consolidación (B). Línea sólida=regresión lineal, límites de confianza =área sombreada entre líneas punteadas, r =coeficiente de correlación Pearson, $P < 0.05$.

En eritrocitos de niños con LLA-B, la actividad de CAT también presentó una correlación con la lipoperoxidación de eritrocitos; en la fase de quimioterapia de CONS la correlación fue positiva con $r^2 = 0.3806$ ($P < 0.05$) y en MNT+VTx la correlación entre estos mismos parámetros resultó negativa con $r^2 = 0.2568$ ($P = 0.05$) (figura 22 A y B).

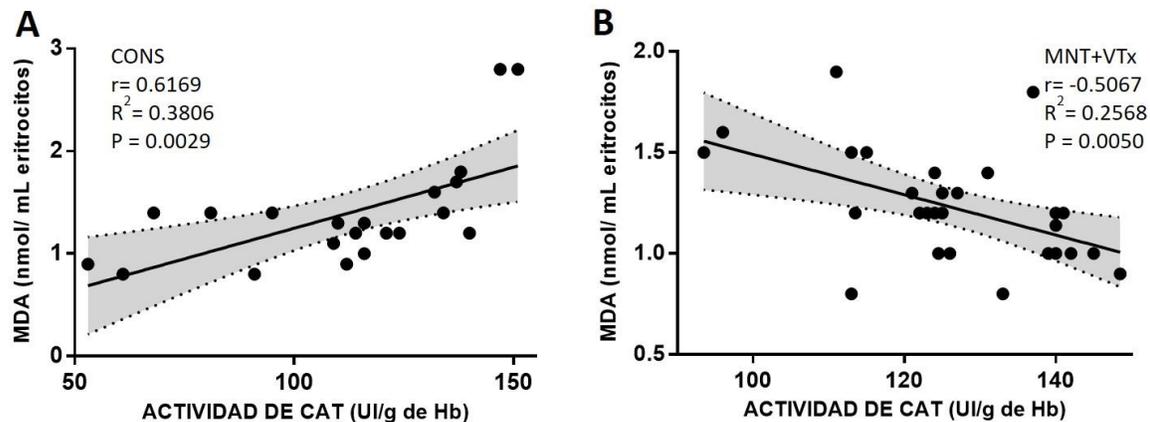


Figura 22. Correlación entre la actividad de catalasa y la lipoperoxidación en eritrocitos de pacientes con LLA-B en la quimioterapia de consolidación (A) y en la fase de mantenimiento+co-tratamiento con vitaminas (B). Línea sólida=regresión lineal, límites de confianza =área sombreada entre líneas punteadas, r =coeficiente de correlación Pearson, $P < 0.05$

Los análisis de correlación mostraron una asociación significativa entre la TAC y la actividad de GPX en plasma de niños con LLA-B en las fases de quimioterapia de IND y CONS; en los dos análisis estas correlaciones fueron positivas con una $r^2=0.2426$ y 0.4502 respectivamente, ambas estadísticamente significativas ($P < 0.05$) (**figura 23A y B**). En el panel C de la **figura 23** se muestra la relación entre TAC y la citocina TNF- α en MNT+VTx que resultó con correlación negativa con una $r^2=0.4533$ y una probabilidad $P < 0.05$.

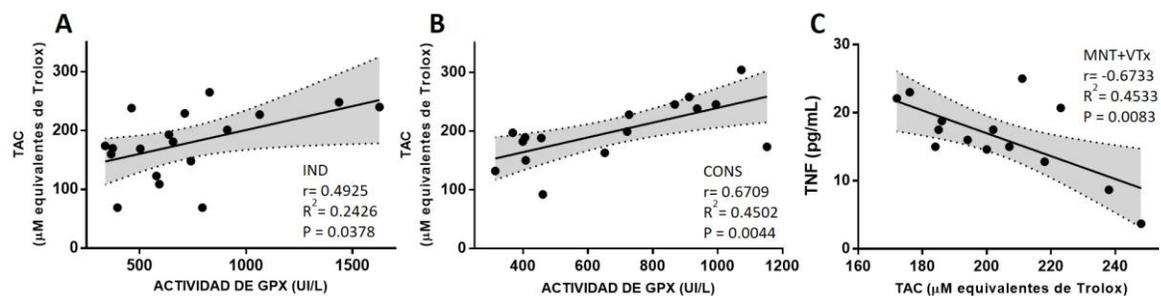


Figura 23. Correlaciones en plasma de pacientes con LLA-B, entre la capacidad antioxidante total y la actividad de GPX en la quimioterapia de fase de inducción (A) y en fase consolidación (B). Correlación entre las concentraciones de TNF- α y la capacidad antioxidante total en la fase de mantenimiento+cotratamiento con vitaminas (C). Línea sólida=regresión lineal, límites de confianza =área sombreada entre líneas punteadas, r =coeficiente de correlación Pearson, $P < 0.05$.

9. DISCUSIÓN

Diferentes tipos de cáncer incluida la leucemia, se consideran enfermedades con características oxidativas (Udensi & Tchounwou, 2014; J. Zhang et al., 2018), así como otras patologías, incluidas las crónico degenerativas (Kim, Ha et al., 2015; Liguori et al., 2018), metabólicas (Calderón-Salinas et al., 2011), infecciosas (Alzoughaibi et al., 2014; Schwarz,

1996) y causadas por tóxicos (Aguilar-Dorado et al., 2014; Dobrakowski et al., 2017). Para el estudio de estas enfermedades oxidativas se han implementado estrategias que utilizan antioxidantes para proteger contra el daño oxidativo (Gaman et al., 2014; Mantovani, Macciò, Madeddu, Mura, Gramignano, Lusso, Massa, et al., 2003; Rendón-Ramírez et al., 2014) y otros efectos tóxicos inducidos por la enfermedad o su tratamiento (Chang et al., 2007; Pace et al., 2010).

En el presente estudio evaluamos la defensa antioxidante, el daño oxidativo y la apoptosis, así como la respuesta inflamatoria al diagnóstico de leucemia y en diferentes fases de su tratamiento. Y por lo previamente discutido, con interés en conocer el efecto sobre todos estos parámetros de la administración de un co-tratamiento con antioxidantes exógenos en pacientes pediátricos.

Los resultados de los parámetros de daño oxidativo y de las enzimas antioxidantes correspondientes a niños clínicamente sanos, generalmente presentaron menos variación biológica que los niños con leucemia. La variación de dichos parámetros en los niños con leucemia es atribuible a la enfermedad, la etapa del tratamiento y la respuesta y evolución del paciente, entre otros factores. Un estudio de seguimiento completo podría haber reducido la variabilidad; sin embargo, no fue posible en todos los casos debido a complicaciones en la logística de coordinación clínico-laboratorio.

9.1 Estrés oxidativo en el diagnóstico

Se evaluó la eriptosis y la lipoperoxidación como indicador de estrés oxidativo sistémico debido a que estudios previos han demostrado que los eritrocitos son un modelo adecuado para evaluar el dicho parámetro, ya que la eriptosis puede ser inducida por el estrés oxidativo o energético y la exposición a fármacos (Aguilar-Dorado et al., 2014; Farag & Alagawany, 2018; Föller et al., 2008; Naz et al., 2013; Sopjani M., Föller M., Gulbins E., 2008).

En la fase de diagnóstico, los eritrocitos de niños con LLA-B no presentaron daño oxidativo evaluado por lipoperoxidación; así mismo, no se presentaron cambios en la TAC en plasma ni cambios en los porcentajes de eriptosis al compararlos con los niños clínicamente sanos. Los resultados en los niños con LLA-B sugieren que el insulto oxidativo ocasionado por la leucemia fue insuficiente para superar la defensa antioxidante. La actividad de las enzimas antioxidantes CAT y GPX en eritrocitos y plasma, respectivamente, fue 10% y 25% menor en comparación con su actividad en niños clínicamente sanos; sin embargo, esta menor actividad no afectó la TAC debido a que otras moléculas antioxidantes y enzimas pueden compensar dicha deficiencia. Así mismo, la notable redundancia de las enzimas implica que reducir una actividad enzimática particular no necesariamente reduce la función celular global en la que participa; en trabajos anteriores de nuestro laboratorio, hemos descrito mecanismos similares en los trabajadores expuestos a plomo, donde una reducción notable en la actividad de la enzima δ -ALAD no conduce al deterioro de la síntesis del grupo hemo (López-Vanegas et al., 2020).

La menor actividad de GPX podría estar relacionada con cambios metabólicos ocurridos a lo largo del desarrollo de la enfermedad, afectando la producción de los cofactores necesarios para su ciclo de actividad, tales como las concentraciones de NADPH, glutatión o selenio. En relación con esto, en estudios realizados en niños diagnosticados con LLA se han encontrado menores concentraciones de selenio y glutatión en comparación con niños sanos (Rayman, 2005; Stjernfeldt et al., 1985).

La ausencia de un mayor porcentaje de eriptosis es consistente con el nivel de lipoperoxidación, el cual fue comparable con el de los niños clínicamente sanos; a pesar de que el estrés energético que puede generarse por deficiencias nutricionales derivadas de la enfermedad puede causar eriptosis (Föller et al., 2008). Es importante mencionar que la proporción de eriptosis es un parámetro difícil de evaluar ya que los macrófagos eliminan constantemente las células apoptóticas mediante la actividad del sistema retículo endotelial (Borst et al., 2012). Por el contrario, un exceso de eritrocitos en apoptosis en la circulación se ha asociado con enfermedades renales o vasculares (Bonomini et al., 1999; Calderón-Salinas et al., 2011) lo que sugiere que a pesar del daño oxidativo, se activan mecanismos adaptativos que evitan el desarrollo de mayores daños.

Otros estudios realizados en niños con diferentes tipos de leucemia antes de la quimioterapia han reportado resultados similares a los nuestros, no encontrando daño oxidativo ni cambios en las actividades antioxidantes a pesar de una mayor producción de H_2O_2 (Devi et al., 2000); así mismo, un estudio ha reportado concentraciones más altas de $O_2^{\cdot-}$ sin embargo, no se evaluaron parámetros de daño oxidativo (Raber et al., 2019).

Por otro lado, el componente sanguíneo utilizado para evaluar la lipoperoxidación también puede impactar en los resultados, con respecto a esto se ha encontrado cambios oxidativos en plasma que no se han encontrado en eritrocitos; tal es el caso de estudios donde en eritrocitos no fueron encontrados cambios en las concentraciones de tioles de no proteicos (8 niños), pero en el plasma fue reportada mayor lipoperoxidación y una menor concentración de los tioles no proteicos (10 niños) (Battisti et al., 2008), lo que indica que existen condiciones oxidativas en plasma que no afectan a los eritrocitos, probablemente debido a la defensa antioxidante de eritrocitos (Cortese-krott & Shiva, 2019; Kuhn et al., 2017; Minetti, M. and Malorni, 2006).

Los resultados sugieren una relación inversa entre la actividad enzimática y el daño oxidativo, lo que es consistente con reportes de otros autores que han referido daño oxidativo al diagnóstico asociado con una menor respuesta antioxidante (TAC, CAT, GPX, SOD, GSH, y VIT E) (Battisti et al., 2008; ben Mahmoud et al., 2017; Sentürker et al., 1997). En eritrocitos de niños diagnosticados con LLA-B, se ha reportado un incremento en la actividad de GPX de hasta tres veces mayor que el promedio en niños sanos, evitando el daño oxidativo (Devi et al., 2000). Por el contrario, estudios en eritrocitos y linfocitos de niños con LLA donde se ha reportado desde el 30 al 50% de menor de actividad de CAT, se ha encontrado daño oxidativo en lípidos y proteínas (Battisti et al., 2008; Sentürker et al., 1997).

En trabajos realizados en niños con leucemia, los resultados de TAC no han sido consistentes, dado que se han reportado valores sin cambios, similares a los nuestros (Papageorgiou et al., 2005), así como valores mayores (Naz et al., 2013) o menores, pero en dichos estudios no incluyeron ninguna estimación del daño oxidativo (Krawczuk-Rybak et al., 2012; Mazor et al., 2008).

En los pacientes que fallecieron, se analizaron los parámetros oxidativos utilizando la última muestra obtenida, y no encontramos diferencias significativas al compararlos con niños clínicamente sanos. En la mayoría de los casos, la última muestra analizada de los pacientes tenía un espacio de tiempo de más de un mes antes de su fallecimiento. Cabe resaltar que estos pacientes presentaron los valores más bajos de la actividad de CAT y los porcentajes más altos de eriptosis, sin embargo, el grupo analizado no tuvo el tamaño suficiente para conclusiones con validez estadística.

Nuestros resultados indican que al diagnóstico de la leucemia disminuye la actividad de algunas enzimas del sistema antioxidante, sin modificar a la capacidad antioxidante total, por lo que no se manifiesta el daño oxidativo.

9.2 Estrés oxidativo y respuesta inflamatoria en las diferentes fases de la quimioterapia

Un análisis que agrupó todas las fases de quimioterapia para evaluar el efecto general en niños diagnosticados con LLA-B y en otros fenotipos de leucemia, no mostró diferencias en lipoperoxidación, CAT, TAC o eriptosis, a pesar de la diversidad de tratamientos farmacológicos y perfiles metabólicos particulares entre diferentes fenotipos (Fayh et al., 2018; Kreitz et al., 2019). Únicamente la actividad de GPX fue mayor en el grupo de otros fenotipos de leucemia, aunque para este parámetro el número de niños estudiado fue pequeño (n=6). Estos resultados son comparables con hallazgos de otros estudios, donde se han encontrado en parámetros antioxidantes dependiendo del fenotipo de leucemia, tal es el caso de una mayor actividad de SOD en la LLA (T y B) en comparación con la LMA (Naz et al., 2013).

Para profundizar en el efecto de la quimioterapia, se realizó un análisis comparativo antes (Dx) y después del tratamiento (QTx) en niños con LLA-B. No se encontraron diferencias en el daño oxidativo, en las defensas antioxidantes y la eriptosis, lo que indica que, con respecto al diagnóstico la quimioterapia no provocó mayor daño oxidativo, a pesar de que esta se ha relacionado con efectos adversos y oxidación.

Comparamos el efecto total de la quimioterapia de todos los fenotipos de leucemia con los resultados en niños clínicamente sanos, y encontramos que los pacientes con LLA-B tienen estrés oxidativo caracterizado por una mayor lipoperoxidación y menor actividad de enzimas antioxidantes (CAT y GPX) en la quimioterapia; de manera interesante, en el caso de los

niños diagnosticados con otros fenotipos de leucemia, el estrés oxidativo no se manifestó con lipoperoxidación, posiblemente debido a una mayor actividad de GPX y valores de TAC similar a los de niños clínicamente sanos, a pesar de una menor actividad de CAT. No encontramos diferencias en ninguno de los fenotipos de leucemia con respecto a niños clínicamente sanos en la apoptosis de eritrocitos.

Cuando analizamos las diferentes fases de quimioterapia de manera individual (inducción, consolidación, y mantenimiento) en niños con LLA-B, únicamente en la fase de inducción encontramos una mayor lipoperoxidación, una menor TAC y menores actividades de CAT y GPX, sin evidencia de cambios en la eritosis ni en la concentración de citocinas TNF- α , IL-6, IL-8 y SDF-1. Estos resultados sugieren que particularmente en esta etapa la actividad del sistema antioxidante fue insuficiente y se produjo el daño oxidativo. Esta etapa de la quimioterapia se ha asociado con otros factores que podrían estar involucrados, tales como la condición clínica del paciente, el consumo de los antioxidantes endógenos y el tratamiento (dosis más altas y combinaciones de medicamentos). Los medicamentos, particularmente utilizados en la fase de inducción, como la daunorrubicina y la vincristina, pueden generar ERO en una proporción más significativa (Papageorgiou et al., 2005; Sangeetha et al., 1990) e inducen toxicidad por diferentes mecanismos (Raber et al., 2019) comprometiendo el estado nutricional y provocando estrés energético.

El ambiente oxidativo puede conducir a modificaciones en la actividad de las proteínas (Battisti et al., 2008; ben Mahmoud et al., 2017) lo cual podría estar involucrado en la menor actividad de las enzimas antioxidantes CAT y GPX. Las altas concentraciones de O₂⁻ pueden inhibir la actividad de CAT (Kono & Fridovich, 1982). Así mismo, se ha reportado la interacción de NADPH a CAT, y aunque no es un cofactor esencial para su actividad brinda protección contra una inactivación mediada por altas concentraciones de su sustrato, H₂O₂ (Díaz et al., 2012) concentración de GSH comparada con la presente en los niños sanos, lo cual podría relacionarse directamente con la menor actividad de la GPX, ya que tanto el GSH como el NADPH, son necesarios para que la enzima cumpla su ciclo de actividad de reducción de los hidroperóxidos; dado que el glutatión se sintetiza y libera principalmente en el hígado, la insuficiencia hepática asociada a la leucemia podría explicar la baja concentración plasmática de este tiol (Lu, 2014). Los niveles de NADPH podrían ser menores por la condición nutricional y el estrés energético causado durante la quimioterapia, por lo que este factor puede estar jugando un papel en la menor actividad de CAT y GPX. A su vez, la menor actividad de CAT y GPX puede afectar la respuesta TAC, lo cual es consistente con otros reportes donde la TAC ha sido menor (Krawczuk-Rybak et al., 2012; Mazor et al., 2008; Naz et al., 2013; Papageorgiou et al., 2005). Se ha propuesto que durante la quimioterapia de la leucemia, tanto las concentraciones de ERO como los productos de lipoperoxidación pueden disminuir las concentraciones de antioxidantes en plasma (Al-Tonbary et al., 2011).

En los niños con LLA-B en quimioterapia no encontramos diferencias en el porcentaje de eritosis comparado con los niños clínicamente sanos, resultados contrarios a los que

esperábamos, ya que una mayor lipoperoxidación está asociada con mayor eriptosis, tal como se ha demostrado en otras enfermedades en trabajos previos de nuestro laboratorio (Aguilar-Dorado et al., 2014; Calderón-Salinas et al., 2011; Quintanar-Escorza et al., 2010). Sin embargo, en los niños con LLA-B en quimioterapia encontramos una tendencia de un mayor porcentaje de eriptosis y un incremento en la variabilidad con respecto a los niños clínicamente sanos, sugiriendo una mayor agresión oxidativa. Sin embargo, es posible que los valores de lipoperoxidación encontrados no fueron suficientes para activar los mecanismos de transducción de señales que conducen a la eriptosis. En relación con esto, se debe resaltar que en nuestro estudio, el nivel más alto de lipoperoxidación encontrado es relativamente bajo en comparación con otros informes (Al-Gayyar et al., 2007; Al-Tonbary et al., 2011).

Nuestros resultados de apoptosis de leucocitos no fueron concluyentes debido a complicaciones por el limitado volumen obtenido en las muestras de sangre; además, en la quimioterapia el porcentaje de la población de leucocitos se reduce drásticamente, lo cual es esperado debido al efecto del tratamiento.

En las etapas de inducción y mantenimiento encontramos que el porcentaje de la población de leucocitos (CD45+) fue menor entre un 70 y un 85% respectivamente comparado con el de niños sanos. Además, en la quimioterapia una cantidad importante del porcentaje de leucocitos (hasta un 60%) se encontró en apoptosis (anexina V+). Esto ha sido reportado en otros trabajo donde han encontrado porcentajes de apoptosis hasta del 55% a la quimioterapia y del 88% tras 5 semanas de quimioterapia en estudios en linfocitos de niños con LLA aunque, los resultados no fueron comparados con ningún grupo de referencia(Al-Tonbary et al., 2011).

Al estudiar las concentración de citocinas y quimiocinas en los niños con LLA-B en la fase de mantenimiento, la ausencia de cambios en su concentración sugiere que no existen condiciones inflamatorias, debido posiblemente a una respuesta positiva al tratamiento. Consistente con nuestros resultados, se han reportado niveles de TNF- α en niños con LLA sin diferencias en la quimioterapia o después de la administración de N-acetilcisteína y vitamina E (Al-Tonbary et al., 2009). Cabe resaltar que otros estudios realizados en niños con LLA donde han indicado que una alta concentración de IL-8 en el líquido cefalorraquídeo y una alta expresión de IL-8 y el receptor de SDF-1 en la médula ósea se han asociado con el desarrollo de síntomas severos (fatiga, dolor y náuseas) y con riesgos clínicos asociados a recaída, respectivamente (Hockenberry et al., 2019; Wu et al., 2006). Otra posibilidad de la ausencia de cambio en la concentración de citocinas es que los medicamentos usados limiten su producción como se ha documentado para el metotrexato y los esteroides (Friedman & Cronstein, 2019; Samuel et al., 2017).

En la quimioterapia, la actividad de CAT presentó una correlación negativa con el porcentaje de eriptosis, así como también una correlación positiva con la lipoperoxidación, sugiriendo un papel importante de esta enzima en la respuesta ante el estrés oxidativo. Por otro lado, en

plasma también se encontró una correlación positiva entre la TAC y la actividad de GPX subrayando la importante participación de esta enzima en la respuesta antioxidante total.

Resumiendo lo discutido con respecto a la quimioterapia, los resultados evidenciaron que el tratamiento en la etapa de inducción constituye un importante insulto oxidante dado que se encontró daño oxidativo y una menor actividad antioxidante con respecto a niños sanos; en contraste con las fases de consolidación y mantenimiento, no se encontró daño oxidativo, esto probablemente debido a una respuesta compensatoria del sistema de defensa antioxidante o a una menor agresión oxidativa.

9.3 Estrés oxidativo y respuesta inflamatoria tras el co-tratamiento con antioxidantes

En este trabajo, los niños con LLA-B recibieron un co-tratamiento con antioxidantes durante 30 días, el cual consistió en la administración de alfa-tocoferol y ácido ascórbico; se ha reportado que este co-tratamiento puede producir un efecto antioxidante sinérgico, protegiendo contra la oxidación de lípidos y reduciendo el estrés oxidativo, tal como se ha demostrado en trabajos previos de nuestro laboratorio y por otros autores (Du et al., 2012; Rendón-Ramírez et al., 2014; Samoylenko et al., 2013).

Aunque el co-tratamiento con antioxidantes administrado a los niños con LLA-B utilizado en este estudio se considera seguro, decidimos administrar el tratamiento con antioxidantes en una etapa avanzada de mantenimiento para reducir los posibles efectos de quimio-resistencia, como algunos autores han señalado (D'Andrea, 2005; Lawenda et al., 2008); sin embargo, estos señalamientos se han debatido y se han utilizado tratamientos antioxidantes en diferentes fases de la quimioterapia en leucemia y otros tipos de cáncer (Al-Tonbary et al., 2009; Mantovani et al., 2003; Sanusi, 2019).

En nuestro trabajo los niños con LLA-B que recibieron el co-tratamiento con vitaminas mantuvieron niveles de oxidación similares a los encontrados en niños clínicamente sanos, sin embargo, este efecto no puede atribuirse totalmente a los antioxidantes administrados, debido a que los niveles de lipoperoxidación ya eran similares a los de niños sanos desde etapas previas de la quimioterapia (CNS y MNT). No obstante, cabe resaltar que en otros trabajos en niños con LLA sin un co-tratamiento con antioxidantes, se ha reportado que en la fase de quimioterapia de mantenimiento y sin actividad de la enfermedad han encontrado una mayor oxidación de lípidos en plasma sugiriendo la persistencia y propagación del daño oxidativo (Battisti et al., 2008), hecho que no fue detectado en los niños de nuestro estudio.

Adicionalmente, en el co-tratamiento con antioxidantes disminuyó la TAC presente en MNT, lo que sugiere que el insulto oxidativo persiste y consume los sistemas antioxidantes de TAC, posiblemente afectando a algunos de sus componentes. Tal fue el caso de la concentración de GSH y la actividad de GPX, los cuales fueron menores en comparación con niños clínicamente sanos. Con respecto a los niveles de glutatión nuestros resultados coinciden con otros reportes que han indicado que diferentes fármacos de quimioterapia utilizados en la

fase de MNT, como el metrotexato, pueden causar una menor concentración de GSH debido a su utilización en mecanismos de desintoxicación (Loe et al., 1998; Sodani et al., 2012; Zaman et al., 1995).

Contrario a lo encontrado en GPX, la actividad de CAT en eritrocitos de niños con LLA-B tras el co-tratamiento con antioxidantes, fue mayor que en MNT, y recuperó valores similares a los observados en niños sanos, posiblemente indicando que la agresión oxidativa es considerable, y que el aumento de la actividad de CAT respondería a la menor actividad de GPX y a la menor concentración de GSH. CAT y GPX reducen el H₂O₂ con diferentes afinidades y velocidades; GPX puede estar activo a bajas concentraciones de H₂O₂, sin embargo, requiere GSH como cofactor por lo que una baja concentración de dicho cofactor compromete su actividad (Nagababu et al., 2003). Por otro lado, las altas concentraciones de H₂O₂ pueden inducir la expresión de CAT (Glorieux et al., 2015; Röhrdanz E. and Kahl R., 1998), la cual no requiere GSH en su ciclo de actividad, lo que sugiere que el aumento de su actividad forma parte de un mecanismo adaptativo.

El co-tratamiento con antioxidantes redujo el porcentaje de eritrosis en niños con LLA-B en la quimioterapia de mantenimiento, y alcanzó valores aún más bajos que los de los niños clínicamente sanos, sugiriendo que la suplementación con los antioxidantes ejerció un efecto protector en los eritrocitos. La capacidad antioxidante de las vitaminas aunada a la mayor actividad de CAT encontrada en esta etapa pudieron contribuir en la reducción del estrés oxidativo del eritrocito, disminuyendo la eritrosis, tal como se ha reportado en otras patologías (Calderón-Salinas et al., 2011; Föller et al., 2008).

Es notable que en la quimioterapia encontramos una correlación positiva entre la actividad de CAT y la lipoperoxidación, sin embargo, tras el co-tratamiento con antioxidantes, la correlación fue negativa, consistente con la falta de eventos oxidativos en esta fase.

La concentración de TNF- α fue mayor en el co-tratamiento con antioxidantes que en niños clínicamente sanos, lo que podría explicarse por una mayor capacidad de respuesta inmunológica. Considerando la estrecha relación del desarrollo de estrés oxidativo con el desarrollo de estrés inflamatorio (Ganesh Yerra et al., 2013), la ausencia de condiciones oxidativas durante el co-tratamiento con antioxidantes, podría tener relación con la menor concentración de citocinas proinflamatorias encontradas. Otra posibilidad, es que la mayor concentración de TNF- α no tenga un impacto fisiológico importante, ya que los niveles encontrados no son tan elevados como los reportados en otras enfermedades proinflamatorias (Ma et al., 2017; Noori et al., 2017). Un análisis de correlación realizado después de administrar el co-tratamiento sugirió que la TAC podría contribuir en disminuir las concentraciones de TNF- α , evidenciado por la correlación negativa entre esta citocina y la capacidad antioxidante total.

La comparación de citocinas IL-6, IL-8 y SDF-1 no mostró diferencias antes y después del co-tratamiento con vitaminas antioxidantes; altas concentraciones de estas citocinas se han relacionado con un pronóstico adverso de la enfermedad como recaídas, hechos que no

fueron encontrados (Hockenberry et al., 2019; Sharma et al., 2020; Wu et al., 2006; X. Zhou et al., 2017).

El co-tratamiento antioxidante contribuyó en un efecto protector a los eritrocitos y en conjunto con la mayor actividad enzimática de catalasa se evitó el proceso de daño y apoptosis reflejando una probable ausencia de estrés oxidativo sistémico. Por lo anterior, nuestro estudio sugiere un posible efecto benéfico de la administración de antioxidantes exógenos en niños diagnosticados con leucemia en la etapa final de la quimioterapia.

10. CONCLUSIONES

Nuestros resultados mostraron que los niños con LLA-B al diagnóstico presentaron menor actividad enzimática antioxidante (CAT y GPX) sin evidencia de daño oxidativo comparado con los niños clínicamente sanos, lo que sugiere que en la ventana de tiempo estudiada se desarrolló una respuesta antioxidante dinámica capaz de responder con otros mecanismos antioxidantes (TAC).

La fase de inducción de la quimioterapia afectó la capacidad antioxidante total (menor TAC), y se produjo el daño oxidativo (mayor lipoperoxidación en eritrocitos), posiblemente debido a la mayor toxicidad y oxidación producido por la combinación fármacos utilizados en esta fase. No se observaron diferencias en la actividad de las enzimas antioxidantes (CAT y GPX) ni en la eriptosis comparadas con los encontrados al diagnóstico.

La enfermedad cursa con estrés oxidativo, y la condición oxidante se genera principalmente en la etapa de inducción de la quimioterapia. Durante la evolución de la enfermedad y el tratamiento, es posible que mecanismos adaptativos de la respuesta antioxidante que pueden evitar el daño oxidativo en CONS y MNT. En nuestro estudio, los pacientes evaluados progresaron hacia la remisión de la enfermedad, lo que sugiere que tanto el tratamiento como la respuesta clínica resultaron eficientes.

En la dosis utilizada y la duración de tiempo que fue administrado el co-tratamiento con antioxidantes, produjo un efecto protector en los eritrocitos del daño oxidativo reduciendo el porcentaje de eriptosis. Es posible que el efecto de los antioxidantes puede relacionarse con la recuperación de la actividad enzimática de CAT a un nivel similar al de los niños clínicamente sanos. El co-tratamiento con antioxidantes no tuvo efecto sobre las concentraciones de glutatión ni en las concentraciones de citocinas proinflamatorias.

Los resultados de todos los parámetros evaluados por etapas se resumen gráficamente en la **figura 24**.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que el co-tratamiento con antioxidantes (vitamina C y E) administrados en la etapa de mantenimiento de la quimioterapia a niños con LLA-B, puede reducir algunos de los efectos oxidativos de la quimioterapia e incrementar la respuesta antioxidante.

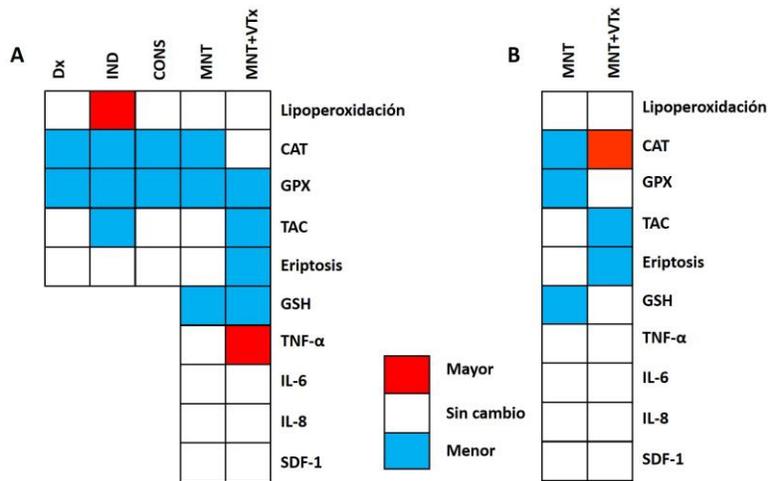


Figura 24. Resumen de resultados. A) mapa de calor cuadrículado mostrando los cambios de los parámetros estudiados respecto a los obtenidos en niños clínicamente sanos en las diferentes etapas (Dx-diagnóstico; IND-inducción; CONS-consolidación; MNT-mantenimiento y MNT+VTx-cotratamiento con antioxidantes) (rojo, efecto mayor, blanco sin efecto y azul efecto menor). GSH, TNF- α , IL-6, IL-8 y SDF-1 únicamente fueron evaluados en dos etapas MNT y MNT+VTx. B) Comparación de los cambios encontrados en el co-tratamiento con antioxidantes MNT+VTx con respecto al mantenimiento MNT.

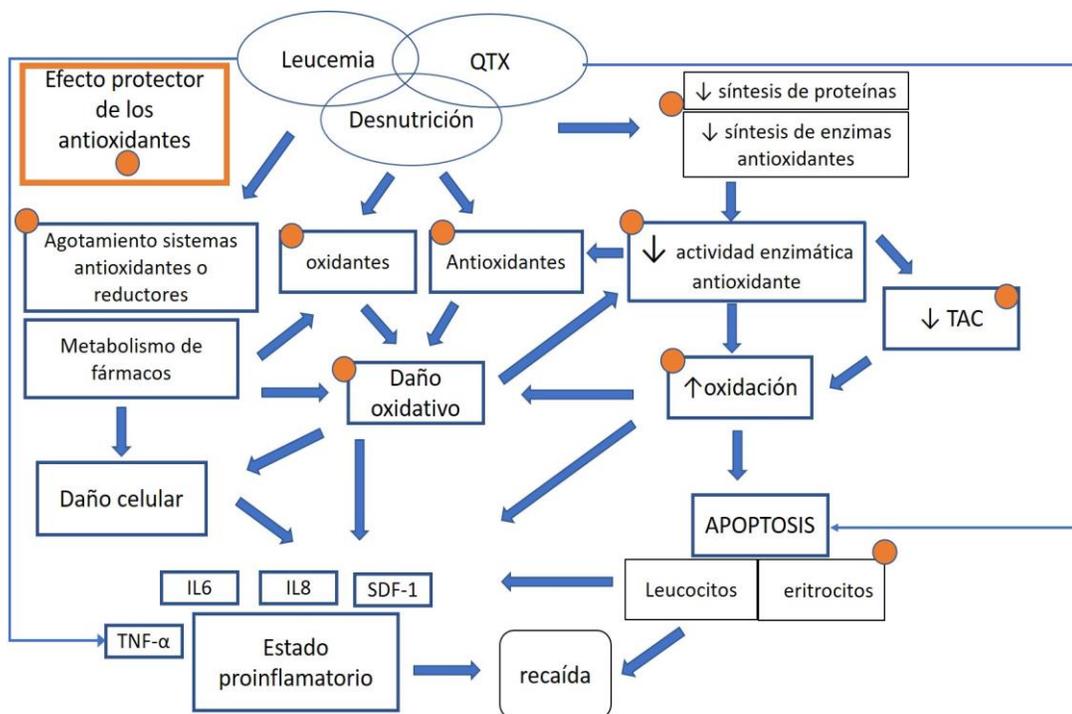


Figura 25. Esquema general de los posibles mecanismos involucrados en la acción del co-tratamiento con antioxidantes. La desnutrición que se genera tanto por la leucemia como por los efectos de su tratamiento, generan una menor respuesta antioxidante tanto enzimática como no enzimática ocasionando estrés oxidativo. La quimioterapia ocasiona mayor producción de oxidantes y se produce daño oxidativo, el cual se encuentra relacionado a recaídas de la enfermedad asociadas al estado proinflamatorio y la producción de citocinas. El co-tratamiento con antioxidantes tiene efectos en la regeneración de los sistemas antioxidantes posiblemente mejorando el estado nutricional de los pacientes brindando un efecto protector ante el estrés oxidativo, sin presentar efectos en las concentraciones de citocinas proinflamatorias.

11. PERSPECTIVAS

En los trabajos realizados en pacientes pediátricos resulta complicado evaluar diversos parámetros dadas las limitaciones en la cantidad de muestra de sangre obtenida. Por lo que complementar la información de este trabajo con la respuesta de otras enzimas antioxidantes brindaría mayor oportunidad de realizar conclusiones del estado antioxidante:

Para ello se evaluaría la actividad de SOD en eritrocitos

El glutatión es un componente muy importante en la capacidad antioxidante total, por lo que sería conveniente analizar la concentración de glutatión en la etapa del diagnóstico.

Con base en los resultados obtenidos de la citocina SDF-1 sería importante estudiar las concentraciones del receptor de SDF-1 CXCR4 en células nucleadas y correlacionarlo con las concentraciones de SDF-1 en eventos de recaída.

Las células afectadas principalmente por la LLA-B son los linfocitos, la información obtenida que brindaría realizar los estudios de defensas antioxidantes en estas células complementaría el panorama del estatus antioxidante, además en células nucleadas podrían evaluarse la activación del factor de transcripción nuclear NRF2, y relacionarlo con la respuesta antioxidante.

Los resultados positivos obtenidos en este trabajo en la respuesta antioxidante podrían reforzar la idea de administrar el co-tratamiento durante un tiempo más largo.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Abdul-Aziz, A., Macewan, D. J., Bowles, K. M., & Rushworth, S. A. (2015). Oxidative stress responses and NRF2 in human leukaemia. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/454659>
- Abed, M., Alzoubi, K., Lang, F., & al Mamun Bhuayn, A. (2017). Stimulation of Phospholipid Scrambling of the Erythrocyte Membrane by 9-Cis-Retinoic Acid. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 41(2), 543–554. <https://doi.org/10.1159/000457014>
- Aebi H. (1984). *Catalase in Vitro*. 105(1947), 121–126.
- Aguilar-Dorado, I. C., Hernández, G., Quintanar-Escorza, M. A., Maldonado-Vega, M., Rosas-Flores, M., & Calderón-Salinas, J. V. (2014). Eryptosis in lead-exposed workers. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 281(2), 195–202. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2014.10.003>
- Ahmad, R., Tripathi, A. K., Tripathi, P., Singh, R., Singh, S., & Singh, R. K. (2008). Oxidative stress and antioxidant status in patients with chronic myeloid leukemia. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 23(4), 328–333. <https://doi.org/10.1007/s12291-008-0072-9>
- Akhgarjand, C., Djafarian, K., Rezvani, H., Azargashb, E., & Vafa, M. (2018). Comparing serum levels of zinc, copper, certain antioxidant vitamins and dietary intakes in acute lymphoblastic leukemia (ALL) patients before and after chemotherapy. *American Journal of Blood Research*, 8(3), 21–28. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30498622> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC6261838>
- Al-Gayyar, M. M. H., Eissa, L. A., Rabie, A. M., & El-Gayar, A. M. (2007). Measurements of oxidative stress status and antioxidant activity in chronic leukaemia patients. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 59(3), 409–417. <https://doi.org/10.1211/jpp.59.3.0011>
- Al-Tonbary, Y., Al-Haggar, M., El-Ashry, R., El-Dakroory, S., Azzam, H., & Fouda, A. (2009). Vitamin e and N-acetylcysteine as antioxidant adjuvant therapy in children with acute lymphoblastic leukemia. *Advances in Hematology*, 2009. <https://doi.org/10.1155/2009/689639>
- Al-Tonbary, Y., Al-Hasan, S. A., Zaki, M., Hammad, A., Kandil, S., & Fouda, A. (2011). Impact of anti-oxidant status and apoptosis on the induction phase of chemotherapy in

- childhood acute lymphoblastic leukemia. *Hematology*, 16(1), 14–19.
<https://doi.org/10.1179/102453311X12902908411553>
- Alzoughaibi, M. A., Al-Mofleh, I. A., & Al-Jebreen, A. M. (2014). Antioxidant activities for superoxide dismutase in patients with crohn’s disease. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 25(1), 59–62. <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2013-0042>
- American Cancer Society. (2016). Childhood Leukemia. In *American Cancer Society*.
www.cancer.org
- American Cancer Society. (2018). *Datos y Estadísticas sobre el Cáncer entre los hispanos/latinos 2018-2020*.
- Ammar, M., ben Mahmoud, L., Medhaffar, M., Ghozzi, H., Sahnoun, Z., Hakim, A., Mseddi, M., Elloumi, M., & Zeghal, K. (2020). Relationship of oxidative stress in the resistance to imatinib in Tunisian patients with chronic myeloid leukemia: A retrospective study. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 34(2), 1–8.
<https://doi.org/10.1002/jcla.23050>
- Barretina, J., Juncà, J., Llano, A., Gutiérrez, A., Flores, A., Blanco, J., Clotet, B., & Esté, J. A. (2003). CXCR4 and SDF-1 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia and stage of the disease. *Annals of Hematology*, 82(8), 500–505.
<https://doi.org/10.1007/s00277-003-0679-0>
- Battisti, V., Maders, L. D. K., Bagatini, M. D., Santos, K. F., Spanevello, R. M., Maldonado, P. A., Brulé, A. O., Araújo, M. do C., Schetinger, M. R. C., & Morsch, V. M. (2008). Measurement of oxidative stress and antioxidant status in acute lymphoblastic leukemia patients. *Clinical Biochemistry*, 41(7–8), 511–518.
<https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2008.01.027>
- ben Mahmoud, L., Mdhaffar, M., Ghozzi, H., Ammar, M., Hakim, A., Atheymen, R., Sahnoun, Z., Elloumi, M., & Zeghal, K. (2017). Oxidative Stress in Tunisian Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia and Its Involvement in Leukemic Relapse. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, 39(3), e124–e130.
<https://doi.org/10.1097/MPH.0000000000000793>
- Bergendi’, L. ’, Benes, L., Duraekova’, Z., & Fereneik3, M. (1999). Chemistry, Physiology and Pathology of Free Radicals. *Life Sciences*, 65(99), 1865–1874.
- Block, K. I., Koch, A. C., Mead, M. N., Tothy, P. K., Newman, R. A., & Gyllenhaal, C. (2008). Impact of antioxidant supplementation on chemotherapeutic toxicity: A systematic review of the evidence from randomized controlled trials. *International Journal of Cancer*, 123(6), 1227–1239. <https://doi.org/10.1002/ijc.23754>

- Böhm, B., Heinzemann, S., Motz, M., & Bauer, G. (2015). Extracellular localization of catalase is associated with the transformed state of malignant cells. *Biological Chemistry*, 396(12), 1339–1356. <https://doi.org/10.1515/hsz-2014-0234>
- Bonomini, M., Sirolli, V., Settefrati, N., Dottori, S., di Liberato, L., & Arduini, A. (1999). Increased erythrocyte phosphatidylserine exposure in chronic renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology*, 10(9), 1982–1990.
- Borst, O., Abed, M., Alesutan, I., Towhid, S. T., Qadri, S. M., Föller, M., Gawaz, M., & Lang, F. (2012). Dynamic adhesion of eryptotic erythrocytes to endothelial cells via CXCL16/SR-PSOX. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 302(4), 644–651. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00340.2011>
- Bouyssou, J. M. C., Ghobrial, I. M., & Roccaro, A. M. (2016). Targeting SDF-1 in multiple myeloma tumor microenvironment. *Cancer Letters*, 380(1), 315–318. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.11.028>
- Calderón-Salinas, J. V., Muñoz-Reyes, E. G., Guerrero-Romero, J. F., Rodríguez-Morán, M., Bracho-Riquelme, R. L., Carrera-Gracia, M. A., & Quintanar-Escorza, M. A. (2011). Eryptosis and oxidative damage in type 2 diabetic mellitus patients with chronic kidney disease. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 357(1–2), 171–179. <https://doi.org/10.1007/s11010-011-0887-1>
- Cárdenas, Rodríguez. N., & Pedraza, Chaverri. J. (2005). Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes : aspectos básicos. *Educación Química*, 12(2), 164–173.
- Chang, H. Y., Gyou, C. J., & Keun, J. S. (2007). Changes of terminal cancer patients' health-related quality of life after high dose vitamin C administration. *Journal of Korean Medical Science*, 22(1), 7–11.
- Ciudad, J., & Orfao, A. (2007). Utilidad del inmunofenotipo en el diagnóstico y el seguimiento de la leucemia linfoblástica aguda del adulto. *Med. Clín (Ed. Impr.)*, 129(Supl 1), 3–14.
- Common Terminology Criteria for Adverse Events. (2016). *National Cancer Institute*.
- Conklin, K. A. (2002). Dietary polyunsaturated fatty acids: Impact on cancer chemotherapy and radiation. *Alternative Medicine Review*, 7(1), 4–21.
- Conklin, K. A. (2004). Chemotherapy-associated oxidative stress: Impact on chemotherapeutic effectiveness. *Integrative Cancer Therapies*, 3(4), 294–300. <https://doi.org/10.1177/1534735404270335>
- Conklin, K. A., & Conklin, K. A. (2000). Dietary Antioxidants During Cancer Chemotherapy : Impact on Chemotherapeutic Effectiveness and Development of Side

- Effects nutrition and cancer. *Nutrition and Cancer*, 37(1), 1–18.
<https://doi.org/10.1207/S15327914NC3701>
- Cortese-krott, M. M., & Shiva, S. (2019). The redox physiology of red blood cells and platelets : implications for their interactions and potential use as systemic biomarkers. *Current Opinion in Psychology*, 9, 56–66.
<https://doi.org/10.1016/j.cophys.2019.04.016>
- D'Andrea, G. M. (2005). Use of Antioxidants During Chemotherapy and Radiotherapy Should Be Avoided. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 55(5), 319–321.
<https://doi.org/10.3322/canjclin.55.5.319>
- de Lourdes Perim, A., Amarante, M. K., Guembarovski, R. L., de Oliveira, C. E. C., & Watanabe, M. A. E. (2015). CXCL12/CXCR4 axis in the pathogenesis of acute lymphoblastic leukemia (ALL): A possible therapeutic target. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(9), 1715–1723. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1830-x>
- Demir C., Demir H., Esen R., Atmaca M., T. E. (2010). Erythrocyte catalase and carbonic anhydrase activities in lung cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 11(5), 1377–1382.
- Devi, G. S., Prasad, M. H., Saraswathi, I., Raghu, D., Rao, D. N., & Reddy, P. P. (2000). Free radicals antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different types of leukemias. *Clinica Chimica Acta*, 293(1–2), 53–62. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(99\)00222-3](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(99)00222-3)
- Díaz, A., Loewen, P. C., Fita, I., & Carpena, X. (2012). Thirty years of heme catalases structural biology. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 525(2), 102–110.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2011.12.011>
- Dobrakowski, M., Pawlas, N., Kasperczyk, A., Kozłowska, A., Olewińska, E., Machoń-Grecka, A., & Kasperczyk, S. (2017). Oxidative DNA damage and oxidative stress in lead-exposed workers. *Human and Experimental Toxicology*, 36(7), 744–754.
<https://doi.org/10.1177/0960327116665674>
- Donato, M. T. (2000). 1. ¿Qué es el citocromo P-450 y cómo funciona? *Maria Teresa Donato Martín*, 29–62.
- Doulatov, S., Notta, F., Laurenti, E., & Dick, J. E. (2012). Hematopoiesis: A human perspective. *Cell Stem Cell*, 10(2), 120–136.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.01.006>
- Du, J., Cullen, J. J., & Buettner, G. R. (2012). Biochimica et Biophysica Acta Ascorbic acid : Chemistry , biology and the treatment of cancer ☆. *BBA - Reviews on Cancer*, 1826(2), 443–457. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2012.06.003>

- Dy G., A. A. (2004). Principles of chemotherapy. In *The Scientific Basis of Urology, Second Edition* (pp. 508–520). https://doi.org/10.5005/jp/books/11193_12
- Erel, O. (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*, *37*(4), 277–285. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2003.11.015>
- Esquivel-Velázquez, M., Ostoa-Saloma, P., Palacios-Arreola, M. I., Nava-Castro, K. E., Castro, J. I., & Morales-Montor, J. (2015). The role of cytokines in breast cancer development and progression. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, *35*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1089/jir.2014.0026>
- FAD. (2017). *Clinical pharmacology and biopharmaceutics reviews FAD*. Ref ID 4161360. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2017/209112Orig1s000_ClinPharmR.pdf
- Farag, M. R., & Alagawany, M. (2018). Erythrocytes as a biological model for screening of xenobiotics toxicity. *Chemico-Biological Interactions*, *279*, 73–83. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.11.007>
- Fayh, A. P. T., Gomes, C. de C., Schroeder, H. T., Muller, C. H. de L., Lemos, T. M. de A. M., & Krause, M. (2018). Induction chemotherapy reduces extracellular heat shock protein 72 levels, inflammation, lipoperoxidation and changes insulin sensitivity in children and adolescents newly diagnosed with acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget*, *9*(47), 28784–28795. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25609>
- Foa, B. R., Massaia, M., Cardona, S., Tos, A. G., Bianchi, A., Attisano, C., Guarini, A., Francia, P., & Fierro, M. T. (1990). Production of Tumor Necrosis Factor-alpha by B-Cell Chronic Lymphocytic leukemia cells: A possible regulatory role of TNF in the progression of the disease. *Blood*, *76*(2), 393–400.
- Föller, M., Huber, S. M., & Lang, F. (2008). Erythrocyte programmed cell death. *IUBMB Life*, *60*(10), 661–668. <https://doi.org/10.1002/iub.106>
- Friedman, B., & Cronstein, B. (2019). Methotrexate mechanism in treatment of rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*, *86*(3), 301–307. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2018.07.004>
- Fuchs-Tarlovsky, V. (2013). Role of antioxidants in cancer therapy. *Nutrition*, *29*(1), 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2012.02.014>
- Fukai, T., & Ushio-Fukai, M. (2011). Superoxide dismutases: Role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxidants and Redox Signaling*, *15*(6), 1583–1606. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.3999>

- Gaman, A. M., Buga, A. M., Gaman, M. A., & Popa-Wagner, A. (2014). The role of oxidative stress and the effects of antioxidants on the incidence of infectious complications of chronic lymphocytic leukemia. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/158135>
- Ganesh Yerra, V., Negi, G., Sharma, S. S., & Kumar, A. (2013). Potential therapeutic effects of the simultaneous targeting of the Nrf2 and NF- κ B pathways in diabetic neuropathy. *Redox Biology*, 1(1), 394–397. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.07.005>
- Gelmini, S., Mangoni, M., Serio, M., Romagnani, P., & Lazzeri, E. (2008). The critical role of SDF-1/CXCR4 axis in cancer and cancer stem cells metastasis. *Journal of Endocrinological Investigation*, 31(9), 809–819. <https://doi.org/10.1007/BF03349262>
- Glorieux, C., & Calderon, P. B. (2017). Catalase, a remarkable enzyme: Targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biological Chemistry*, 398(10), 1095–1108. <https://doi.org/10.1515/hsz-2017-0131>
- Glorieux, C., Zamocky, M., Sandoval, J. M., Verrax, J., & Calderon, P. B. (2015). Regulation of catalase expression in healthy and cancerous cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 87, 84–97. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.017>
- González-torres, M. C., & Ortiz-muñiz, M. B. R. (2000). Daño Oxidativo y Antioxidantes. *Bioquimia*, 25(1), 3–9.
- Griffith, O. W. (1999). Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(9–10), 922–935. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00176-8](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00176-8)
- Halliwell, B. (1989). Tell me about free radicals, doctor: A review. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 82(12), 747–752. <https://doi.org/10.1177/014107688908201216>
- Halliwell, Barry. (2001). Free Radicals and Other Reactive Species in Disease. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1–7. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0002269>
- Herlax, V., Vazquez, R., Mate, S., & Bakás, L. (2011). Eriptosis, la muerte suicida de eritrocitos: mecanismo y enfermedades asociadas. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 45(2), 287–296.
- Hockenberry, M. J., Pan, W., Scheurer, M. E., Hooke, M. C., Taylor, O., Koerner, K., Montgomery, D., Whitman, S., Mitby, P., & Moore, I. (2019). The Influence of Inflammatory and Oxidative Stress Pathways on Longitudinal Symptom Experiences in Children With Leukemia. *Biological Research for Nursing*, 21(5), 458–465. <https://doi.org/10.1177/1099800419863160>

- Hooke, M. C., Hatch, D., Hockenberry, M. J., Whitman, S., Moore, I., Montgomery, D., Marano, K., Mitby, P., Scheurer, M. E., Taylor, O., & Pan, W. (2020). The Longitudinal Parallel Process Analysis of Biomarkers of Oxidative Stress, Symptom Clusters, and Cognitive Function in Children With Leukemia. *Journal of Pediatric Oncology Nursing*. <https://doi.org/10.1177/1043454220909785>
- Irwin, M. E., Rivera-Del Valle, N., & Chandra, J. (2013). Redox control of leukemia: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants and Redox Signaling*, *18*(11), 1349–1383. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4258>
- Jaime Pérez, J. C., & Gómez Almaguer, D. (2009). Hematología: La sangre y sus enfermedades. In *McGraw Hill*. <https://doi.org/10.1016/B978-84-8174-886-4.50009-X>
- Jain, S. K., McVie, R., Duett, J., & Herbst, J. J. (1989). Erythrocyte membrane lipid peroxidation and glycosylated hemoglobin in diabetes. *Diabetes*, *38*(12), 1539–1543. <https://doi.org/10.2337/diab.38.12.1539>
- Juarez, J., dela Pena, A., Baraz, R., Hewson, J., Khoo, M., Cisterne, A., Fricker, S., Fujii, N., Bradstock, K. F., & Bendall, L. J. (2007). CXCR4 antagonists mobilize childhood acute lymphoblastic leukemia cells into the peripheral blood and inhibit engraftment. *Leukemia*, *21*(6), 1249–1257. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404684>
- Kambayashi, Y., Binh, N. T., Asakura, H. W., Hibino, Y., Hitomi, Y., Nakamura, H., & Ogino, K. (2009). Efficient assay for total antioxidant capacity in human plasma using a 96-well microplate. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, *44*(1), 46–51. <https://doi.org/10.3164/jcbrn.08-162>
- Kannan, K., & Jain, S. K. (2000). *Oxidative stress and apoptosis*. *7*(27), 153–163.
- Kennedy, D. D., Ladas, E. J., Rheingold, S. R., Blumberg, J., & Kelly, K. M. (2005). Antioxidant status decreases in children with acute lymphoblastic leukemia during the first six months of chemotherapy treatment. *Pediatric Blood and Cancer*, *44*(4), 378–385. <https://doi.org/10.1002/pbc.20307>
- Kim, Ha G., Kim J.E., Jeong R., Y. S. (2015). The Role of Oxidative stress in Neurobiology diseases. *Exp Neurobiol*, *24*(4), 325–340. <https://doi.org/10.5607>
- Kirkman, H. N., & Gaetani, G. F. (1984). Catalase: A tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *81*(14 I), 4343–4347. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.14.4343>
- Kono, Y., & Fridovich, I. (1982). *Superoxide Radical Inhibits Catalase**. *257*(10), 5751–5754.

- Krawczuk-Rybak, M., Panasiuk, A., Czygier, M., Muszynska-Roslan, K., Wysocka, J., & Szmitkowski, M. (2012). Total antioxidant status (TAS) in childhood cancer survivors. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 50(3), 468–472. <https://doi.org/10.5603/FHC.2012.0065>
- Kreitz, J., Schönfeld, C., Seibert, M., Stolp, V., Alshamleh, I., Oellerich, T., Steffen, B., Schwalbe, H., Schnütgen, F., Kurrle, N., & Serve, H. (2019). Metabolic Plasticity of Acute Myeloid Leukemia. *Cells*, 8(8), 1–28. <https://doi.org/10.3390/cells8080805>
- Kuhn, V., Diederich, L., Stevenson, T.C., Kramer, C. et al. (2017). Red Blood Cell Function and Dysfunction: Redox regulation, Nitric Oxide Metabolism, Anemia. *Antioxidants and Redox Signaling*, 26(13), 718–742. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6954>
- Kumar, B., Garcia, M., Murakami, J. L., & Chen, C. C. (2016). Exosome-mediated microenvironment dysregulation in leukemia. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1863(3), 464–470. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.09.017>
- Kupsa, T., Vasatova, M., Karesova, I., Zak, P., & Horacek, J. M. (2014). Baseline serum levels of multiple cytokines and adhesion molecules in patients with acute myeloid leukemia: Results of a pivotal trial. *Experimental Oncology*, 36(4), 252–257.
- Labriola, D., & Livingston, R. (1999). Possible Interactions between Dietary Antioxidants and Chemotherapy. *Oncology*, 13(7), 1003–1008.
- Lang S. K., Lang A. P., Bauer C., Duranton C., Wieder T., Huber S., L. F. (2005). Cellular Physiology and Biochemistry Biochemistry Stimulation of Suicidal Erythrocyte Death by Methylglyoxal. *Cell Physiol Biochem*, 15, 195–202. <https://doi.org/10.1159/000369666>
- Lawenda, B. D., Kelly, K. M., Ladas, E. J., Sagar, S. M., Vickers, A., & Blumberg, J. B. (2008). Should supplemental antioxidant administration be avoided during chemotherapy and radiation therapy? *Journal of the National Cancer Institute*, 100(11), 773–783. <https://doi.org/10.1093/jnci/djn148>
- Lei, X. G., Zhu, J. H., Cheng, W. H., Bao, Y., Ho, Y. S., Reddi, A. R., Holmgren, A., & Arnér, E. S. J. (2015). Paradoxical roles of antioxidant enzymes: Basic mechanisms and health implications. *Physiological Reviews*, 96(1), 307–364. <https://doi.org/10.1152/physrev.00010.2014>
- Leinonen, H. M., Kansanen, E., Pölönen, P., Heinäniemi, M., & Levonen, A. L. (2014). Role of the keap1-Nrf2 pathway in cancer. In *Advances in Cancer Research* (Vol. 122). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420117-0.00008-6>

- Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., Gargiulo, G., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D., & Abete, P. (2018). Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical Interventions in Aging*, *13*, 757–772. <https://doi.org/10.2147/CIA.S158513>
- Lippitz, B. E. (2013). Cytokine patterns in patients with cancer: A systematic review. *The Lancet Oncology*, *14*(6), e218–e228. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70582-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70582-X)
- Liu, Y. Z., Wang, Y. X., & Jiang, C. L. (2017). Inflammation: The common pathway of stress-related diseases. *Frontiers in Human Neuroscience*, *11*(June), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2017.00316>
- Loe, D. W., Deeley, R. G., & Cole, S. P. C. (1998). Characterization of Vincristine Transport by the Mr 190,000 Multidrug Resistance Protein (MRP): Evidence for Cotransport with Reduced Glutathione1. *Cancer Research*, *58*, 5130–5136.
- López-Vanegas, N. C., Hernández, G., Maldonado-Vega, M., & Calderón-Salinas, J. V. (2020). Leukocyte apoptosis, TNF- α concentration and oxidative damage in lead-exposed workers. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *391*, 114901. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2020.114901>
- Lowry O., Rosebrough A., Farr A.L., R. R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, *193*, 265–275.
- Lu, S. (2014). Glutathione Synthesis. *Biochim Biophys Acta*, *1830*(5), 3143–3153. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.09.008>.GLUTATHIONE
- Lubos, E., Loscalzo, J., & Handy, D. E. (2011). Glutathione peroxidase-1 in health and disease: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants and Redox Signaling*, *15*(7), 1957–1997. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3586>
- Ma, Y., Ren, Y., Dai, Z., Wu, C., Ji, Y., & Xu, J. (2017). *IL-6* , *IL-8* and *TNF- α* levels correlate with disease stage in breast cancer patients. 4–9. <https://doi.org/10.17219/acem/62120>
- Maioral, M. F., Gaspar, P. C., Rosa Souza, G. R., Mascarello, A., Chiaradia, L. D., Licínio, M. A., Moraes, A. C. R., Yunes, R. A., Nunes, R. J., & Santos-Silva, M. C. (2013). Apoptotic events induced by synthetic naphthylchalcones in human acute leukemia cell lines. *Biochimie*, *95*(4), 866–874. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.12.001>
- Mantovani, G., Macciò, A., Madeddu, C., Mura, L., Gramignano, G., Lusso, M. R., Massa, E., Mocci, M., & Serpe, R. (2003). Antioxidant agents are effective in inducing lymphocyte progression through cell cycle in advanced cancer patients: Assessment of the most important laboratory indexes of cachexia and oxidative stress. *Journal of Molecular Medicine*, *81*(10), 664–673. <https://doi.org/10.1007/s00109-003-0476-1>

- Mantovani, G., Macciò, A., Madeddu, C., Mura, L., Gramignano, G., Lusso, M. R., Murgia, V., Camboni, P., Ferreli, L., Mocci, M., & Massa, E. (2003). The impact of different antioxidant agents alone or in combination on reactive oxygen species, antioxidant enzymes and cytokines in a series of advanced cancer patients at different sites: Correlation with disease progression. *Free Radical Research*, *37*(2), 213–223. <https://doi.org/10.1080/10715760303849>
- Martin, S. J., Reutelingsperger, C. P. M., McGahon, A. J., Rader, J. A., van Schie, R. C. A. A., LaFace, D. M., & Green, D. R. (1995). Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: Inhibition by overexpression of BCL-2 and Abl. *Journal of Experimental Medicine*, *182*(5), 1545–1556. <https://doi.org/10.1084/jem.182.5.1545>
- Mayani H., F. E., & Pelayo R., Montesinos J., F.-G. P. C.-G. A. (2007). Hematopoyesis. *Cancerología*, *2*, 95–107.
- Mazor D., Abucoider A., Meyerstein N., K. J. (2008). Antioxidant status in pediatric acute lymphocytic leukemia (ALL) and solid tumors: The impact of oxidative stress. *Pediatric Blood & Cancer*, *51*, 613–615. <https://doi.org/10.1002/pbc.21665>
- McGowan, J. v., Chung, R., Maulik, A., Piotrowska, I., Walker, J. M., & Yellon, D. M. (2017). Anthracycline Chemotherapy and Cardiotoxicity. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, *31*(1), 63–75. <https://doi.org/10.1007/s10557-016-6711-0>
- Minetti, M. and Malorni, W. (2006). Redox control of red blood cell biology: The red blood cell as a target and source of prooxidant species. *Antioxidants and Redox Signaling*, *8*(19), 1165–1169.
- Mitchell, C., Hall, G., & Clarke, R. T. (2009). Acute leukaemia in children: Diagnosis and management. *BMJ (Online)*, *338*(7709), 1491–1495. <https://doi.org/10.1136/bmj.b2285>
- Molica, S., Vitelli, G., Levato, D., Levato, L., Dattilo, A., & Gandolfo, G. M. (1999). Clinico-biological implications of increased serum levels of interleukin-8 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*, *84*(3), 208–211.
- Moore, I. M., Gundy, P., Pasvogel, A., Montgomery, D. W., Taylor, O. A., Koerner, K. M., McCarthy, K., & Hockenberry, M. J. (2015). Increase in oxidative stress as measured by cerebrospinal fluid lipid peroxidation during treatment for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, *37*(2), e86–e93. <https://doi.org/10.1097/MPH.0000000000000258>
- Moore, I. M. (Ki), Koerner, K. M., Gundy, P. M., Montgomery, D. W., Insel, K. C., Harris, L. L., Taylor, O. A., & Hockenberry, M. J. (2018). Changes in Oxidant Defense,

Apoptosis, and Cognitive Abilities During Treatment for Childhood Leukemia. *Biological Research for Nursing*, 20(4), 393–402.
<https://doi.org/10.1177/1099800418763124>

Nagababu, E., Chrest, F. J., & Rifkind, J. M. (2003). Hydrogen-peroxide-induced heme degradation in red blood cells: The protective roles of catalase and glutathione peroxidase. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1620(1–3), 211–217.
[https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(02\)00537-8](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(02)00537-8)

Naz, A., Shamsi, T. S., Sattar, A., & Mahboob, T. (2013). Oxidative stress and total antioxidant status in acute leukemia at diagnosis and post remission induction phase. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 26(6), 1123–1130.

Noori, N. M., Shahramian, I., Teimouri, A., Keyvani, B., & Mahjoubifard, M. (2017). Serum Levels of Tumor Necrosis Factor- α and Interleukins in Children with Congenital Heart Disease. *J Teh Univ Heart Ctr*, 12(1), 15–22.

Oberley, L. W., & Buettner, G. R. (1979). Role of Superoxide Dismutase in Cancer: A Review. *Cancer Research*, 39(4), 1141–1149.

Pace, A., Giannarelli, D., Galiè, E., Savarese, A., Carpano, S., della Giulia, M., Pozzi, A., Silvani, A., Gaviani, P., Scaioli, V., Jandolo, B., Bove, L., & Cognetti, F. (2010). Vitamin e neuroprotection for cisplatin neuropathy: A randomized, placebo-controlled trial. *Neurology*, 74(9), 762–766. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181d5279e>

Paglia, D.E. and Valentine, W. E. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.*, 70, 158–169.

Pandey, P., Singh, A. K., Singh, M., Tewari, M., Shukla, H. S., & Gambhir, I. S. (2017). The see-saw of Keap1-Nrf2 pathway in cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 116, 89–98. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.02.006>

Papageorgiou, M., Stiakaki, E., Dimitriou, H., Malliaraki, N., Notas, G., Castanas, E., & Kalmanti, M. (2005). Cancer chemotherapy reduces plasma total antioxidant capacity in children with malignancies. *Leukemia Research*, 29(1), 11–16.
<https://doi.org/10.1016/j.leukres.2004.04.017>

Patinen, T., Adinolfi, S., Cortés, C. C., Härkönen, J., Jawahar Deen, A., & Levonen, A. L. (2019). Regulation of stress signaling pathways by protein lipoxidation. *Redox Biology*, 23(November 2018), 101114. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101114>

Paul, S., Kantarjian, H., & Jabbour, E. J. (2016). Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *Mayo Clinic Proceedings*, 91(11), 1645–1666.
<https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2016.09.010>

- Pérez-Saldivar, M. L., Fajardo-Gutiérrez, A., Bernáldez-Ríos, R., Martínez-Avalos, A., Medina-Sanson, A., Espinosa-Hernández, L., Flores-Chapa, J. D. D., Amador-Sánchez, R., Peñalosa-González, J. G., Álvarez-Rodríguez, F. J., Bolea-Murga, V., Flores-Lujano, J., Rodríguez-Zepeda, M. D. C., Rivera-Luna, R., Dorantes-Acosta, E. M., Jiménez-Hernández, E., Alvarado-Ibarra, M., Velázquez-Aviña, M. M., Torres-Nava, J. R., ... Mejia-Arangure, J. M. (2011). Childhood acute leukemias are frequent in Mexico City: Descriptive epidemiology. *BMC Cancer*, *11*.
<https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-335>
- Quintanar-Escorza, M. A., González-Martínez, M. T., del Pilar, I. O. M., & Calderón-Salinas, J. v. (2010). Oxidative damage increases intracellular free calcium [Ca²⁺]_i concentration in human erythrocytes incubated with lead. *Toxicology in Vitro*, *24*(5), 1338–1346. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.05.002>
- Quintanar-Escorza M. Calderón-Salinas J. (2009). LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL . *Revista de Educación Bioquímica*, *28*(3), 89–101.
- Raber, M., Wu, J., Donnella, H., Knouse, P., Pise, M., Munsell, M., Liu, D., & Chandra, J. (2019). *Lymphoma Patients Undergoing Treatment Is Associated with Protein Consumption*.
- Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., & Dhama, K. (2014). Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: The interplay. *BioMed Research International*, *2014*. <https://doi.org/10.1155/2014/761264>
- Rahman, I., Kode, A., & Biswas, S. K. (2007). Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nature Protocols*, *1*(6), 3159–3165. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.378>
- Rasool, M., Farooq, S., Malik, A., Shaukat, A., Manan, A., Asif, M., Sani, S., Qazi, M. H., Kamal, M. A., Iqbal, Z., & Hussain, A. (2015). Assessment of circulating biochemical markers and antioxidative status in acute lymphoblastic leukemia (ALL) and acute myeloid leukemia (AML) patients. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *22*(1), 106–111. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.09.002>
- Rayet, B., & Gélinas, C. (1999). Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene*, *18*(49), 6938–6947. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203221>
- Rayman, M. P. (2005). Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action. *Proceedings of the Nutrition Society*, *64*(4), 527–542.
<https://doi.org/10.1079/pns2005467>
- Rendón-Ramírez, A. L., Maldonado-Vega, M., Quintanar-Escorza, M. A., Hernández, G., Arévalo-Rivas, B. I., Zentella-Dehesa, A., & Calderón-Salinas, J. V. (2014). Effect of

- vitamin E and C supplementation on oxidative damage and total antioxidant capacity in lead-exposed workers. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 37(1), 45–54. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.10.016>
- Reuter S., Gupta S., Chaturvedi M., A. B. (2011). Oxidative stress, inflammation, and cancer. *Free Radic Biol Med*, 49(11), 1603–1616. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006>.Oxidative
- Rivera-Luna, R., Cárdenas-Cardos, R., Olaya-Vargas, A., Shalkow-Klincovstein, J., Pérez-García, M., Alberto Pérez-González, O., Díaz-Jiménez, V., Amador-Zarco, J. J., & Melchor Vidal, Y. (2015). El niño de población abierta con cáncer en México. Consideraciones epidemiológicas. *An Med*, 60(2), 91–97. www.medigraphic.org.mx
- Rodgers, C., Sanborn, C., Taylor, O., Gundy, P., Pasvogel, A., Moore, I. M. (Ki), & Hockenberry, M. J. (2016). Fatigue and Oxidative Stress in Children Undergoing Leukemia Treatment. *Biological Research for Nursing*, 18(5), 515–520. <https://doi.org/10.1177/1099800416647794>
- Röhrdanz E. and Kahl R. (1998). ALTERATIONS OF ANTIOXIDANT ENZYME EXPRESSION IN RESPONSE TO HYDROGEN PEROXIDE. *Free Radical Biology and Medicine*, 24(1), 27–38.
- Rush, J. W. E., & Sandiford, S. D. (2003). Plasma glutathione peroxidase in healthy young adults: Influence of gender and physical activity. *Clinical Biochemistry*, 36(5), 345–351. [https://doi.org/10.1016/S0009-9120\(03\)00039-0](https://doi.org/10.1016/S0009-9120(03)00039-0)
- Salehi, B., Martorell, M., Arbiser, J. L., Sureda, A., Martins, N., Maurya, P. K., Sharifi-Rad, M., Kumar, P., & Sharifi-Rad, J. (2018). Antioxidants: Positive or negative actors? *Biomolecules*, 8(4), 1–11. <https://doi.org/10.3390/biom8040124>
- Samoylenko, A., Hossain, J. al, Mennerich, D., Kellokumpu, S., Hiltunen, J. K., & Kietzmann, T. (2013). Nutritional countermeasures targeting reactive oxygen species in cancer: From mechanisms to biomarkers and clinical evidence. *Antioxidants and Redox Signaling*, 19(17), 2157–2196. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4662>
- Samuel, S., Nguyen, T., & Choi, H. A. (2017). Pharmacologic Characteristics of Corticosteroids. *J Neurocrit Care*, 10(2), 53–59. <https://doi.org/https://doi.org/10.18700/jnc.170035>
- Sangeetha, P., Das, U. N., Koratkar, R., & Suryaprabha, P. (1990). Increase in free radical generation and lipid peroxidation following chemotherapy in patients with cancer. *Free Radical Biology and Medicine*, 8(1), 15–19. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(90\)90139-A](https://doi.org/10.1016/0891-5849(90)90139-A)

- Sanusi, R. S. (2019). Outcome of combined neoadjuvant chemotherapy and vitamin A in advanced cervical carcinoma: A randomized double-blind clinical trial. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 20(7), 2213–2218.
<https://doi.org/10.31557/APJCP.2019.20.7.2213>
- Sarmiento-Ribeiro, A. B., Proença, M. T., Sousa, I., Pereira, A., Guedes, F., Teixeira, A., & Oliveira, C. R. (2012). A possible role for oxidation stress in lymphoid leukaemias and therapeutic failure. *Leukemia Research*, 36(8), 1041–1048.
<https://doi.org/10.1016/j.leukres.2012.03.015>
- Schwarz, K. B. (1996). Oxidative stress during viral infection: A review. *Free Radical Biology and Medicine*, 21(5), 641–649. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(96\)00131-1](https://doi.org/10.1016/0891-5849(96)00131-1)
- Sentürker, S., Karahalil, B., Inal, M., Yilmaz, H., Hamza Müslümanoğlu, Gedikoglu, G., & Dizdaroglu, M. (1997). Oxidative DNA base damage and antioxidant enzyme levels in childhood acute lymphoblastic leukemia. *FEBS Letters*, 416(3), 286–290.
[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)01226-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01226-X)
- Sharma K, Singh U, Rai M, Shukla J, Gupta V, Narayan G, et al. (2020). Interleukin 6 and disease transformation in chronic myeloid leukemia: A Northeast Indian population. *J Can Res Ther*, 16(30), 3. https://doi.org/10.4103/jcrt.JCRT_137_17
- Sheng, X., & Mittelman, S. D. (2014). The role of adipose tissue and obesity in causing treatment resistance of acute lymphoblastic leukemia. *Frontiers in Pediatrics*, 2(JUN), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fped.2014.00053>
- Sheng, X., Tucci, J., Parmentier, J. H., Ji, L., Behan, J. W., Heisterkamp, N., & Mittelman, S. D. (2016). Adipocytes cause leukemia cell resistance to daunorubicin via oxidative stress response. *Oncotarget*, 7(45), 73147–73159.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.12246>
- Singh, R. K., Tripathi, A. K., Tripathi, P., Singh, S., Singh, R., & Ahmad, R. (2009). Studies on biomarkers for oxidative stress in patients with chronic myeloid leukemia. *Hematology/ Oncology and Stem Cell Therapy*, 2(1), 285–288.
[https://doi.org/10.1016/S1658-3876\(09\)50039-8](https://doi.org/10.1016/S1658-3876(09)50039-8)
- Singh, U., Devaraj, S., & Jialal, I. (2005). Vitamin E, Oxidative Stress, and Inflammation. *Annual Review of Nutrition*, 25(1), 151–174.
<https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.24.012003.132446>
- Sodani, K., Patel, A., Kathawala, R. J., & Chen, Z. S. (2012). Multidrug resistance associated proteins in multidrug resistance. *Chin J Cancer*, 31(2), 58–73.
<https://doi.org/10.5732/cjc.011.10329>

- Sopjani M., Föller M., Gulbins E., L. F. (2008). Suicidal Death of Erythrocytes due to selenium-compunds. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 22, 387–394.
- Steliarova-Foucher, E., Colombet, M., Ries, L. A. G., Moreno, F., Dolya, A., Bray, F., Hesseling, P., Shin, H. Y., Stiller, C. A., Bouzbid, S., Hamdi-Cherif, M., Hablas, A., Chirpaz, E., Buziba, N., Chesumbai, G. C., Manraj, S. S., Reynders, D., Wabinga, H. R., Chokunonga, E., ... Steliarova-Foucher, E. (2017). International incidence of childhood cancer, 2001–10: a population-based registry study. *The Lancet Oncology*, 18(6), 719–731. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30186-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30186-9)
- Stieglitz, E., & Loh, M. L. (2013). *Genetic predispositions to childhood leukemia*. 270–290. <https://doi.org/10.1177/2040620713498161>
- Stjernfeldt, M., Rindby, A., & Ludvigsson, J. (1985). Serum selenium in children with acute lymphoblastic leukemia: Preliminary results. *Pediatric Hematology and Oncology*, 2(1), 135–140. <https://doi.org/10.3109/08880018509141222>
- ten Hacken, E., & Burger, J. A. (2016). Microenvironment interactions and B-cell receptor signaling in Chronic Lymphocytic Leukemia: Implications for disease pathogenesis and treatment. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1863(3), 401–413. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.07.009>
- Tian, T., Wang, M., & Ma, D. (2014). TNF- α , a good or bad factor in hematological diseases? *Stem Cell Investigation*, 1(December 2012), 12. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2306-9759.2014.04.02>
- Trimarco, V., Ave, E., Facco, M., Chiodin, G., Frezzato, F., Martini, V., Gattazzo, C., Lessi, F., Giorgi, C. A., Visentin, A., Castelli, M., Severin, F., Zambello, R., Piazza, F., Semenzato, G., & Trentin, L. (2015). Cross-talk between chronic lymphocytic leukemia (CLL) tumor b cells and mesenchymal stromal cells (MSCs): Implications for neoplastic cell survival. *Oncotarget*, 6(39), 42130–42149. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6239>
- Udensi, U. K., & Tchounwou, P. B. (2014). Dual effect of oxidative stress on leukemia cancer induction and treatment. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 33(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13046-014-0106-5>
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39(1), 44–84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>

- Vermes, I., Haanen, C., & Reutelingsperger, C. (2000). Flow cytometry of apoptotic cell death. *Journal of Immunological Methods*, 243(1–2), 167–190.
[https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(00\)00233-7](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(00)00233-7)
- Whitehead, T. P., Metayer, C., Wiemels, J. L., Singer, A. W., & Miller, M. D. (2016). Childhood Leukemia and Primary Prevention. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care*, 46(10), 317–352.
<https://doi.org/10.1016/j.cppeds.2016.08.004>
- Winslow, T. (2007). *Hematopoietic tree*. Medical and Scientific Illustration.
<https://www.teresewinslow.com/>
- Wu, S., Gessner, R., Taube, T., & Korte, A. (2006). Chemokine IL-8 and Chemokine Receptor CXCR3 and CXCR4 Gene Expression in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia at First Relapse. 28(4), 216–220.
- Yacoub, H. A., Mahmoud, W. M., El-Baz, H. A. E., Eid, O. M., El-Fayoumi, R. I., Mahmoud, M. M., Harakeh, S., & Abuzinadah, O. H. A. (2014). New haplotypes of the ATP synthase subunit 6 gene of mitochondrial DNA are associated with acute lymphoblastic leukemia in Saudi Arabia. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(23), 10433–10438. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.23.10433>
- Yan, X. J., Dozmorov, I., Li, W., Yancopoulos, S., Sison, C., Centola, M., Jain, P., Allen, S. L., Kolitz, J. E., Rai, K. R., Chiorazzi, N., & Sherry, B. (2011). Identification of outcome-correlated cytokine clusters in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 118(19), 5201–5210. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-03-342436>
- Yin, H., Xu, L., & Porter, N. A. (2011). Free radical lipid peroxidation: Mechanisms and analysis. *Chemical Reviews*, 111(10), 5944–5972. <https://doi.org/10.1021/cr200084z>
- Yu, Z., Sun, B., Kantarjian, H. M., Keating, M. J., Amin, H. M., & Sun, X. (2008). Protein expression profiling of cytokines and cytokine receptors on purified chronic lymphocytic leukemia cells from patients with favourable prognostic indicators. *Leukemia and Lymphoma*, 49(4), 751–756.
<https://doi.org/10.1080/10428190801888696>
- Zaman, G. J. R., Lankelmat, J. A. N., Telling, O. van, V, J. B., Dekkert, H., Paulusma, C., Elferink, R. P. J. O., Baas, F., & Borst, P. (1995). Role of glutathione in the export of compounds from cells by the multidrug-resistance-associated protein. 92(August), 7690–7694.
- Zamocky, M., Furtmüller, P. G., & Obinger, C. (2008). Evolution of Catalases from Bacteria to Humans. *October*, 10(9), 1527–1548.
<https://doi.org/10.1089/ars.2008.2046.Evolution>

- Zelen, I., Djurdjevic, P., Popovic, S., Stojanovic, M., Jakovljevic, V., Radivojevic, S., Baskic, D., & Arsenijevic, N. (2010). Antioxidant enzymes activities and plasma levels of oxidative stress markers in B-chronic lymphocytic leukemia patients. *Journal of B.U.ON. : Official Journal of the Balkan Union of Oncology*, 15(2), 330–336.
- Zeligs, K. P., Neuman, M. K., & Annunziata, C. M. (2016). Molecular pathways: The Balance between cancer and the immune system challenges the therapeutic specificity of targeting nuclear Factor- κ B Signaling for cancer treatment. *Clinical Cancer Research*, 22(17), 4302–4308. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-1374>
- Zhang, J., Lei, W., Chen, X., Wang, S., & Qian, W. (2018). Oxidative stress response induced by chemotherapy in leukemia treatment (Review). *Molecular and Clinical Oncology*, 391–399. <https://doi.org/10.3892/mco.2018.1549>
- Zhang, J.-M., & An, J. (2009). Cytokines, Inflammation and Pain. *Int Anesthesiol Clin.*, 69(2), 482–489. <https://doi.org/10.1097/AIA.0b013e318034194e.Cytokines>
- Zhou, F., Zhang, W., Wei, Y., Zhou, D., Su, Z., Meng, X., Hui, L., & Tian, W. (2007). The changes of oxidative stress and human 8-hydroxyguanine glycosylase1 gene expression in depressive patients with acute leukemia. *Leukemia Research*, 31(3), 387–393. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2006.07.014>
- Zhou, X., Li, Z., & Zhou, J. (2017). Tumor necrosis factor α in the onset and progression of leukemia. *Experimental Hematology*, 45, 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2016.10.005>
- Zhou, Y., Hileman, E. O., Plunkett, W., Keating, M. J., & Huang, P. (2003). Free radical stress in chronic lymphocytic leukemia cells and its role in cellular sensitivity to ROS-generating anticancer agents. *Blood*, 101(10), 4098–4104. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-08-2512>
- Zitka, O., Skalickova, S., Gumulec, J., Masarik, M., Adam, V., Hubalek, J., Trnkova, L., Kruseova, J., Eckschlager, T., & Kizek, R. (2012). Redox status expressed as GSH:GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients. *Oncology Letters*, 4(6), 1247–1253. <https://doi.org/10.3892/ol.2012.931>