



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

**PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA EN CÉLULAS TRONCALES
HEMATOPOYÉTICAS (CD34+CD38-Lin-) DE PACIENTES CON
LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA: EFECTO DEL IMATINIB**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
SÓCRATES AVILÉS VÁZQUEZ

DIRECTOR DE TESIS
DR. HECTOR MAYANI VIVEROS
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR
DR. EMILIO ROJAS DEL CASTILLO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
DR. ALFREDO HIDALGO MIRANDA
FACULTAD DE MEDICINA

CIUDAD DE MÉXICO, DICIEMBRE 2020.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Células Troncales Leucémicas de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas del Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la dirección del Dr. Héctor Mayani Viveros y la Dra. Antonieta Chávez González en colaboración con el Dr. Alfredo Hidalgo Miranda del Laboratorio de Genómica del Cáncer del Instituto Nacional de Medicina Genómica, y la asesoría del comité tutor conformado por el Dr. Emilio Rojas del Castillo y el Dr. Alfredo Hidalgo Miranda

Este proyecto contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología SALUD 2007-C01-69664 y el estudiante fue becario del CONACYT con número 202849 y del IMSS con número 2011082.

¶ mis padres, el origen de mi universo.

¶ Giovana, el amor de mi vida.

¶ mis hermanos, mis compañeros en este universo.

¶ los que se fueron y se encuentran en alguna parte del universo.

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biomédicas de la UNAM por la oportunidad de continuar con mis estudios de doctorado.

Al Dr. Héctor Mayani por haber aceptado fungir como mi tutor y por compartir su gran conocimiento sobre la biología de las células troncales, por todas sus anécdotas y comentarios y por acercarme con los principales investigadores en el mundo de las células troncales.

A la Dra. Antonieta Chávez por permitirme estar en su laboratorio realizando el trabajo experimental, pero lo más importante por su amistad y transmisión de conocimientos en el campo de las células troncales leucémicas.

Al Dr. Alfredo Hidalgo por su ayuda en la parte genómica del proyecto, por su asesoría, sugerencias, disponibilidad y contribución a este proyecto

A la Dra Lourdes Arriaga por su gran amistad y la ayuda brindada en la parte de citometría de flujo.

Al Dr. Emilio Rojas del Castillo por la asesoría y comentarios acertados que enriquecieron el proyecto.

Al Dr. Manuel Ayala por la contribución en la parte de las muestras de pacientes y el aprendizaje durante el congreso de LMC en Lisboa.

Al Dr. Iván Velasco por el conocimiento transmitido durante las clases y los comentarios acertados durante la revisión de este trabajo.

A las Dras. Elizabeth Ortiz y Silvia Jiménez por sus comentarios en la revisión de este trabajo.

A los doctores Jose Antonio Moreno, Juan Jose Montesinos, Rosana Pelayo, Mauricio Salcedo por la ayuda recibida de sus respectivos laboratorios.

A mis compañeros de la UIMEO Dafne, Karina, Jessica, Ileana, Miguel, Sandy, Lupita, Martha, Rubicel, Gaby con los que pase varios momentos académicos y extracadémicos.

A los colaboradores del laboratorio de Genómica del Cáncer Luis, Rosa, Sandra, Alberto por la ayuda recibida.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN.....	3
ABSTRACT	5
INTRODUCCIÓN.....	7
HEMATOPOYESIS	7
LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA.....	13
CÉLULAS TRONCALES LEUCEMICAS	17
OPCIONES TERAPÉUTICAS EN LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA	18
MECANISMOS DE RESISTENCIA FARMACOLÓGICA EN CÉLULAS TRONCALES DE LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA.....	23
Mecanismos dependientes de BCR/ABL.	23
Mecanismos de resistencia independientes de BCR/ABL.....	26
ESTUDIOS DE PERFILES DE EXPRESION EN LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA. ...	31
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	34
PREGUNTAS QUE SE DESEA RESPONDER.....	34
OBJETIVO GENERAL.....	35
OBJETIVOS PARTICULARES.....	35
DIAGRAMA EXPERIMENTAL.	36
MATERIAL Y MÉTODOS.....	37
Muestras de pacientes.....	37
Aislamiento de células troncales y progenitoras.	37
Cultivo celular.....	38
Extracción de ARN.	38
RT-PCR punto final.....	39
Microarreglos de expresión génica.....	40

Análisis de microarreglos.....	41
RT-PCR en tiempo real.....	42
RESULTADOS.....	44
Extracción de ARN.....	44
RT-PCR en punto final.....	46
Cultivos con Imatinib.....	46
Separación de células troncales y progenitoras.....	53
Perfiles de expresión génica de células troncales de LMC vs células troncales de MON.	63
Perfiles de expresión génica de células progenitoras de LMC vs células progenitoras de MON.....	71
Los perfiles de expresión génica de células troncales de LMC son más similares a los de células progenitoras de MON que a los de células troncales de MON.....	79
Perfiles de expresión génica en células progenitoras CD34+CD38+Lin-de MON y LMC, cultivadas con o sin IM.....	81
PIEZO2, RXFP1 y MAMDC2 se expresan preferentemente en células troncales de LMC.....	88
DISCUSIÓN.....	90
CONCLUSIONES.....	97
REFERENCIAS.....	98
ANEXO 1.....	112

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxiribonucleico
AGM	Aorta gonáda mesonefros
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosina trifosfato
cADN	Ácido desoxiribonucleico complementario
CMN	Células mononucleares
CPH	Células progenitoras hematopoyéticas
CTH	Células troncales hematopoyéticas
CTL	Células troncales leucémicas
DAS	Dasatinib
EPO	Eritropoyetina
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FA	Fase aguda
FB	Fase blástica
FC	Fase crónica
Flt-3L	Ligando del receptor de tirosina cinasa parecido a FMS 3
G-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos macrófagos
IL-3	Interleucina 3
IL-6	Interleucina 6
IL-33	Interleucina 33
IM	Imatinib
ITC	Inhibidor de tirosina cinasa
Lin	Linaje
LLA-B	Leucemia linfoblástica aguda de células B
LMA	Leucemia mieloide aguda
LMC	Leucemia mieloide crónica
LNC	Leucemia neutrofilica crónica
MON	Médula ósea normal
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NIL	Nilotinib

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Ph	Filadelfia
RCC	Remisión citogénética completa
RHC	Remisión hematológica completa
RIN	Número de integridad de ácido ribonucleico.
RMC	Remisión molecular completa
SCF	Factor de células troncales
SPM	Sangre periférica movilizada
STAT	Transductor de señal y activador de la transcripción
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
TPO	Trombopoyetina

RESUMEN

La leucemia mieloide crónica (LMC) es una neoplasia mieloproliferativa crónica que se origina en una célula troncal con inmunofenotipo CD34+CD38-Lin-, y se caracteriza por la presencia de una alteración citogenética, el cromosoma Filadelfia, que resulta de una translocación recíproca entre los brazos largos del cromosoma 9 y 22. Esta translocación produce la proteína quimérica BCR/ABL con función constitutiva de tirosina cinasa, causando alteraciones como aumento en la proliferación, arresto de la diferenciación, inhibición de la apoptosis y cambios en el citoesqueleto, entre otras. La presencia de células troncales quiescentes con alta capacidad de auto-renovación, puede explicar el fracaso de la quimioterapia dependiente del ciclo celular para erradicar la LMC, con recaída posterior en todos los pacientes. El reconocimiento de la fosforilación constitutiva derivada de BCR/ABL permitió el desarrollo de fármacos dirigidos selectivamente a bloquear la actividad de cinasa, el primero de ellos imatinib (IM), obteniendo remisiones hematológicas y citogénéticas completas en la mayoría de los pacientes.

Sin embargo, existen reportes de resistencia a IM la cuál reside en la población de células troncales hematopoyéticas (CTH), por lo que para poder erradicar definitivamente el padecimiento, las terapias deben dirigirse a la detección y eliminación de las células troncales neoplásicas, en las cuales reside el origen de la enfermedad, razón por la cual se hace necesario identificar moléculas y vías de señalización que pudieran ser preferencialmente expresadas en estas células en comparación con sus contrapartes normales. En este trabajo se determinaron los perfiles de expresión génica de células primitivas hematopoyéticas (CD34+CD38-Lin- y CD34+CD38+Lin-) de pacientes con LMC antes y después de haber sido expuestos a IM para identificar genes y vías de señalización características de estas células, y su posible modificación por IM.

Nuestros resultados indican que los perfiles de expresión de las células troncales y progenitoras de LMC fueron más cercanos a los de los progenitores normales, mientras que las células troncales hematopoyéticas (CTH) normales mostraron los

perfiles de expresión más alejado de los otros grupos. Encontramos que los perfiles de expresión de CTH y células progenitoras hematopoyéticas (CPH) de LMC estaban más cerca unos de otros que los de CTH y CPH de médula normal. Los principales procesos biológicos desregulados en las células de LMC incluyen la reparación del ADN, el ciclo celular, la condensación cromosómica, la adhesión celular y la respuesta inmune.

Los cambios transcripcionales en células troncales y progenitoras normales y de LMC en condiciones de cultivo involucran a varios genes que participan en procesos como ciclo celular, biosíntesis de esteroides y segregación cromosómica, los cuales fueron regulados positivamente, mientras que genes implicados en regulación de la transcripción y apoptosis fueron regulados negativamente. Curiosamente, estos cambios fueron básicamente los mismos, independientemente de la adición de imatinib (IM) al cultivo. Se identificaron tres genes *PIEZO2*, *RXFP1* y *MAMDC2* expresados preferentemente por células primitivas de LMC y son codificantes de proteínas de membrana celular; por lo tanto, son biomarcadores potenciales para células troncales de LMC.

ABSTRACT

Chronic myeloid leukemia (CML) is a chronic myeloproliferative neoplasm that originates in a stem cell (CD34 + CD38-Lin-), and is characterized by the presence of a cytogenetic alteration, the Philadelphia chromosome that results from a reciprocal translocation between the long arms of the chromosome 9 and 22. This translocation produces the chimeric protein BCR/ABL with constitutive tyrosine kinase function, causing alterations such as increased proliferation, arrest of differentiation, inhibition of apoptosis and changes in the cytoskeleton, among others. The presence of quiescent stem cells with high capacity for self-renewal can explain the failure of chemotherapy, dependent on cell cycle to eradicate CML, with subsequent relapse in all patients. The recognition of the constitutive phosphorylation derived from BCR/ABL allowed the development of drugs directed selectively to block the activity of kinase the first of them imatinib (IM), obtaining complete hematological and cytogenetic remissions in the majority of patients.

However, there are reports of resistance to IM which resides in the population of hematopoietic stem cells (HSC), so in order to permanently eradicate the disease, therapies must be directed to the detection and elimination of neoplastic stem cells. These stem cells are the disease origin, and therefore, it is necessary to identify molecules and signaling pathways that could be preferentially expressed in these cells compared to their normal counterparts. In this work, gene expression profiles of hematopoietic primitive cells (CD34 + CD38-Lin- and CD34 + CD38 + Lin-) of patients with CML were determined, before and after being exposed to IM to identify genes and pathways characteristics of these cells, and changes caused by IM.

Our results indicate that CML stem and progenitor cell (HPC) profiles were closer to those of normal persons, while normal HSC showed the most different expression profile of all. We found that CML HSC and HPC gene expression profiles were closer to each other than normal marrow HSC and HPC. The main biological processes deregulated in CML cells include DNA repair, cell cycle, chromosomal condensation, cell adhesion and immune response.

Transcriptional changes in normal and CML HSC and HPC under culture conditions involved several processes such as cell cycle, steroid biosynthesis and chromosomal segregation, which were positively regulated, while genes involved in transcription regulation and apoptosis were negatively regulated. Interestingly, these changes were very similar, regardless of the addition of IM to the culture. Three genes, *PIEZO2*, *RXFP1* and *MAMDC2* were preferentially expressed by CML primitive cells and encode cell membrane proteins; therefore, they are potential biomarkers for CML stem cells.

INTRODUCCIÓN

HEMATOPOYESIS

La hematopoyesis es el proceso por el cual se generan las células sanguíneas que existen en circulación y pueden ser reconocidas morfológicamente. Cada célula es altamente especializada en términos estructurales, funcionales y de expresión génica y proteica. Los glóbulos blancos (leucocitos), están involucrados en la protección contra agentes invasores y se dividen en dos clases: las células mieloides (monocitos, macrófagos neutrófilos, basófilos y eosinófilos) y las células linfoides (linfocitos T, linfocitos B y células NK). Los otros dos tipos principales de células sanguíneas son los glóbulos rojos (eritrocitos o hematíes), encargados de transportar el oxígeno desde los pulmones a los tejidos y las plaquetas, elementos vitales en la respuesta a reparación de roturas en los vasos sanguíneos (Kohn et al, 2005)

Debido a que las células sanguíneas tienen un tiempo de vida relativamente corto (por ejemplo: 120 días para eritrocitos o un día para granulocitos), un gran número de estas células son destruidas y renovadas diariamente (miles de millones de glóbulos blancos y cientos de miles de millones de globulos rojos). Esta pérdida es compensada, gracias a la actividad del sistema hematopoyético y a la presencia de una población de células primitivas inmaduras conocidas como Células Troncales Hematopoyéticas (CTH), encargadas del proceso de hematopoyesis, activo desde el inicio de la vida fetal y que genera cerca de 2×10^{11} eritrocitos y 10^{10} células blancas por día (Orkin, 1996).

Durante el desarrollo de los mamíferos, la hematopoyesis ocurre en etapas secuenciales que permiten la formación de la sangre primitiva y luego la definitiva. Estas etapas son temporal y anatómicamente distintas, invocando reguladores celulares y moleculares únicos. La formación de células sanguíneas primitivas ocurre temprano durante la vida fetal, con progresión coordinada de sitios extraembrionarios a intraembrionarios de la hematopoyesis. Dentro del embrión, la

hematopoyesis definitiva experimenta transiciones en el desarrollo; las CTH que surgen de la región aorta-gónada-mesonefros (AGM) migran primero a la placenta y al hígado fetal, y luego al bazo. Con el tiempo, la hematopoyesis se desplaza hacia la médula ósea, donde la formación homeostática de sangre se mantiene postnatalmente (Wang y Wagers, 2011).

La hematopoyesis primitiva se detecta por primera vez extra-embriónicamente en el saco vitelino, tempranamente en el día embrionario 7.5 (E7.5) en ratones y 30 días después de la concepción (dpc) en humanos. Aunque existe evidencia de que las células aisladas del saco vitelino pueden reconstituir la hematopoyesis completamente, recientemente se ha puesto de manifiesto que las CTH multipotentes también emergen directamente de la región AGM (a E10.5 en ratones y 4 semanas después de la concepción (spc) en humanos, para iniciar la hematopoyesis definitiva. En mamíferos, la hematopoyesis se desplaza desde la región AGM a la placenta y al hígado fetal aproximadamente en E11 – E12 en ratones y por 5 spc en humanos. La hematopoyesis en ratones se desplaza hacia el bazo hacia E14 y comienza a desplazarse hacia la médula ósea hacia E18; en humanos, se mueve desde el hígado fetal a la médula ósea a 12 spc. En el nacimiento en los humanos, la médula ósea mantiene en gran parte la hematopoyesis, y la hematopoyesis multilineal extramedular no es posible, salvo en casos de patología como en leucemias. Por el contrario, en ratones la hematopoyesis en el bazo persiste durante varias semanas después del nacimiento (Figura 1) (Wang y Wagers, 2011).

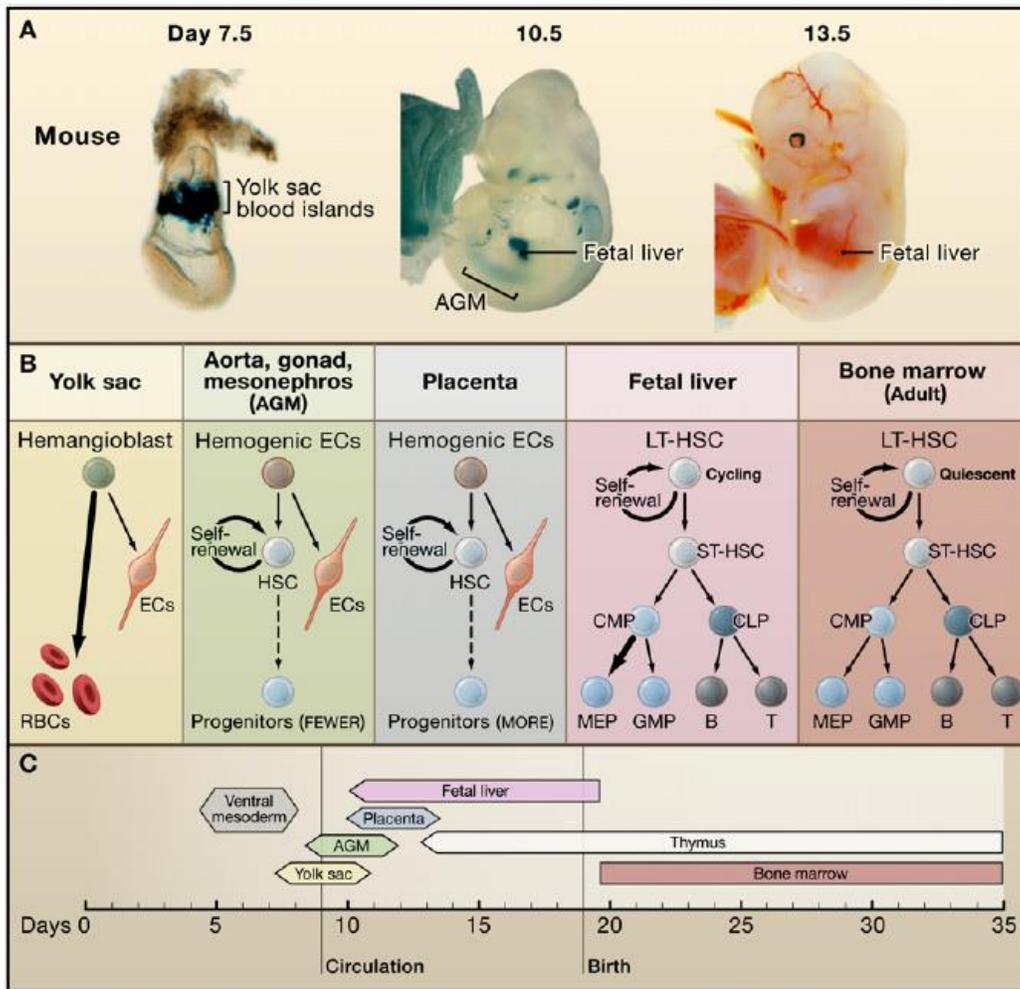


Figura 1.- Hematopoyesis en el ratón. (A) La hematopoyesis ocurre primero en islas sanguíneas en el saco vitelino (Yolk sac) y más tarde en la región aorta-gonada mesonefros (AGM), placenta e hígado fetal (Fetal liver). Las islas sanguíneas (blood islands) del SV se visualizan mediante tinción de LacZ de la expresión del embrión transgénico GATA-1-LacZ. AGM y Fetal liver se tiñen con LacZ en Ratones Runx1-LacZ knockin. (B) La hematopoyesis en cada localización favorece la producción de linajes sanguíneos específicos. Abreviaturas: ECs, células endoteliales; RBC glóbulos rojos; LT-HSC, células troncales hematopoyéticas de repoblación a largo plazo; ST-HSC, células troncales hematopoyéticas de repoblación a corto plazo; CMP, progenitor mielóide común; CLP, progenitor linfóide común; MEP, progenitor de megacariocitos/eritrocitos; GMP, progenitor de granulocitos / macrófagos. (C) Las ventanas de tiempo de desarrollo para los sitios cambiantes de hematopoyesis. Tomado de Orkin y Zon, 2008.

Las CTH adultas residen dentro de nichos en la médula ósea y estos se definen como el microambiente específico que alberga anatómicamente a las CTH y gobierna su destino, ya que el nicho juega un papel fundamental en la regulación de la sobrevivencia y capacidad de auto renovación de las CTH, protegiéndolas

del agotamiento y evitando su excesiva proliferación. Se han propuesto diferentes tipos de células como supuestos constituyentes del nicho, pero su función integrada todavía no se conoce. Los mecanismos por los cuales se regula el comportamiento de las CTH en el nicho incluyen contactos célula-célula, interacción y la producción de factores de crecimiento, citocinas y proteínas de la matriz extracelular. El nicho es una entidad dinámica que refleja y responde a las necesidades del organismo (Lymperi et al, 2010) (Figura 2).

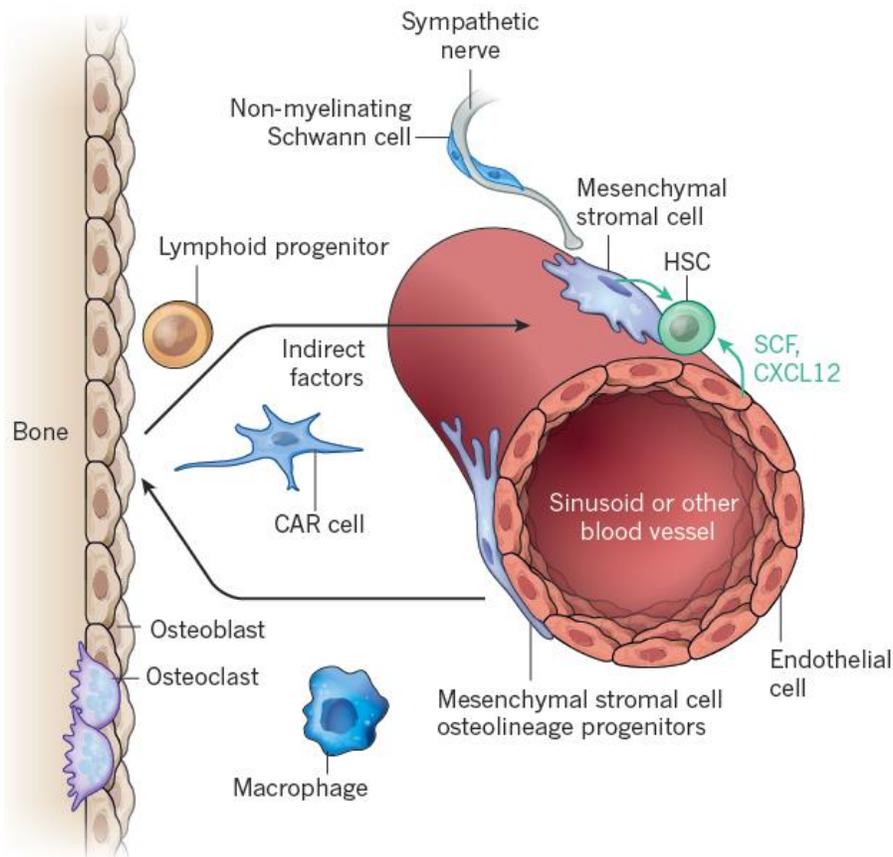


Figura 2.- El nicho de las células troncales hematopoyéticas. Las CTH se encuentran adyacentes a los sinusoides en la médula ósea, donde las células endoteliales y las células estromales mesenquimales promueven su mantenimiento. Otros tipos de células que regulan el nicho de las CTH incluyen nervios simpáticos, células de Schwann no mielinizantes, macrófagos y osteoclastos. La matriz extracelular y el calcio también regulan las CTH. Los osteoblastos no promueven directamente el mantenimiento de las CTH pero sí promueven el mantenimiento y quizás la diferenciación de ciertos progenitores linfocitos secretando CXCL12 y probablemente otros factores. CAR: Células reticulares abundantes en CXCL-12, SCF: Factor derivado de células estromales. Tomado de Morrison y Scadden 2014.

El sistema hematopoyético puede ser dividido en cuatro compartimentos, con base al grado de madurez de las células que lo conforman y a los distintos linajes celulares que de él se generan. El primer compartimiento, corresponde a las células más primitivas, llamadas CTH. Estas células tienen dos características funcionales que las distinguen: son capaces de auto-renovarse (al dividirse, por lo menos una de las células hijas conserva las propiedades de la célula original) y son multipotenciales (pueden dar origen a los distintos linajes sanguíneos). Las CTH corresponden al 0.01% del total de células nucleadas presentes en la médula ósea, por lo que su estudio puede verse limitado desde el punto de vista práctico. Sin embargo, gracias a los estudios realizados hasta ahora, sabemos que estas células tienen morfología linfoblastoide, expresan antígenos como CD34, CD90, CD117 y CD133 y carecen de la expresión de antígenos de linajes específicos, como CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD33, CD38, CD45, CD57, CD71, Glicoforina A (Mayani et al, 2010; Figura 3).

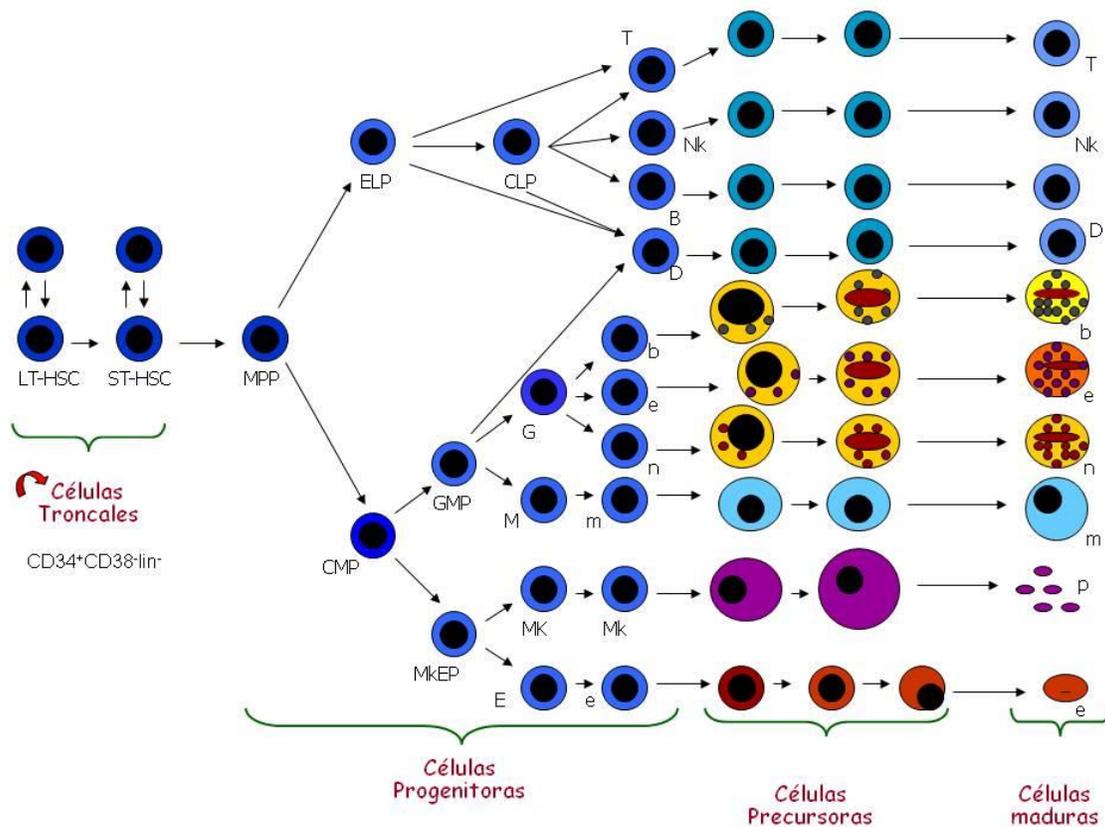


Figura 3.- Jerarquía en el sistema hematopoyético. El sistema hematopoyético se divide en 4 compartimentos, el primero corresponde al de las células troncales cuya característica es la

multipotencialidad y auto-renovación. El segundo compartimento está formado por las células progenitoras, las cuales han perdido la capacidad de autorenovación pero conservan su capacidad de dar lugar a distintos linajes. El tercer compartimento lo forman las células precursoras todavía inmaduras pero ya con características propias de su linaje y el cuarto compartimento lo componen las células maduras que observamos en circulación. LT-HSC: células troncales hematopoyéticas de repoblación a largo plazo, ST-HSC: células troncales hematopoyéticas de repoblación a corto plazo, MPP: progenitor multipotente, CMP: progenitor mieloide común, GMP: progenitor de granulocitos y macrófagos, MkEP: progenitor de megacariocitos y eritrocitos, ELP: progenitor linfocitoide temprano, CLP: progenitor linfocitoide común, T: linfocitos T, B: linfocitos B, Nk: natural killer, D: células dendríticas, G: progenitor de granulocitos, M: progenitor de macrófagos, Mk: progenitor de megacariocitos, E: progenitor eritroide, e: eritrocitos, p: plaquetas, n: neutrófilos, b: basófilos, e: eosinófilos. Tomado de Mayani 2010.

Las CTH dan origen a células progenitoras hematopoyéticas (CPH), las cuales han perdido su capacidad de auto-renovación, pero conservan su potencial proliferativo. Estas pueden ser multipotenciales, o bien, pueden estar restringidas a dos (bipotenciales) o a un solo linaje (monopotenciales). Las CPH constituyen el segundo compartimento del sistema hematopoyético, el cual corresponde a <0.5% del total de células de la médula ósea; comparten ciertas características inmunofenotípicas con las CTH, como la expresión del antígeno CD34, sin embargo, presentan patrones de expresión de marcadores celulares muy particulares, de acuerdo al linaje al que pertenecen. Las CPH dan lugar a células precursoras reconocibles por su morfología (tercer compartimento), las cuales, a pesar de ser inmaduras, pueden ser identificadas en frotis de médula ósea a través de microscopía de luz. Las células precursoras constituyen la gran mayoría de las células de la médula ósea (>90% de las células hematopoyéticas residentes en la cavidad medular). Finalmente, los precursores hematopoyéticos al madurar, generan a las células sanguíneas circulantes (cuarto compartimento) (Mayani et al, 2010; Figura 3).

La CTH fue la primera célula troncal en ser identificada, y sigue siendo la mejor estudiada. El aislamiento y la caracterización de la CTH han sido facilitados por el desarrollo de los trasplantes de CTH y la reconstitución del sistema hematopoyético en ratones irradiados, las cuales ofrecen el estándar de oro para la auto-renovación a largo plazo y el potencial multilinaje *in vivo*. En estos ensayos

de trasplantes, los aspirados o cultivos de médula ósea se inyectan vía intravenosa en animales para evaluar su capacidad para reconstituir el sistema hematopoyético. (Warren y Rossi, 2009)

Los hallazgos de la biología de células troncales han proporcionado nuevos conocimientos en la biología del cáncer, enfatizando la relación entre las células troncales y las células tumorales postulando que los tumores pueden contener algunas células troncales cancerígenas, que son células raras con un potencial de proliferación indefinido y capaces de mantener el crecimiento de los tumores. Las leucemias son cánceres de la sangre, y el sistema hematopoyético es uno de los mejores tejidos para estudiar a las células troncales leucémicas, debido a que su contraparte normal representa una población celular bien caracterizada (Passegue et al., 2003).

LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA

La leucemia mieloide crónica (LMC) corresponde al 15%-20% de las leucemias en adultos y tiene una incidencia de 1 a 2 casos por 100 000 habitantes en los Estados Unidos. Tiene una razón de 1.3 a 1 en hombres con respecto a mujeres y su incidencia aumenta conforme a la edad. La edad media en la que se presenta esta enfermedad es a los 67 años (Hehlmann et al., 2007). En México no se cuenta con datos epidemiológicos de esta enfermedad; sin embargo, según datos proporcionados por hematólogos del país, se ha calculado que existen alrededor de 80,000 casos de leucemia, de los cuales 10% corresponde a LMC. La incidencia anual aproximada es de 1.5 casos por cada 100,000 habitantes, con una mediana de edad cercana a los 45 años, al momento del diagnóstico (Chávez-González et al., 2009)

La LMC es una neoplasia mieloproliferativa crónica con origen en una célula troncal multipotencial (CD34+CD38-Lin-). Esta enfermedad está caracterizada por la presencia de una alteración citogenética evidente en todas las células, el cromosoma Filadelfia (Ph+) (Vardiman, 2009) que resulta de una translocación

recíproca entre los brazos largos del cromosoma 9 y 22 t (9; 22) (q34; q11). Esta translocación transporta un segmento del gen *ABL* del cromosoma 9q34 en la región del clúster de rompimiento del gen *BCR* en el cromosoma 22q11 (Figura 4). Este evento crea un gen híbrido *BCR/ABL* que se transcribe a un ARN mensajero quimérico *BCR/ABL* que subsecuentemente se traduce en una proteína quimérica llamada BCR/ABL, con actividad constitutiva de tirosina cinasa (Faderl, et al 1999).

El tipo de leucemia Ph+ que resulta de la translocación depende de la isoforma creada por el tipo de rompimiento y fusión. La isoforma p210 predomina y es asociada a un 95% de los casos de LMC y a un tercio de los casos de leucemia linfoblástica aguda de células B (LLA-B). Una segunda isoforma es p190 y corresponde a los dos tercios restantes en LLA-B y solo un pequeño número de casos de LMC. La isoforma p230, la cual tiene una baja actividad de tirosina cinasa comparada con p190 y p210, se ha asociado con una rara clase de leucemias neutrofilicas crónicas aunque la razón puede tener más que ver con la disposición genética individual o los sesgos de selección (Sullivan et al., 2010) (Figura 4).

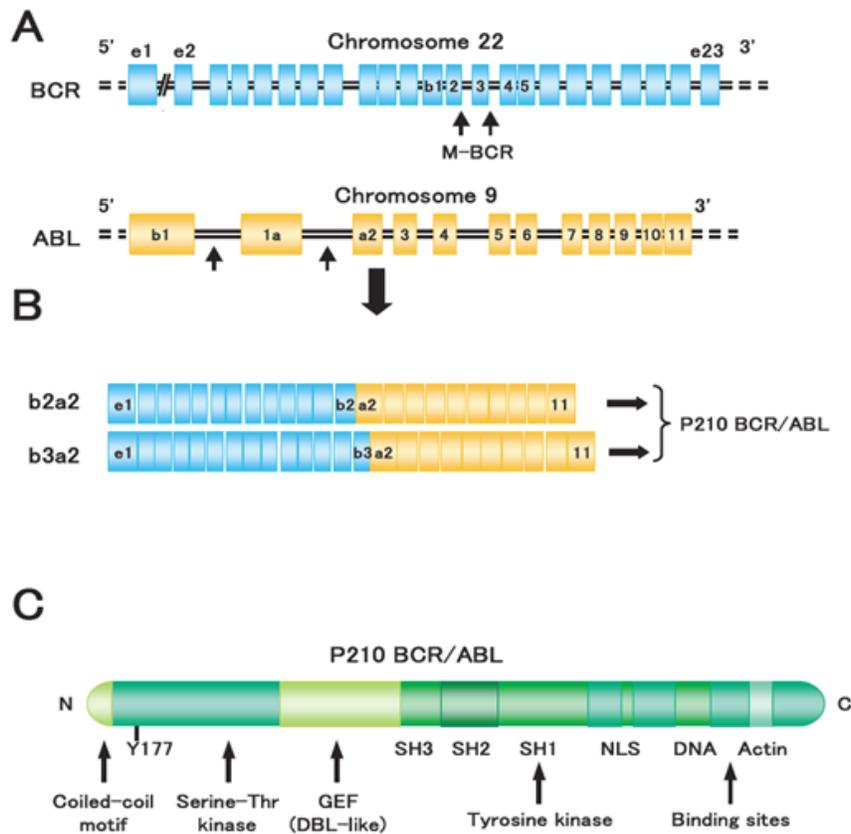


Figura 4.- Variantes de BCR/ABL y asociación con tipos de leucemia. (A) Ubicaciones de la puntos de corte en los genes ABL y BCR y (B) estructura de los transcritos de ARNm de BCR/ABL quimérico derivados de las diversas rupturas. La proteína BCR/ABL p185 se asocia principalmente con leucemia linfoblástica aguda (LLA), BCR/ABL p210 con leucemia mieloide crónica (LMC) y BCR/ABL p230 con leucemia neutrofilica crónica (LNC). Las variantes incluyen diferentes longitudes de la secuencia BCR, incluyendo p230 la mayor cantidad de secuencia BCR. (C) Dominios funcionales de p210 BCR/ABL. Algunos de los dominios importantes de BCR/ABL p210 son mostrados, como el dominio de oligomerización (motivo de bobina enrollada), la tirosina 177 (sitio de unión Grb-2), el dominio de unión a SH2 rico en fosfoserina/treonina, y el dominio rho-GEF (similar a DBL) en la parte BCR, y las regiones regulatorias homologas a SRC SH1, SH2 y SH3 (dominio de tirosina cinasa), la señal de localización nuclear (NLS) y los dominios de unión a ADN y actina en la parte ABL. La región ABL de todas las variantes de BCR/ABL contiene dominios de homología a Src (SH3 y SH2). Las tres variantes tienen un dominio de dimerización (DD) y dominio serina / treonina cinasa (P-S / T). P210 y P230 tienen dominios DBL y PH. Además, P230 tiene un dominio de unión calcio/fosfolípido (CaIb) y un dominio GapRac. Tomado de Inokuchi, 2001.

La historia natural de la LMC es bifásica o trifásica e incluye: una primera fase indolente crónica (FC) que se caracteriza por una expansión masiva del linaje granulocítico en todas las etapas de maduración, seguida por una fase acelerada (FA) ocasionalmente imperceptible y finalmente una fase de explosión o crisis blástica (FB), la cual se caracteriza por un bloqueo en la diferenciación del linaje granulocítico, resultando en la acumulación de 30% o más de blastos mieloides en médula osea, sangre periférica y tejidos extramedulares (Sawyers y Shah, 2005).

Al igual que en la hematopoyesis normal, en la LMC el sistema hematopoyético está organizado de una manera jerárquica, en la cual las células maduras circulantes provienen de precursores inmaduros morfológicamente reconocibles. Estas células a su vez, se originan de progenitores, los cuales se originan de una pequeña población de células troncales capaces de auto-renovarse y diferenciarse en varios linajes (Mayani, 2007) (Figura 5).

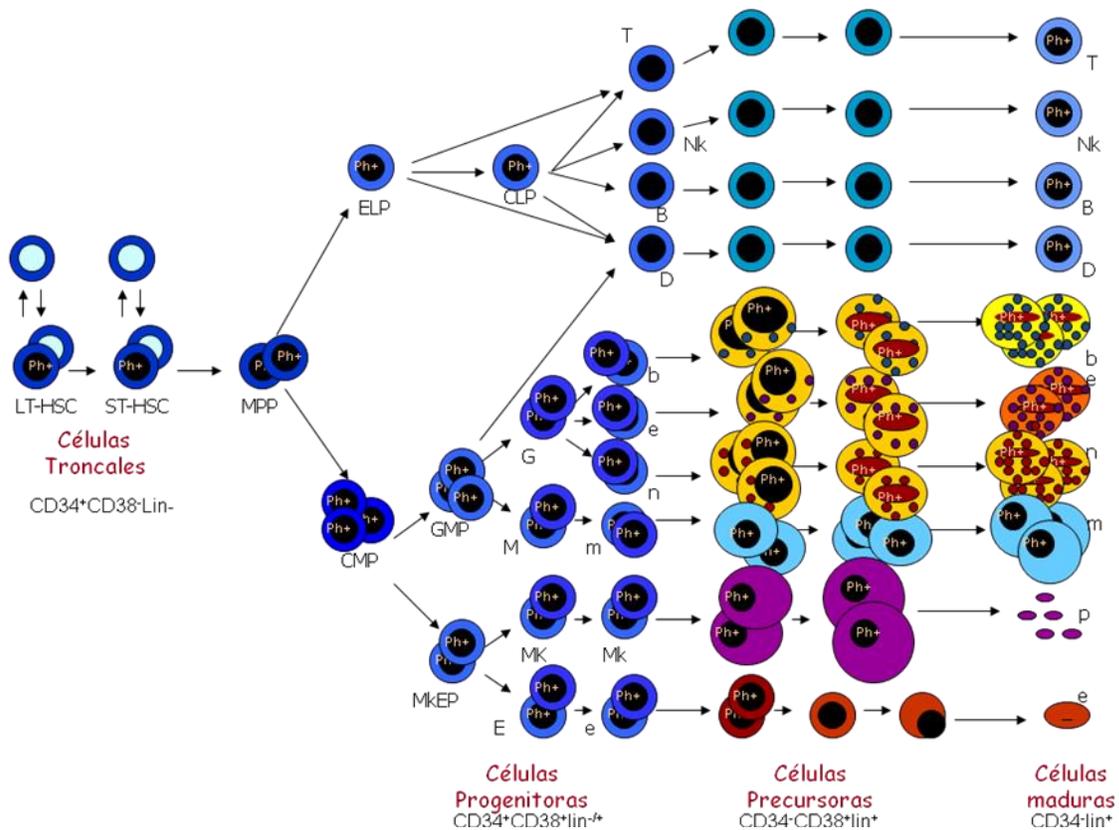


Figura 5.- Hematopoyesis leucémica. Similar a la hematopoyesis normal, en la leucemia existe una jerarquía en la cual las células troncales leucémicas se encuentran en el ápice, se caracterizan por autorenovarse y ser multipotentes; estas células dan lugar a los progenitores los cuales pierden

autorenovación y conservan multipotencialidad. Después se encuentra el compartimento de célula precursoras y al final el de células maduras. El cromosoma Filadelfia Ph+, se encuentra presente en las células troncales y en la mayor parte del linaje mieloide. LT-HSC: células troncales hematopoyéticas de repoblación a largo plazo, ST-HSC: células troncales hematopoyéticas de repoblación a corto plazo, MPP: progenitor multipotente, CMP: progenitor mieloide común, GMP: progenitor de granulocitos y macrófagos, MkEP: progenitor de megacariocitos y eritrocitos, ELP: progenitor linfoide temprano, CLP: progenitor linfoide común, T: linfocitos T, B: linfocitos B, Nk: natural killer, D: células dendríticas, G: progenitor de granulocitos, M: progenitor de macrófagos, Mk: progenitor de megacariocitos, E: progenitor eritroide, e: eritrocitos, p: plaquetas, n: neutrófilos, b: basófilos, e: eosinófilos. Modificado de Mayani 2010.

CÉLULAS TRONCALES LEUCEMICAS

El primer trabajo en identificar la función de las células troncales como el origen del cáncer se realizó en leucemias, y se llevo a cabo en leucemia mieloide aguda (LMA). En dicho trabajo, se demostró que células troncales con fenotipo CD34+CD38-, similar a las CTH normales que repoblaban ratones con inmunodeficiencia severa combinada (SCID por sus siglas en inglés), eran capaces de transferir la LMA en la misma cepa de ratón, generando células de varios linajes. Estos datos sugirieron que las células primitivas normales eran blanco de transformación leucémica antes que las células progenitoras, por lo que se sugirió que la LMA seguía un modelo jerárquico (Bonnet y Dick, 1997).

En el caso de la LMC, también se ha descrito que corresponde a un padecimiento que se origina de una célula troncal en la cual se ha visto la expresión de BCR/ABL, dicha célula troncal leucémica tiene algunas propiedades similares de la CTH normal, como la capacidad de auto-renovación. Aislado diferentes subpoblaciones de células CD34+ de pacientes con LMC, se encontró que las células en las subpoblaciones CD34+38- correspondiente al compartimento troncal y CD34+38+ correspondiente al compartimento de progenitores, presentaron mRNA codificante para BCR/ABL (Maguer-Satta et al., 1996).

Además, se ha identificado que dentro de estas células troncales leucémicas, existe una subpoblación de células troncales altamente quiescentes presente en

todos los pacientes en FC de LMC. Esta célula tiene un fenotipo primitivo (CD34+ CD38- HLADR- CD45RA- CD71-) y puede inducir reconstitución hematológica Ph+BcrAbl+ después de trasplantarse en ratones inmunocomprometidos, lo que sugiere que *in vivo* el estado de reposo es sólo temporal y reversible en circunstancias específicas. La presencia de células troncales quiescentes con alta capacidad de auto-renovación, puede explicar el fracaso de la quimioterapia dependiente del ciclo celular para erradicar la LMC, con recaída posterior en todos los pacientes. Aunado a lo anterior y a diferencia de sus contrapartes normales, las CTH de LMC se caracterizan por la producción autocrina de IL-3 y G-CSF, por lo tanto, son capaces de sobrevivir y proliferar en ausencia de factores de crecimiento exógenos. Interesantemente, la producción autocrina de IL-3 se enciende de forma simultánea en cuanto las células en reposo transitan a las fases activas del ciclo celular (Pellicano y Holyoake, 2007).

OPCIONES TERAPÉUTICAS EN LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA

Uno de los primeros tratamientos (introducido en 1953) para el tratamiento de LMC fue el busulfán, el cual es un agente alquilante y tiene eficacia en el control de elevación de glóbulos blancos en un período de varios años. Sin embargo, la terapia con busulfan, presentó alta toxicidad en los pacientes, así como riesgo de infertilidad, aplasia de la médula ósea, fibrosis hepática y cardíaca. El efecto secundario más conocido es la fibrosis pulmonar, y comúnmente se denominada "pulmón busulfano." Esta toxicidad parece estar relacionada con la duración de la exposición a la droga e inevitablemente los pacientes progresan a FA y FB, con una sobrevivencia media de 45 meses (Silver et al., 1999).

Posteriormente, se desarrolló la hidroxiurea, un agente que altera la replicación celular en la fase S, como una alternativa más segura para la LMC. Este agente proporciona control a corto plazo de los conteos de glóbulos blancos y el tamaño del bazo. Las toxicidades asociadas con esta terapia incluyen náuseas, vómitos, estomatitis y erupciones cutáneas. Los pacientes progresan a FA y FB con una sobrevivencia media de 58 meses. Sin embargo, el busulfán y la hidroxiurea no

son específicos para células cancerosas, no eliminan a las células de la médula ósea positivas al cromosoma Filadelfia (Ph+) y por lo tanto no inducen remisiones citogenéticas en los pacientes (Hehlmann et al., 1993).

El primer fármaco que fue capaz de aumentar el período de tiempo durante el cual el paciente puede permanecer en FC, fue en interferón alfa (IFN α). Esta molécula es un estimulante inespecífico del sistema inmune que aumenta la actividad de células T y mostró capacidad de producir una respuesta hematológica completa (RHC) en 40% al 80% de los pacientes y una remisión citogenética completa (RCC) en más del 26% de los pacientes, respuesta que se tradujo en una supervivencia media de más de 89 meses. Sin embargo, como IFN α es un inmunoestimulante inespecífico, también produce síntomas parecidos a la gripe, causa fatiga excesiva y en algunos pacientes, causa depresión (Henkes et al., 2008).

El reconocimiento de que la actividad aberrante de la proteína BCR/ABL juega un papel fundamental en la patogenia de la LMC, ha permitido el desarrollo de terapias cuyo objetivo específico es esta proteína. En 1996, Buchdunger y colaboradores, realizaron la síntesis de una serie de compuestos que tuvieran la capacidad de inhibir la cinasa ABL (Buchdunger et al., 1996). Uno de ellos, identificado como 2-fenilaminopirimidina sirvió como punto de partida para otros compuestos relacionados, ya que después de algunas modificaciones realizadas al compuesto original, se generó STI571 (del inglés Signal Transduction Inhibitor 571), ahora conocido como Imatinib (Gleevec®, Novartis Pharmaceuticals IM), que en estudios *in vitro* e *in vivo* demostró tener una actividad inhibidora potente y específica contra la cinasa BCR/ABL (Drucker y Lyod, 2001).

IM actúa como un inhibidor competitivo del sitio de unión a ATP, se une específicamente a BCR/ABL a través de puentes de hidrógeno que se establece con seis residuos de aminoácidos localizados en el sitio activo de ABL, de esta manera evita su activación y la fosforilación de los sustratos activados río abajo. Al inhibir la actividad de cinasa de BCR/ABL, IM bloquea efectivamente la señal de

proliferación dentro de las células leucémicas e induce la muerte celular por apoptosis (Drucker et al., 2001; Figura 6).

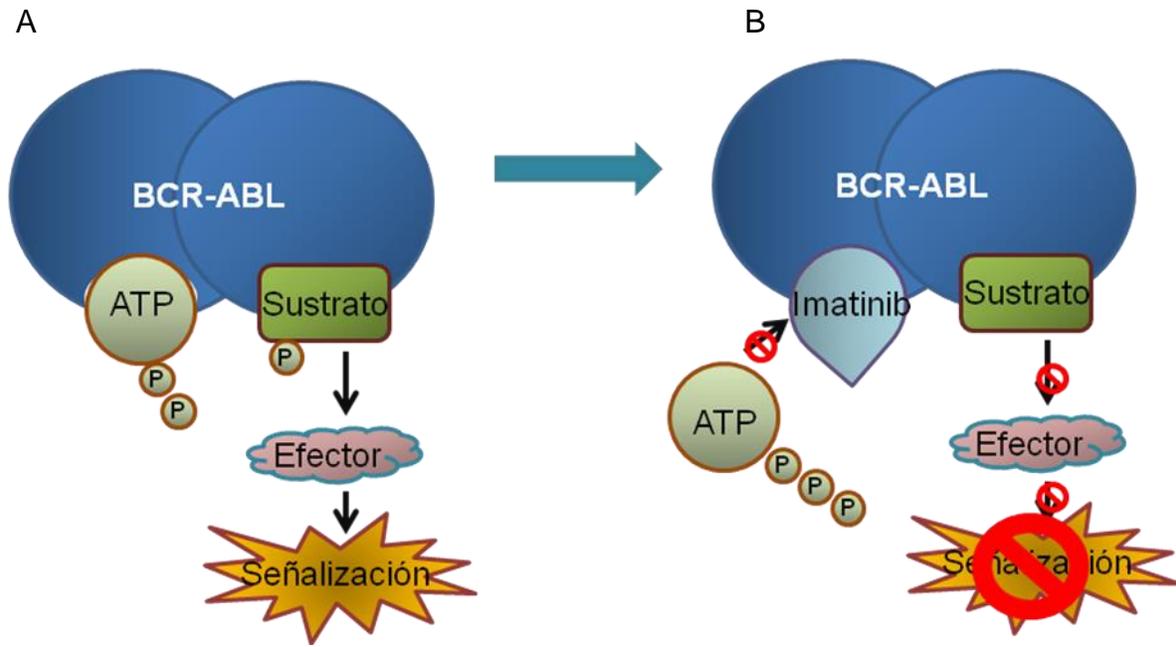


Figura 6.- Mecanismo de acción de imatinib (IM). En ausencia de tratamiento (A): la proteína BCR/ABL une una molécula de ATP, provocando la fosforilación de diferentes sustratos y la consecuente activación de distintas vías de señalización a través de moléculas efectoras. Cuando IM es administrado (B): ocupa el sitio de unión del ATP, impidiendo que este pueda unirse. De esta manera se inhiben las señales inducidas por la proteína. Tomado de Avilés-Vázquez, 2013.

En 1998, estudios clínicos fase I fueron iniciados en tres centros de EUA. Dichos estudios tomaron como población de estudio a pacientes con LMC en fase crónica que habían sido resistentes al tratamiento convencional. Se utilizaron como criterios de respuesta los establecidos por la organización European Leukemia Net (ELN), que incluyen los siguientes eventos: remisión hematológica completa (RHC), que se refiere a una cuenta leucocitaria normal y desaparición de cualquier síntoma de la enfermedad; respuesta citogenética completa (RCC), que implica la

ausencia total de metafases Ph+; y respuesta molecular completa (RMC), en donde no hay niveles detectables del transcrito de *BCR/ABL*. La dosis inicial de tratamiento fue 25 mg de IM al día sin encontrar respuesta hematológica, por lo que se continuó con el escalamiento de dosis hasta 300 mg al día, en donde se encontró que el 98% (53/54) de los pacientes presentaron RHC, 13% obtuvieron RCC y 14% RMC (Drucker et. al., 2001).

En 1999, tres centros internacionales iniciaron estudios clínicos fase II, en donde además de incluir pacientes en fase crónica resistentes al tratamiento convencional, también se incluyeron pacientes en crisis blástica. El rango de respuesta hematológica en todos los pacientes tratados con 400 mg por día, genero RHC hasta en el 95% de los casos y el 41% de ellos presentó RCC. Los estudios clínicos de fase III que se realizaron a partir de junio del año 2000, demostraron que el tratamiento con IM es más efectivo comparado con el tratamiento convencional, además de generar RHC y RCC, retrasando hasta 18 meses la progresión de la enfermedad de fase crónica a crisis blástica, evento que colocó a IM como primera línea de tratamiento para pacientes con LMC alrededor del mundo (O'Brien et al., 2003).

En el año 2002, se registraron los primeros casos de resistencia al fármaco, reportando el caso de pacientes que no presentaban respuesta hematológica completa, ni remisión citogenética mayor, después de 3 y 6 meses de tratamiento respectivamente, lo que planteó la necesidad de desarrollar nuevos fármacos capaces de actuar con mayor potencia e incluso tener efecto sobre algunas mutaciones de *BCR/ABL* que generaban resistencia a IM, como se menciona más adelante en este apartado. Estos fármacos nuevos se denominaron segunda generación de inhibidores de tirosina cinasa (ITC) y comprenden a Dasatinib y Nilotinib (Sha, 2005).

Dasatinib (DAS) o BMS-35482 (Sprycel, Bristol-MyersSquibb) es 325 veces más potente que IM y tiene actividad sobre 15 mutaciones que se han asociado con resistencia. Este fármaco es considerado como un inhibidor dual, porque tiene la capacidad de inhibir la cinasa *BCR/ABL* y miembros de la familia de cinasas SRC

(Ramirez y Di Persio, 2008). En el 2005, DAS fue evaluado en estudios clínicos fase I en donde se incluyeron 84 pacientes resistentes a IM, 40 en fase crónica y 44 en fase acelerada-crisis blástica; 88% de los pacientes en fase crónica lograron RHC y el 33% de ellos alcanzaron RCC. En el caso de los pacientes en fase acelerada-crisis blástica, el 50% lograron RHC. El estudio clínico fase II o estudio START (del inglés SRC/ABL Tyrosine Kinase Inhibition Activity Research Trials of Dasatinib), desarrollado en 2006, fue dirigido a 288 pacientes resistentes y 99 pacientes intolerantes a IM y después de 15 meses de seguimiento el estudio demostró que el 80% de los pacientes con intolerancia alcanzaron RCC (Copland et al., 2008).

En 2010, el estudio clínico fase III o DASISION (del inglés Dasatinib vs Imatinib study in treatment-naive CML patients) que evaluó la eficacia y seguridad de DAS en dosis de 100 mg (259 pacientes) o de 400 mg (260 pacientes) como tratamiento de primera línea, mostró mayor eficacia que IM a los 12 meses, con el 83% de pacientes en RCC, en relación al 72% en IM. La RCM a los 12 meses se presentó en el 46% de los pacientes tratados con DAS, mientras que sólo se alcanzó en un 28% de los pacientes del grupo de IM. DAS fue aprobado en 2006 por la FDA en dosis de 100 mg diarios para pacientes con LMC en fase crónica y 70 mg dos veces al día para pacientes en fase acelerada o crisis blástica (Kantarjian et al., 2010).

El otro ITC de segunda generación es Nilotinib (NIL) o AMN107 (Tasigna; Novartis, Basel, Switzerland), que en estudios *in vitro* demostró ser 20 veces más potente que IM y de manera semejante a DAS, tiene la capacidad de inhibir un amplio rango de mutaciones presentes en BCR/ABL. Este agente demostró mediante el estudio ENESTnd (del inglés Evaluating Nilotinib Efficacy and Safety in Clinical Trials Newly Diagnosed patients), realizado en 2010, que en dosis de 300 y 400 mg tiene una mayor respuesta comparado con 400 mg de IM en pacientes de reciente diagnóstico, alcanzando RMC del 30% y 43% después de 6 y 12 meses de tratamiento respectivamente, comparada con la obtenida con IM del 12% y 22% en el mismo periodo de tiempo, lo que condujo a proponer éste

agente como primera línea de tratamiento en pacientes con LMC (Golemovic et al., 2005; Weisberg et al., 2006).

No obstante y a pesar del éxito de los ITC entre el 20 - 30% de los pacientes con LMC no responden al tratamiento inicial y se agrupan como resistentes al tratamiento ya que de acuerdo con las especificaciones de la European Leukemia Net no son capaces de lograr RHC a los 3 meses ni RCC y RMC después de 6 a 18 meses de tratamiento. Algunos pacientes desarrollan resistencia a ITCs, en particular en las fases avanzadas de LMC, la cual es generalmente causada por mutaciones puntuales en el dominio cinasa de BCR/ABL que reducen sensibilidad hacia ITCs, aunque también hay mecanismos de BCR/ABL-independientes de resistencia a ITCs que pueden ocurrir (Weisberg et al., 2007).

El trasplante alogénico de CTH es actualmente el único tratamiento potencialmente curativo, pero se asocia con alta las tasas de morbilidad y mortalidad, y no es apta para todos los pacientes. La introducción de IM ha tenido un marcado impacto en los resultados en pacientes con LMC. Es un tratamiento valioso para todas las etapas de la enfermedad, sobre todo como tratamiento inicial de LMC Ph + en fase crónica de diagnóstico reciente, y está respaldada por las directrices europeas y de los EE.UU. como una opción de tratamiento de primera línea.

MECANISMOS DE RESISTENCIA FARMACOLÓGICA EN CÉLULAS TRONCALES DE LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA.

Mecanismos dependientes de BCR/ABL.

Duplicación y Amplificación de BCR/ABL.

La resistencia a IM, asociada a la amplificación del gen *BCR/ABL*, fue descrito por primera vez en líneas celulares de LMC que no presentaban mutaciones en este

gen. Aunado a lo anterior, aproximadamente el 3% de los pacientes con LMC que son menos sensibles al tratamiento con IM, mantienen una fracción de células CD34+ con altos niveles de BCR/ABL, debido a la amplificación del gen o a la duplicación del cromosoma Ph. Dicho incremento en la oncoproteína, ha sido asociado con una alta producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y la consecuente generación de mutaciones en el genoma, incluyendo mutaciones en el gen *BCR/ABL*, lo que también favorece la aparición de sub-clonas resistentes a imatinib (Diamond y Melo, 2011; Barnes et al., 2005; Figura 7).

Mutaciones en BCR/ABL

Una de las causas más comunes de resistencia al tratamiento con ITC en los pacientes de LMC son las mutaciones puntuales dentro del dominio tirosina cinasa de BCR/ABL, donde se ha documentado el 85% de los casos. De acuerdo con el sitio en donde ocurren las mutaciones éstas se han clasificado en cuatro categorías: en el sitio de unión a IM, en el sitio de unión al ATP (P-loop), en el sitio de activación (A-loop) y en el dominio catalítico (O'Hare et al., 2007).

A la fecha, se han reportado más de 100 mutaciones diferentes que pueden afectar a más de 70 aminoácidos, dichas mutaciones no ocurren en la misma frecuencia y sólo siete de ellas (M244V, G250E, Y253F/H, E255K/V, T315I, M351T, y F359V), están presentes en el 85% de los casos de resistencia a IM. Aunado a lo anterior, ha sido reportado que las mutaciones dentro del dominio tirosina cinasa de BCR/ABL no son causadas por los inhibidores de su actividad, sino que existen clonas que presentan las mutaciones y logran sobrevivir y expandirse aún después de la presión selectiva que ejercen los fármacos durante el tratamiento. De las mutaciones descritas a la fecha, la T315I en donde se sustituye una Tirosina por una Isoleucina en la posición 315 dentro del sitio de unión al ATP, ha mostrado evitar la interacción entre BCR/ABL y cualquiera de los ITC antes mencionados: IM, DAS y NIL, y actualmente continúa el desarrollo de agentes específicos teniendo como blanco la población portadora de esta mutación (O'Hare et al., 2007; Jabbour et al., 2006; Soverini et al., 2006; Figura 7).

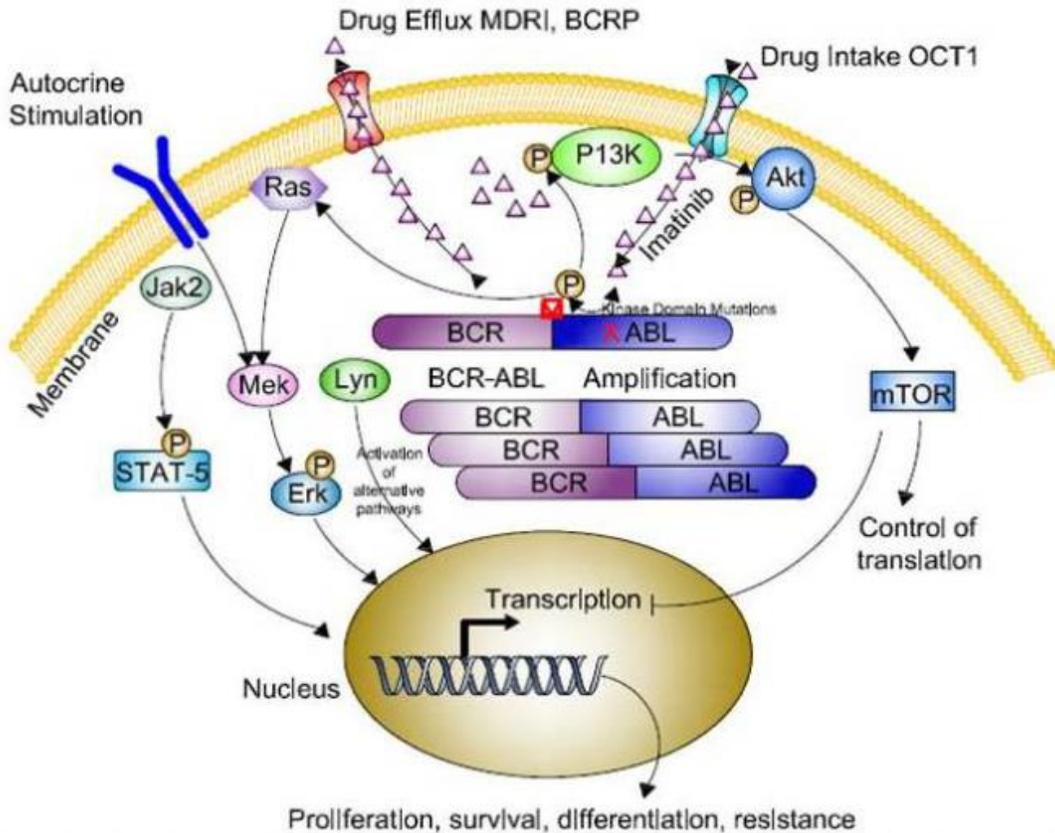


Figura 7.- Mecanismos de resistencia en la leucemia mieloide crónica. Se ejemplifican los mecanismos dependientes de BCR/ABL: duplicación y amplificación de BCR/ABL, mutaciones en BCR/ABL. Y los mecanismos independientes de BCR/ABL: deficiencias en la internalización de fármacos, incremento en la expresión de proteínas de resistencia a fármacos, quiescencia, producción autocrina de citocinas, activación de nuevas vías de señalización, protección por microambientes favorables e independencia de la actividad de BCR/ABL. Tomado de Chávez-González et. al., 2013.

Mecanismos de resistencia independientes de BCR/ABL.

Deficiencias en la internalización de fármacos.

Una de las causas de resistencia o falla del tratamiento en los sujetos BCR/ABL+, es el inadecuado transporte de los fármacos al interior de la célula, de manera que no se puede alcanzar la concentración inhibitoria requerida para ejercer su efecto. Se ha reportado que el transportador de cationes orgánicos 1 (OCT1) modula el transporte de IM al interior de la célula y la concentración intracelular de éste se relaciona directamente con la expresión y actividad de OCT1, lo que determina el resultado terapéutico (Talpaz et. al, 2006). Estudios en una cohorte de 30 pacientes, demostraron que los pacientes que no respondieron a IM expresaban bajos niveles de transcrito para OCT1, comparados con los que sí tuvieron respuesta a IM. Se ha descrito que la absorción y la retención intracelular de IM, la actividad de OCT1 y el nivel de expresión de ARNm para OCT1 son significativamente más bajos en células CD34+ de pacientes con LMC. La baja acumulación de IM en las células primitivas de LMC, mediada a través de la reducción de la actividad de OCT1 puede ser un determinante crítico de la persistencia de la enfermedad a largo plazo (Li, 2008) (Figura 7).

Incremento en la expresión de proteínas de resistencia a fármacos.

Otro mecanismo que afecta la concentración intracelular de fármacos en las células leucémicas, es la salida a través de transportadores de membrana pertenecientes a la familia ABC. IM, es sustrato de varios miembros de esta familia, de los cuales ABCB1 (también conocido como MDR1 o P-glicoproteína) y ABCG2 (también conocido como proteína resistente a cáncer de mama BCRP) son los más relevantes. Los primeros estudios sobre resistencia a IM mostraron que líneas celulares BCR/ABL+ resistentes a IM expresan niveles altos de la proteína MDR1. Posteriormente, se confirmó que IM es un sustrato de los transportadores ABC, tales como ABCB1, y que las variaciones en la actividad o expresión de

ABCB1 afecta a la farmacocinética de IM, reduciendo o aumentando su biodisponibilidad (Wang et al., 2008).

La bomba de eflujo de fármacos ABCG2, también se ha implicado en la resistencia a IM. ABCG2 es un transportador que parece funcionar como homodímero y es capaz de transportar diversos agentes quimioterapéuticos como: doxorubicina, mitoxantrona, topotecan y metotrexato, así como los diferentes ITC. Se ha reportado que IM puede ser un sustrato y/o un inhibidor para ABCG2, que se sobreexpresa en muchos tumores humanos y en el caso particular de CTL de LMC se ha descrito una alta expresión de ABCG2, disminuyendo la acumulación intracelular de IM y favoreciendo la permanencia de las células leucémicas (Hamada et. al., 2003) (Figura 7).

Quiescencia.

La quiescencia es una propiedad exclusiva y fundamental de las CTH ya que no sólo favorece la protección del compartimento y el mantenimiento de las CTH durante largos periodos, sino también protege a las células troncales minimizando la acumulación de mutaciones asociadas a la replicación. En el caso particular de las CTL de LMC también se ha reportado la presencia de una población CD34+CD38- quiescente (Pyronina low y Hoescht low), que tienen la capacidad de reconstituir la hematopoyesis en ratones inmunocomprometidos. Estas células quiescentes son Ph+ y pueden salir espontáneamente la fase de quiescencia y entrar en un estado de constante proliferación (Holyoake et al., 2001).

Diversos reportes en la literatura, han documentado que las células quiescentes de los pacientes con LMC son insensibles al tratamiento *in vitro* e *in vivo* con ITC y una posible causa de esto es que los niveles del transcrito para BCR/ABL es 300 veces mayor en las células CD34+CD38-Lin- que en la células más diferenciadas. Así mismo, se ha reportado de que los niveles elevados de BCR/ABL reducen sensibilidad a IM; además, el estado de reposo de las CTL de LMC les permite evadir los tratamientos de quimioterapia, que están diseñados para eliminar las células metabólicamente activas, así como, las terapias dirigidas, lo que

contribuye a la recaída cuando el tratamiento con inhibidores de la tirosina cinasa se interrumpen (Graham et al., 2002; Figura 7).

Producción autocrina de citocinas.

Factores autocrinos o paracrinos pueden contribuir a la resistencia a quimioterapéuticos e ITCs en LMC. Las células primitivas CD34+ provenientes de pacientes con LMC producen interleucina-3 (IL-3) y factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), ambas citocinas estimulan la proliferación celular de una manera autocrina y protegen a las células de la muerte por apoptosis inducida por IM (Holyoake et. al., 2001). Recientemente se ha descrito que células primitivas CD34+ de LMC también producen factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$) de manera autocrina y en mayores concentraciones que su contraparte normal, evento que promueve la sobrevivencia de CTL de LMC mediante la vía de $NF\kappa B/p65$ y la expresión de la cadena β del receptor común para IL-3 y GM-CSF (CSF2RB).

La inhibición de la estimulación autocrina inducida por $TNF\alpha$ genera apoptosis en las células CD34+ de LMC, la cual aumenta de manera significativa al emplearse tratamiento concomitante con NIL (Gallipoli et. al, 2013). Así mismo, se ha reportado que células progenitoras CD34+ de pacientes con LMC son blanco de la IL-33, que también favorece el incremento en la expresión de la cadena ST2 específica de su receptor, contrarrestando el arresto del crecimiento inducido por IM *in vitro* a través de la activación de la vía STAT5, de manera que la IL-33 puede impedir los efectos antiproliferativos de IM en progenitores CD34+ de LMC (Levescot et al., 2014) (Figura 7).

Activación de nuevas vías de señalización.

La activación de vías alternas a BCR/ABL, es otro mecanismo de resistencia a ITC en células de LMC y en ese sentido, se ha demostrado la activación de la vía de señalización inducida por Akt de manera independiente de BCR/ABL. La vía de

señalización PI3k/Akt/mTOR ha sido reportada como crucial para la supervivencia y proliferación de CTL en LMC; además de que se involucra en la generación de especies reactivas de oxígeno, contribuyendo así a la transformación por BCR-ABL (Burchert et. al., 2005). El residuo de tirosina en la posición 177 dentro de la proteína BCR es esencial para la unión de la proteína adaptadora GRB2 y se ha demostrado que BCR/ABL es capaz de activar las vías Ras/Raf/Mek y PI3K/ERK a través de este adaptador (Pendergast et al., 1995).

Aunado a lo anterior, la activación de la cinasa Janus (Jak) y la posterior fosforilación de varios miembros de la familia STAT se han identificado tanto en líneas celulares BCR/ABL+ y en células primarias de LMC en donde contribuyen con la capacidad transformante de BCR/ABL (De Groot et al., 1999). La sobreexpresión de cinasas como LYN y HCK (miembros de la familia de SRC), han sido detectadas en líneas celulares de LMC resistentes a IM y en modelos murinos de leucemia, también se ha demostrado que las cinasas SRC LYN, HCK, y FGR son necesarias para el desarrollo de LLA tipo B inducida por BCR/ABL (Diamond y Melo, 2011) (Figura 7).

Protección por microambientes favorables.

El nicho hematopoyético en la médula ósea sirve como un refugio seguro para las CTH, ya que tiene un papel importante en la regulación de procesos de diferenciación, migración, proliferación y supervivencia. De manera análoga, las CTL envían y reciben señales del microambiente de la médula favoreciendo su supervivencia y retención en médula ósea. En este sentido, se demostró mediante un modelo de ratón transgénico de LMC en fase crónica (Scl-tTA::TRE-BCR/ABL), que células mieloides promueven la diferenciación de células estromales hacia osteoblastos, los cuales tenían menos capacidad de soporte para las HSC al tiempo que favorecen el desarrollo de CTL de LMC. Este hecho demuestra, que las células leucémicas tienen la capacidad de remodelar el nicho de la médula ósea y generar un ambiente más permisivo para el mantenimiento leucémico (Weisberg et. al., 2008).

Aunado a lo anterior, se ha reportado que moléculas como N-cadherina y Wnt- β -catenina, son capaces de proteger a las células troncales y progenitoras leucémicas mediante la inducción de sus vías de señalización ya que utilizando co-cultivos de células estromales mesenquimales con células primitivas CD34+ de LMC expuestas a ITC, se observó inhibición de apoptosis, mantenimiento del potencial de formación de colonias y capacidad de injerto, demostrando un efecto protector de los componentes microambientales aún después del tratamiento. Acorde con esta información, también se ha descrito que la oncoproteína BCR/ABL inhibe específicamente el eje SDF1-CXCR4 el cual está involucrado en el “homing” al microambiente de la médula ósea, mediante mecanismos de quimiotaxis. Además se sabe que el tratamiento con IM, restaura la expresión de CXCR4 y promueve la migración de células de LMC hacia el estroma de la médula ósea, evento que se asocia con un arresto en el ciclo celular en fase G0-G1, la inhibición de la proliferación y el aumento de la sobrevivencia de la fracción quiescente y que al mismo tiempo se involucra con la falta de respuesta de las CTL al tratamiento con ITC (Zhang et. al., 2013). (Figura 7).

Independencia de la actividad de BCR/ABL.

Si bien es cierto la LMC es una patología directamente asociada a la presencia del cromosoma Philadelphia y su producto proteico BCR/ABL, mismo que se ha asociado con los diferentes mecanismos celulares involucrados en el mantenimiento del fenotipo leucémico. Recientemente se ha descrito que aunque la mayoría de las células leucémicas (que corresponden a las poblaciones de precursores y células maduras circulantes), son dependientes de BCR/ABL y en consecuencia son efectivamente eliminadas con el uso de ITC, las fracciones más primitivas y específicamente las CTL son independientes de dicha actividad (Grahamet. al., 2002).

ESTUDIOS DE PERFILES DE EXPRESION EN LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA.

Los microarreglos son una herramienta que permiten analizar el perfil de las macromoléculas y sus cambios fisiológicos en una escala genómica. Ésto los predispone para su uso en diagnósticos clínicos. Aunque en última instancia, el análisis con microarreglos puede aplicarse en el contexto de muchas enfermedades, la investigación inicial se ha centrado en la clasificación de los subtipos de cáncer (diagnóstico) y en la identificación de marcadores de progresión de la enfermedad maligna (pronóstico) (Stratowa, 2007).

A la fecha son pocos los estudios de perfiles de expresión génica realizados en LMC. En los primeros ensayos se utilizó a CD133 como marcador de selección de CTH, el cual se sabe actualmente que no es específico para éstas. En este estudio, que incluyó aspirados de médula ósea de 13 pacientes con LMC en fase crónica, fase acelerada y crisis blástica, se analizó la expresión de 3,456 genes de los cuales solo se limita al estudio del gen PIASy, un inhibidor de la familia STAT, el cual esta subexpresado en fase acelerada y crisis blástica (Ohmine, 2001).

Nowicki y cols. realizaron un estudio comprensivo de la expresión de 12,530 genes en 15 pacientes de LMC y 7 individuos sanos en el que observaron la expresión diferencial de 263 genes, de los cuales 148 estaban sobreexpresados y 115 subexpresados. Dichos genes están implicados en transducción de señales, transactivación génica, ciclo celular, apoptosis, adhesión, reparación de ADN, diferenciación, metabolismo y progresión maligna, además de que encontraron heterogeneidad y diferencias en la expresión génica entre muestras de médula ósea y sangre periférica. Sin embargo, en este estudio se utilizó la fracción mononuclear la cual presenta una compleja composición de tipos celulares que pueden estar afectando estos resultados (Nowicki et. al., 2003).

En el caso de los estudios de expresión génica asociados al tratamiento con IM, la gran mayoría se han realizado en células mononucleares de pacientes de LMC tratados o no tratados con IM, por lo que hay una gran heterogeneidad de

resultados en los diferentes trabajos y sólo se limitan a explicar un número pequeño de genes. Por ejemplo, en un estudio de 91 casos de LMC en diferentes fases de la enfermedad, encontraron 3 000 genes asociados, de ellos, la vía WNT- β -catenina, la disminución de la expresión de *Jun* y *Fos*, la desregulación de cinasas alternativas, tales como Arg (Abl2), y una mayor expresión de PRAME, una proteína nuclear que actúa como represor del receptor de ácido retinoico (RAR), fueron encontrados involucrados con la progresión de la enfermedad. Los pacientes con LMC que tuvieron una recaída después del tratamiento con IM demostraron un patrón de expresión de genes estrechamente relacionados con la fase avanzada de la enfermedad (Radich, et al., 2006).

En otro estudio, Frank y colaboradores, evaluaron los perfiles de expresión génica de la fracción mononuclear de pacientes tratados con IFN y que presentaron resistencia a IM, encontrando cambios en 128 genes, entre ellos algunos relacionados con apoptosis (*CASP9*, *HRAS*), genes de reparación celular (*MSH3* y *DDB2*) y protección contra estrés oxidativo (*GSS*, *PON2*, *VNN1*, *ID1*), todos ellos asociados a los pacientes que presentaron resistencia (Frank et al., 2006).

En cuanto a evaluaciones realizadas en poblaciones celulares purificadas, existen aproximaciones en donde se ha utilizado la fracción CD34+ que incluye a las células troncales pero también una mayor proporción de células progenitoras de diversos linajes. En uno de los primeros estudios se analizó la expresión de 1,185 genes comparando las células CD34+ de pacientes con LMC, con células CD34+ de individuos sanos, tanto de médula ósea como de sangre periférica. En este estudio se encontraron 158 genes diferencialmente expresados, de los cuales genes relacionados con ciclo celular y proteosoma se encontraron incrementados, mientras que genes de reparación celular y enzimas de detoxificación se mostraron disminuidos. Además, en esta evaluación se detectó subexpresión de CXCR4 y plakoglobina, lo cual correlaciona con la salida de precursores inmaduros de la médula ósea a circulación. Al encontrar una serie de receptores asociados con neurotransmisores seleccionan al receptor de adenosina A1 y trataron a las células CD34+ con un antagonista de este receptor y observaron

una inhibición en el crecimiento de la población proveniente de LMC (Kronenwett, et al., 2005).

Diaz-Blanco y cols. realizaron un estudio similar, analizando 8,746 genes. De ellos se encuentran sobreexpresadas vías como MAPK, PI3K/AKT, TGF- β , hemoglobina fetal, receptor de leptina, TIMP1, NET1, HoxA9 y disminuidas IRF8 de la vía apoptótica, y selenoproteína 1 (Diaz Blanco, et al., 2007). Las diferencias encontradas en ambos estudios sugieren una heterogeneidad dentro de la misma población CD34+, aun cuando ya se trata de una población relativamente más pura.

De forma más reciente, Jaras y colaboradores realizaron un estudio de perfil transcripcional en células CD34+ de 10 pacientes con LMC fase crónica comparados con 6 individuos sanos, en el que identifican a IL1RAP sobreexpresada en las células de los pacientes con LMC; así como en células CD34+ de sangre de cordón umbilical transfectadas retroviralmente con BCR/ABL. Al evaluar la presencia de IL1RAP en células troncales CD34+38- por medio de FISH observan que IL1RAP se expresa solo en células troncales de LMC Ph+ y no en células troncales que son Ph-. Usando ensayos de citotoxicidad mediada por anticuerpo proponen que IL1RAP puede ser un blanco terapéutico para eliminar células troncales Ph+ de LMC (Jaras, et. al., 2010). Sin embargo la identificación de IL1RAP se hizo en la población CD34+ total, por lo que hasta ahora no se ha realizado ningún perfil de expresión exclusivo de la fracción de células troncales CD34+38-Lin-.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Se ha demostrado que en la población de células troncales hematopoyéticas (CD34+CD38-Lin-) provenientes de pacientes con leucemia crónica se encuentran alteraciones numéricas y funcionales (Chávez-González, et. al., 2004); además de que son capaces de permanecer en estados quiescentes mediante la expresión de moléculas inhibidoras del ciclo celular (Moreno-Lorenzana, et al., 2016). Por lo tanto, para poder erradicar definitivamente el padecimiento, las terapias deben dirigirse a la detección y eliminación de las células troncales neoplásicas, en las cuales reside el origen del padecimiento, razón por la cual se hace necesario identificar moléculas y vías de señalización que pudieran ser preferencialmente expresadas en estas células en comparación con sus contrapartes normales.

Los informes descritos de perfiles de expresión génica de muestras de LMC, incluyen varias cohortes muy grandes, utilizan poblaciones heterogéneas de células y hasta ahora no se ha evaluado la expresión génica en células troncales hematopoyéticas CD34+CD38-Lin- de médula ósea normal y leucémica antes y después del tratamiento con IM por lo que la búsqueda y detección de nuevos marcadores, será sin duda trascendental en entender la biología de la enfermedad.

PREGUNTAS QUE SE DESEA RESPONDER.

¿Qué genes se expresan diferencialmente entre células troncales hematopoyéticas de sujetos sanos y de pacientes con leucemia mieloide crónica, y en que vías de señalización participan?.

¿Existe algún patrón diferencial de expresión después del tratamiento con IM?.

OBJETIVO GENERAL.

Determinar los perfiles de expresión génica de células primitivas hematopoyéticas (CD34+CD38-Lin- y CD34+CD38+Lin-) de pacientes con leucemia mieloide crónica antes y después de haber sido expuestos a imatinib.

OBJETIVOS PARTICULARES.

Determinar por RT-PCR el rearreglo BCR/ABL en las muestras de médula ósea de pacientes con LMC.

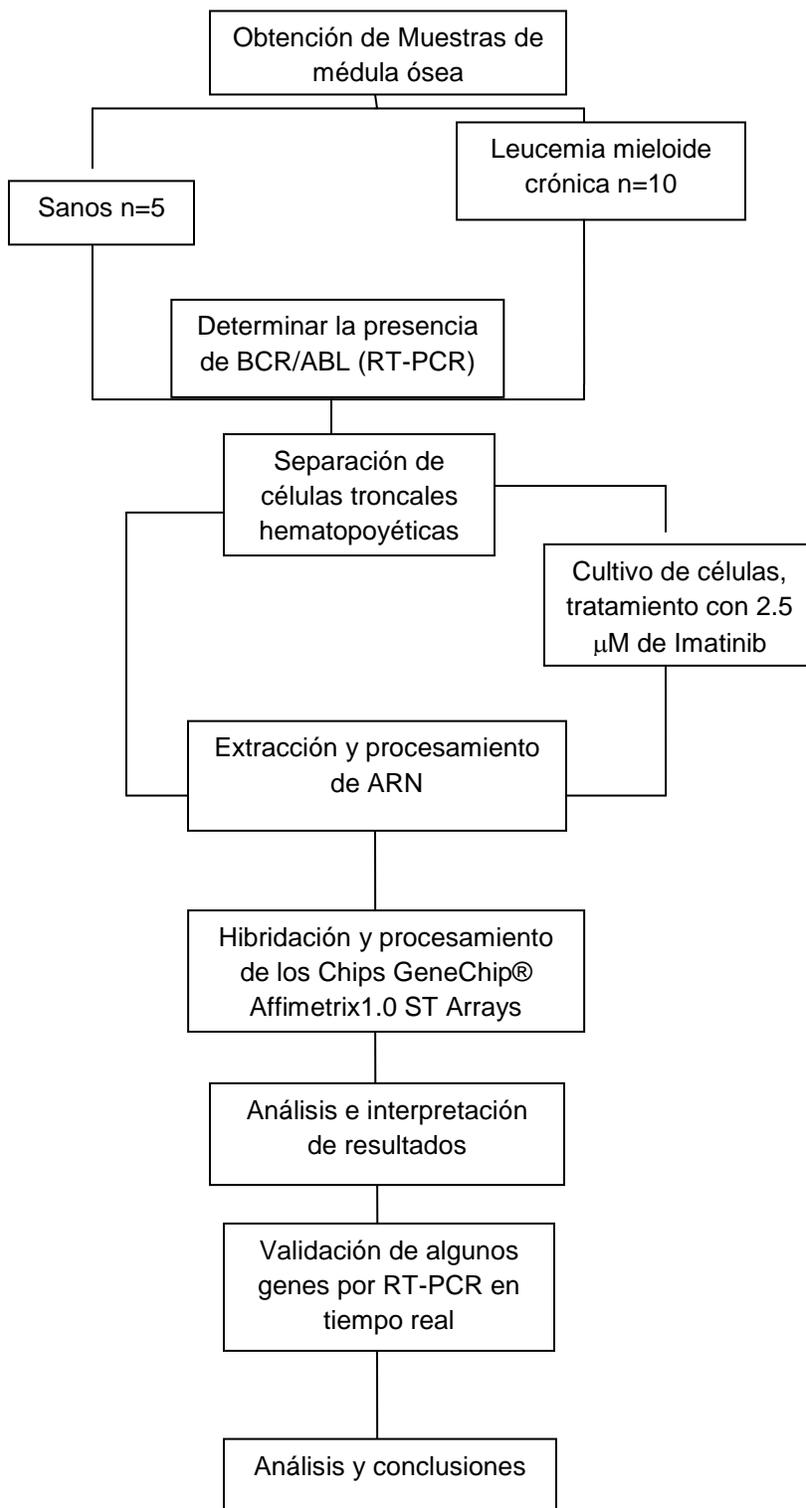
Purificar las células troncales hematopoyéticas (CD34+CD38+Lin-) y progenitoras hematopoyéticas (CD34+CD38+Lin-).

Realizar los microarreglos de las células troncales hematopoyéticas (CD34+CD38-Lin-) provenientes de pacientes con LMC y sujetos sanos, así como las células progenitoras (CD34+CD38+Lin-) después del tratamiento *in vitro* con imatinib.

Validar mediante RT-PCR en tiempo real algunos de los genes expresados diferencialmente entre LMC y muestras de sujetos sanos.

Analizar y establecer vías de señalización y moléculas implicadas en la leucemia mieloide crónica.

DIAGRAMA EXPERIMENTAL.



MATERIAL Y MÉTODOS.

Muestras de pacientes.

Los aspirados de médula ósea de pacientes con LMC empleados en este estudio se obtuvieron del Departamento de Hematología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional La Raza IMSS. Las muestras de médula ósea de sujetos hematológicamente sanos se obtuvieron de cirugías de reemplazo de cadera en el Hospital General Regional N.2 Villa Coapa IMSS. Las muestras fueron obtenidas previo consentimiento informado y bajo los lineamientos institucionales correspondientes. El protocolo fue registrado con el número R-2017-785-043, ante la Comisión Nacional de Investigación Científica del Instituto Mexicano del Seguro Social.

Aislamiento de células troncales y progenitoras.

Las células mononucleares (CMN) se aislaron a partir de 4 ml de muestra de médula ósea usando gradiente de Ficoll Paque Plus (GE Healthcare Life Sciences). Las células CD34+lin⁻ se enriquecieron usando el kit de enriquecimiento de células progenitoras hematopoyéticas humanas Stem Sep (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canadá). Para ello, se incubaron 100×10^6 de CMN durante 15 min a temperatura ambiente con un coctel de anticuerpos monoclonales para la eliminación de linaje dirigidos hacia moléculas de superficie: CD2, CD3, CD14, CD16, CD19, CD24, CD56, CD66b y glicoforina A. Después se incubó durante 15 minutos con un anticuerpo secundario acoplado a un coloide magnético. Posteriormente las células se pasaron a través de una columna inmunomagnética en la cual las células con marcadores de linaje permanecieron adheridas, mientras que las células linaje negativas (lin⁻) fueron obtenidas al eluir la columna con PBS adicionado con 10% de suero fetal de bovino (SFB).

Las células CD34+lin⁻ se colectaron en medio StemSpan, se tiñeron con anticuerpos CD34 FITC y CD38 APC (eBioscience, San Diego, CA, EE. UU.) para

finalmente separar las poblaciones en células troncales (CD34+CD38-Lin-) y células progenitoras (CD34+CD38+Lin-) utilizando un cell sorter BD FACSAria (BD Biosciences, San José, CA, EE. UU.). Después de la separación, las poblaciones obtenidas se contaron con un hemocitometro, usando azul de tripano y en el caso de las células troncales, se colocaron inmediatamente en Trizol (Thermo Fisher Scientific) para almacenarse a -80°C hasta la extracción del ARN.

En el caso particular de los progenitores y posterior al conteo celular, la población se dividió en tres partes iguales, una parte se colocó en Trizol y se procedió como anteriormente se describió.

Cultivo celular.

La segunda parte de la población progenitora se cultivó durante 48 horas en StemSpan Serum-Free Expansion Media (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canadá) suplementado con 10 ng / ml de EPO, TPO, Flt-3L, SF, IL6, IL3, G-CSF y GM-CSF. La tercera parte se cultivó en las mismas condiciones más 2.5 μ M de Imatinib (Gleevec Novartis Pharmaceuticals). Después de los cultivos, las células se lavaron, se contaron, se colocaron en Trizol y se almacenaron como se describo en el apartado anterior.

La línea celular de LMC K562 fue utilizada como control positivo para la estandarización de la determinación del transcrito BCR/ABL por RT-PCR y los ensayos de efecto de IM. Esta línea celular se deriva de un paciente femenino de 53 años con LMC en crisis blástica. Para cada ensayo, 100, 000 células por pozo fueron cultivadas en medio RPMI suplementado con 10% de SFB, mas IM en concentraciones de 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 15 y 20 μ M.

Extracción de ARN.

El ARN total se extrajo con Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA), a la pastilla de células de las distintas condiciones experimentales se adicionaron 750 μ l de Trizol

y se agitaron en vortex hasta disolver por completo la pastilla; adicionalmente, las muestras se pasaron por una jeringa de insulina 5 veces para obtener una lisis total de las células debido a la baja cantidad de las mismas. Posteriormente, se agregaron 200 μ l de cloroformo (Sigma Aldrich) agitando durante 15 segundos con una posterior incubación de 5 minutos, seguida de centrifugación a 12,500 rpm durante 15 minutos a 4°C. Derivado de este paso, en la muestra se formaron 3 fases: una inferior con fenol cloroformo que contiene ADN, una intermedia blanca que contiene proteínas y una acuosa superior que contiene ARN. Se recuperó la fase acuosa superior en un tubo nuevo de 1.5 ml y se agregaron 500 μ l de isopropanol (Sigma Aldrich).

La muestra se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos y se centrifugó a 12,500 rpm durante 10 minutos a 4°C para posteriormente decantar el sobrenadante. La pastilla se lavó adicionando 750 μ l de etanol (Sigma Aldrich), mezclando por inversión y se centrifugó a 9000 rpm durante 10 minutos a 4°C, se retiró el etanol restante y se resuspendió la pastilla en 20 μ l de agua libre de ARNasas.

Las muestras de ARN se cuantificaron mediante un espectrofotómetro ND-Nano ND-1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, E.U.) y la calidad del ARN extraído se evaluó utilizando un Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) seleccionando las muestras con un RIN superior a 7 para realizar los microarreglos.

RT-PCR punto final.

La presencia del transcrito BCR/ABL, se analizó en todas las muestras obtenidas. Para ello, se realizó la extracción de ARN a partir de 5×10^6 células mononucleares. Del ARN obtenido se utilizó 1 μ g para generar cADN mediante transcripción reversa, utilizando random primers y la enzima M-MLV transcriptasa reversa (Invitrogen, Carlsbad California). Se generó una primera mezcla que incluía random primers (3 μ g/ μ l), dNTP mix (10mM), ARN (1 μ g) y agua libre de

ARNsas. La mezcla se mantuvo a 65°C por 5 minutos y posteriormente se incubó en hielo 1 minuto.

Concluido este tiempo, se agregó una segunda mezcla que contenía buffer de reacción, DTT 0.1 M y ARNasa (40 U/μl) (Invitrogen, Carlsbad California). Esta mezcla se mantuvo a 37°C por 2 minutos y se adicionó la enzima M-MLV, para finalmente realizar la transcripción reversa utilizando los siguientes parámetros: 25°C 10 minutos, 37°C 50 minutos y 70°C 15 minutos.

Una vez obtenido el cADN se procedió a la amplificación del transcrito BCR/ABL por PCR anidado utilizando la enzima Taq Platinum ADN polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA) y primers específicos. Para ello, se mezcló buffer de PCR, MgCl₂ 50 mM, dNTP mix 10 mM, primers específicos (ver tabla 1), agua libre de nucleasas y Taq Platinum ADN polimerasa (5U/μl) con 2 μl de cADN obtenido, utilizando los parámetros descritos en la Tabla 1. En todos los casos se utilizó como control positivo ARN obtenido de la línea celular K562 y como control negativo agua libre de nucleasas.

Tabla 1.- Juegos de primers y condiciones de amplificación del transcrito BCR/ABL.

Transcrito	Primers	Parámetros de amplificación
BCR/ABL (1ra PCR)	5'-GGAGTGTTTCTCCAGACTGTTG-3' 3'-GAGCGTGCAGAGTGGAGGGAGAACA-5'	96°C 5 min, (94°C 30 seg, 61°C 1 min, 72°C 1 min) 35 ciclos, 72°C 10 min.
BCR/ABL (Anidado)	5'-TTCAGAAGCTTCTCCCTGACAT-3' 3'-GTTGACTGGCGTGATGTAGTTGCTTGG-5'	96°C 5 min, (94°C 30 seg, 58°C 1 min, 72°C 1 min) 30 ciclos, 72°C 10 min

Microarreglos de expresión génica.

Para realizar el microarreglo se utilizaron 150 ng de ARN provenientes de cada muestra, los cuales fueron procesados utilizando el kit de reactivos Affymetrix GeneChip Whole Transcript (WT) PLUS Reagent Kit (Affymetrix, Santa Clara, CA, EE. UU.). Se introdujeron 15 µg de cARN en la reacción de cADN del segundo ciclo. Posteriormente se introdujeron 5.5 µg de ss-cADN para la fragmentación. Cada fragmento de ADN se marcó en el extremo con biotina usando desoxinucleotidil transferasa terminal antes de hibridarse en los chips. Los cócteles de hibridación se prepararon y se aplicaron a los chips Gene Chip Human Gene 1.0 ST (Affymetrix, Santa Clara, CA, EE. UU.). La hibridación se realizó a 60 rpm durante 16 h a 45° C. Los procesos de lavado y tinción se realizaron con el kit de tinción y lavado de expresión Genechip en GeneChip Fluidics Station 450 (Affymetrix, Santa Clara CA, EE. UU.). Los chips se escanearon utilizando el GeneChip Scanner 3000 7G y Affymetrix GeneChip Command Console Software (AGCC) (Affymetrix, Santa Clara CA, EE. UU.) para producir archivos de intensidad .CEL.

Análisis de microarreglos.

La Affymetrix Expression Console se utilizó para procesar los archivos .CEL originales. Los archivos .chp se generaron utilizando el flujo de trabajo RMA-sketch después de la media de la señal (Median polish) y la normalización de datos (método Sketch-Quantile). El análisis de expresión de genes se llevó a cabo con el software Affymetrix Transcriptome Analysis Console. Un total de 29,096 genes se probaron a nivel central para comparar su expresión entre cuatro grupos, LMC y controles hematológicamente normales: células troncales T0, células progenitoras T0, células progenitoras CTRL (48 h cultivadas sin IM), células progenitoras con IM (cultivo 48 horas con IM 2.5 µM). Los genes con una tasa de cambio ≥ 2 o ≤ -2 y con un valor $p \leq 0.05$ se consideraron expresados diferencialmente entre cada comparación. La herramienta de Base de datos para anotación, visualización y descubrimiento integrado (DAVID) (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) se utilizó para identificar procesos biológicos que

pertenece a genes expresados diferencialmente de acuerdo con la clasificación de genes y ontologías.

RT-PCR en tiempo real.

El cADN se generó utilizando transcriptasa inversa M-MLV y random primers (Invitrogen, Carlsbad, CA) de ARN de células de cinco pacientes diferentes con LMC y cinco pacientes diferentes de cirugía de reemplazo de cadera adultos hematológicamente normales de los utilizados en los microarreglos para validar los resultados. Se seleccionaron cinco genes para la validación de qPCR usando ensayos TaqMan® de genes específicos (Life Technologies, Carlsbad, CA): *PIEZO2* (Hs00401026_m1), *RXFP1* (Hs01073141_m1), *CDH2* (Hs00983056_m1), *ABI3BP* (Hs00227206_m1), el gen *GAPDH* (Hs03929097_g1) sirvió como control para la cuantificación relativa. Los experimentos de qPCR se realizaron en un termociclador 7900 FAST en tiempo real (Applied Biosystems), las condiciones utilizadas fueron: 95°C durante 10 min, 40 ciclos de 95°C durante 10 s y 60°C durante 1 min. Todas las muestras se analizaron por triplicado y la tasa de cambio de la expresión génica se determinó con el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ usando *GAPDH* como el gen constitutivo.

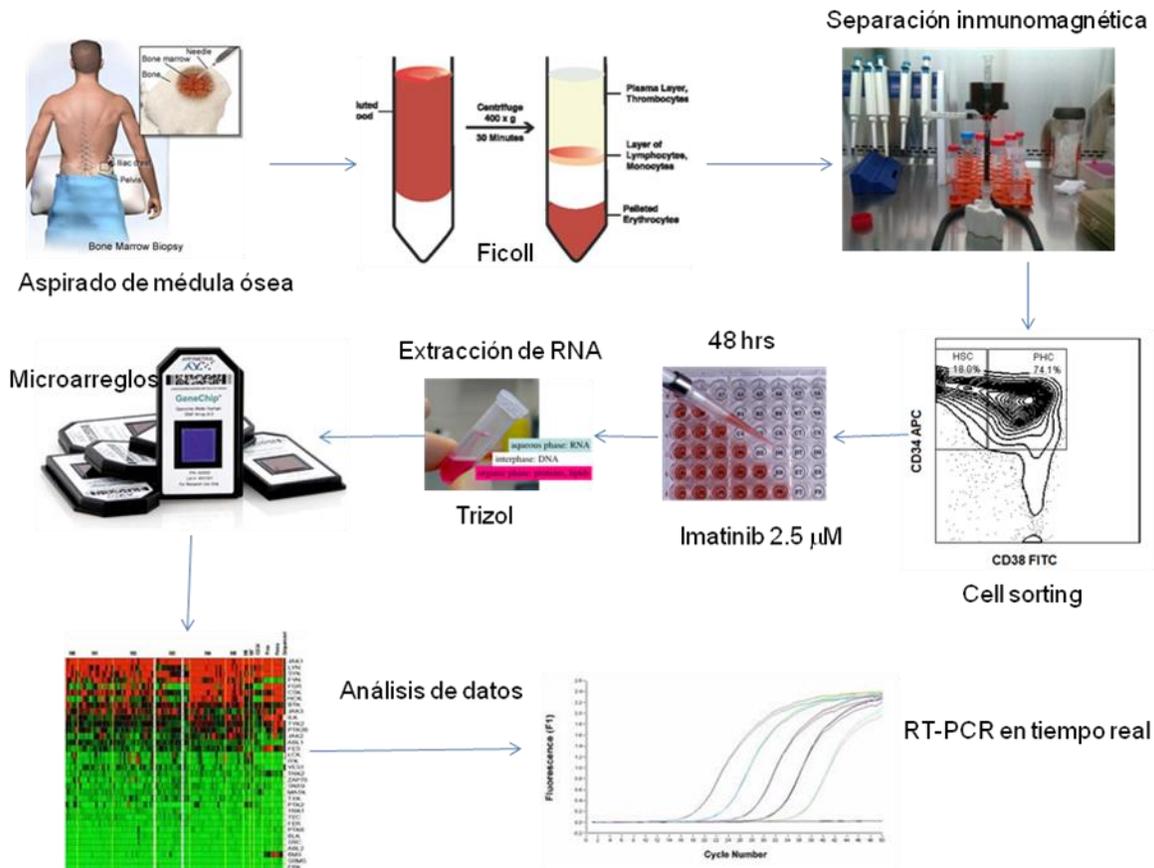


Figura 8.- Diagrama experimental del proyecto. A partir de los aspirados de médula ósea se separaron las células mononucleares por medio de Ficoll, posteriormente se enriquecieron células CD34+Lin- por medio de columnas inmunomagnéticas. Posteriormente se realizó separación de las poblaciones troncal CD34+CD38- y progenitora CD34+CD38+ por medio de cell sorting. La población progenitora se cultivo con 2.5 μ M de IM y después se procedió a la extracción de ARN de las diferentes condiciones experimentales por el método de TRIZOL. Las muestras con la calidad adecuada se procesaron por microarreglos y se procedió al análisis bioinformático.

RESULTADOS.

Extracción de ARN.

En la primera etapa del proyecto, se determinó el número celular mínimo suficiente para extraer ARN, para lo cual se realizó la extracción con diferentes cantidades de células utilizando la línea celular K562 (Figura 9), encontrando que a partir de 10,000 células ya se podía obtener ARN suficiente, el cual fue aumentando proporcionalmente al incrementar la cantidad de células utilizadas (Tabla 2).

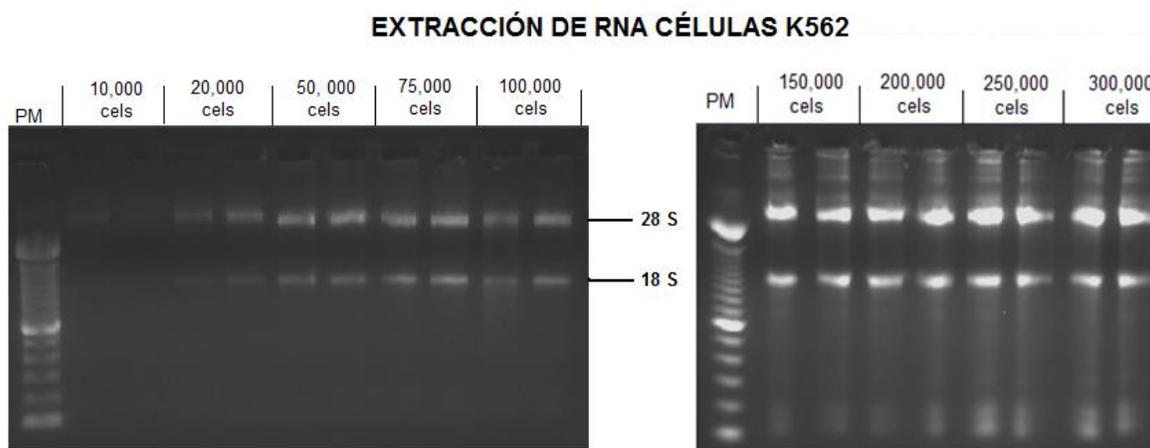


Figura 9.- Extracción de ARN de células K562. Se realizó una curva partiendo de 10,000 células hasta 300,000 células. Las imágenes corresponden a 2 geles de agarosa al 2% teñidos con SYBR Gold en donde se observan las subunidades 28S y 18S del RNA ribosomal.

Tabla 2.- Cuantificación de ARN en relación al número celular de la línea celular K562

N. Células	10000	20000	50000	75000	100000	150000	200000	250000	300000
[] ARN ng/μl	40	48	70	88	104	130	174	232	266
	45	52	65	90	120	135	180	228	296

Tabla 2.- Se muestran los valores obtenidos por espectrofotometría de la concentración de ARN de los diferentes números de células K562.

En el caso de la cuantificación de ARN para células troncales de médula ósea normal y de pacientes con LMC crónica no fue factible obtener concentraciones similares, debido al carácter quiescente y metabólicamente poco activo de esta población celular. Ejemplo de ello es la inicial estandarización de la purificación de células troncales por medio de columnas inmunomagnéticas con muestras provenientes de de sangre de cordón umbilical en donde a partir de 117,000 células troncales se obtuvo una concentración de 36 ng/ μ l haciendo evidente lo anteriormente descrito, comparado con una concentración de 96 ng/ μ l obtenidos a partir de 100,000 células K562 (Figura 10). De igual manera ocurrió con las muestras de células troncales de LMC por lo que se determinó realizar los cultivos con IM en la población progenitora de MON y LMC.

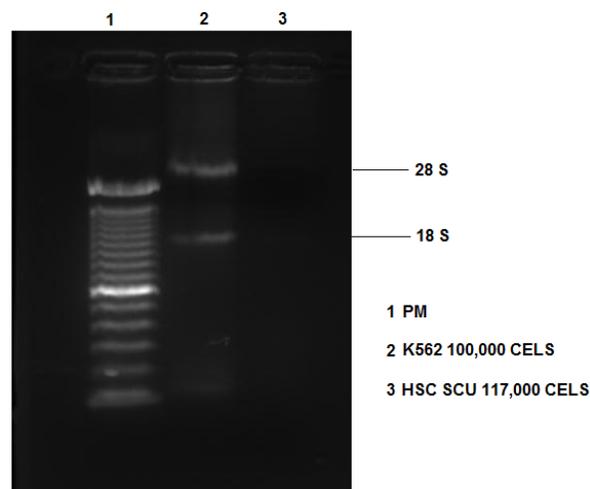


Figura 10.- Extracción de ARN de células troncales de sangre de cordón umbilical y K562. La figura muestra una imagen representativa de lo obtenido en la extracción de 100,000 células de la línea K562 (carril 2) y 117,000 células troncales provenientes de Sangre de Cordón Umbilical (carril 3). Gel de agarosa al 2% teñido con SYBR Gold. Marcadores de Peso Molecular 50 pares de bases (carril 1).

RT-PCR en punto final.

Una vez extraído el ARN, se procedió a la estandarización del RT-PCR en punto final para la expresión de BCR/ABL utilizando la línea celular K562 como control y realizando un PCR anidado para aumentar la sensibilidad del ensayo (Figura 11). El mismo procedimiento se realizó para las muestras recibidas ya que la presencia del transcrito BCR/ABL fue un criterio de exclusión para las muestras consideradas en el proyecto.

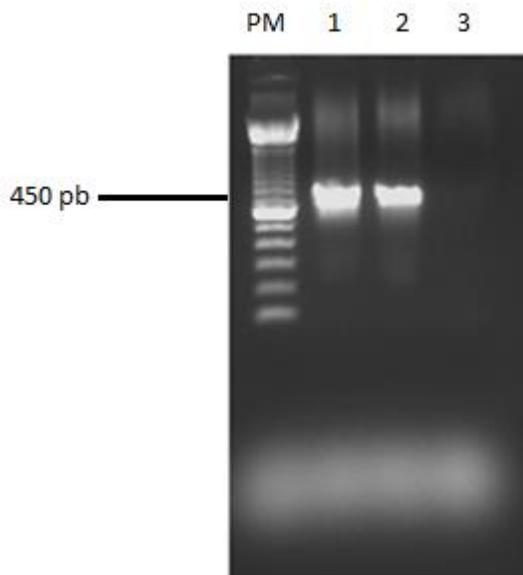


Figura 11.- RT-PCR en punto final para amplificar en transcrito BCR/ABL. La figura muestra una imagen representativa de un gel de agarosa al 2% teñido con SYBR Gold en donde se obtuvo un producto final de amplificación de 450 pb proveniente de la línea K562 (Carril 1), una muestra de un paciente con LMC (Carril 2) y el control negativo utilizando agua como templado (carril 3).

Peso Molecular de 50 pares de bases.

Cultivos con Imatinib.

Con la intención de determinar la concentración de IM necesaria para lograr la inhibición de las células a utilizar en el microarreglo y considerando el bajo número celular de las muestras primarias, se utilizó la línea K562 para esta estandarización. La evaluación se realizó partiendo del conocimiento que la dosis

en pacientes tratados con IM es de 400 mg al día, lo que corresponde a concentraciones plasmáticas entre 4 y 6 μM (Valent, 2007), así que las células fueron cultivadas a concentraciones de 2.5 μM , 5 μM , 7.5 μM , 10 μM , 15 μM y 20 μM del fármaco. Los resultados indican que a partir del tratamiento con 2.5 μM de IM a las 24 horas, hubo un efecto en el porcentaje de células recuperadas; sin embargo, dicho efecto no alcanzaba para llegar a reducir la población en un 50% (IC50, por lo que se procedió a incrementar el tiempo de cultivo a 48 h (Figura 12).

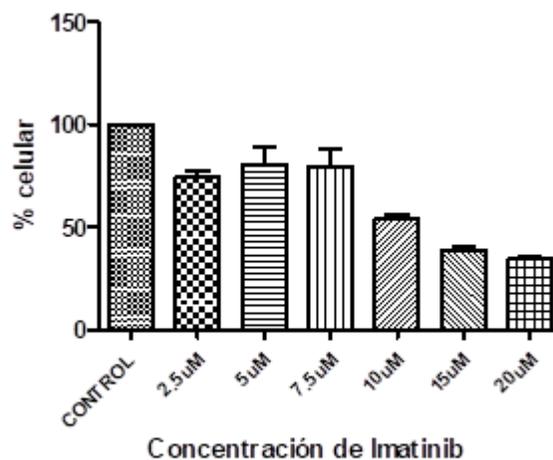


Figura 12.- Efecto de Imatinib en la viabilidad de células K562 a las 24 horas. Células K562 fueron cultivadas por 24 horas en medio StemSpan suplementado con citocinas y con diferentes concentraciones de IM. Se muestran los porcentajes de recuperación de células después del conteo con azul de tripano $n=3$, $P < 0.05$.

La figura 13 indica que después de 48 horas en presencia de IM, la línea celular K562 reduce el porcentaje de células en cultivo en un 50% a concentraciones de 2.5 μM , además de que también se detectó cambio en la morfología celular (Figura 14), por lo que se procedió a determinar si a estas concentraciones existía muerte celular.

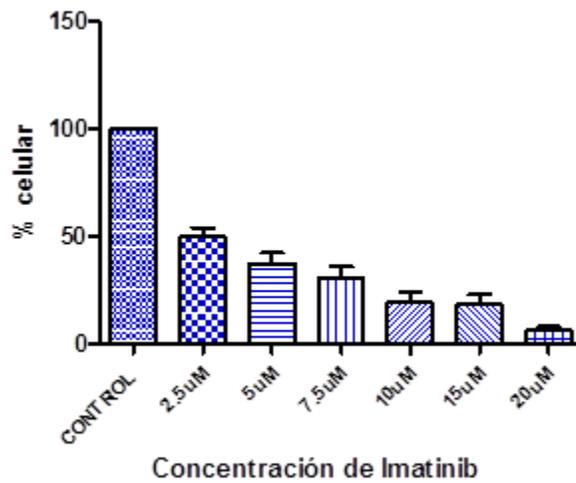


Figura 13.- Efecto de IM en la viabilidad de células K562 a las 48 horas. Células K562 fueron cultivadas por 48 horas en medio StemSpan suplementado con citocinas y con diferentes concentraciones de IM. Se muestran los porcentajes de recuperación de células después del conteo con azul de tripano N=3 P<0.05.

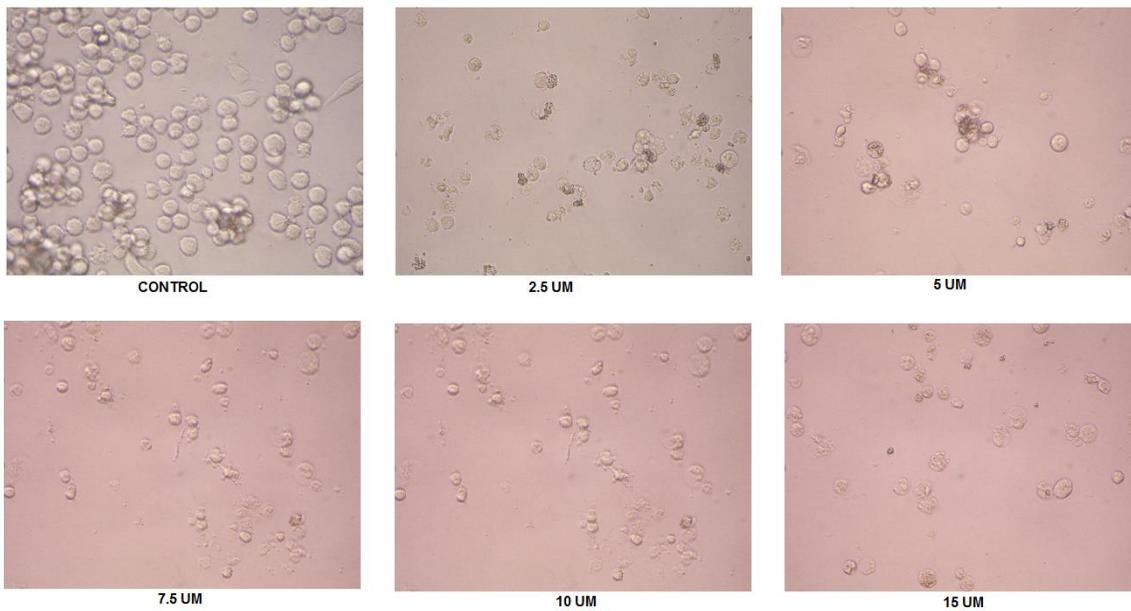


Figura 14.- Efecto de IM en la morfología de células K562 a las 48 horas de cultivo. La imagen corresponde a las 48 horas de cultivo en medio StemSpan suplementado con citocinas, con las diferentes concentraciones de IM además de un grupo control. Aumento 40X.

Para definir la razón de la reducción en el porcentaje en los diferentes tratamientos con IM, se realizó un ensayo de AnexinaV y 7-AAD por citometría de flujo, lo que permite identificar si es que en la población hay células que se encuentran en proceso de apoptosis. Los resultados de este ensayo indicaron que el tratamiento de las células K562 con IM si induce apoptosis y esta se incrementa cuando se aumenta la concentración de IM ya que en la población control se detectó sólo el 8.66% de células en apoptosis, mientras que el porcentaje aumentó considerablemente a las diferentes concentraciones de IM utilizadas: a 2.5 μ M con 23.8%, 5 μ M con 21.4%, 7.5 μ M con 28.3%, 10 μ M con 42% y 15 μ M con 37.5% (Figura 15).

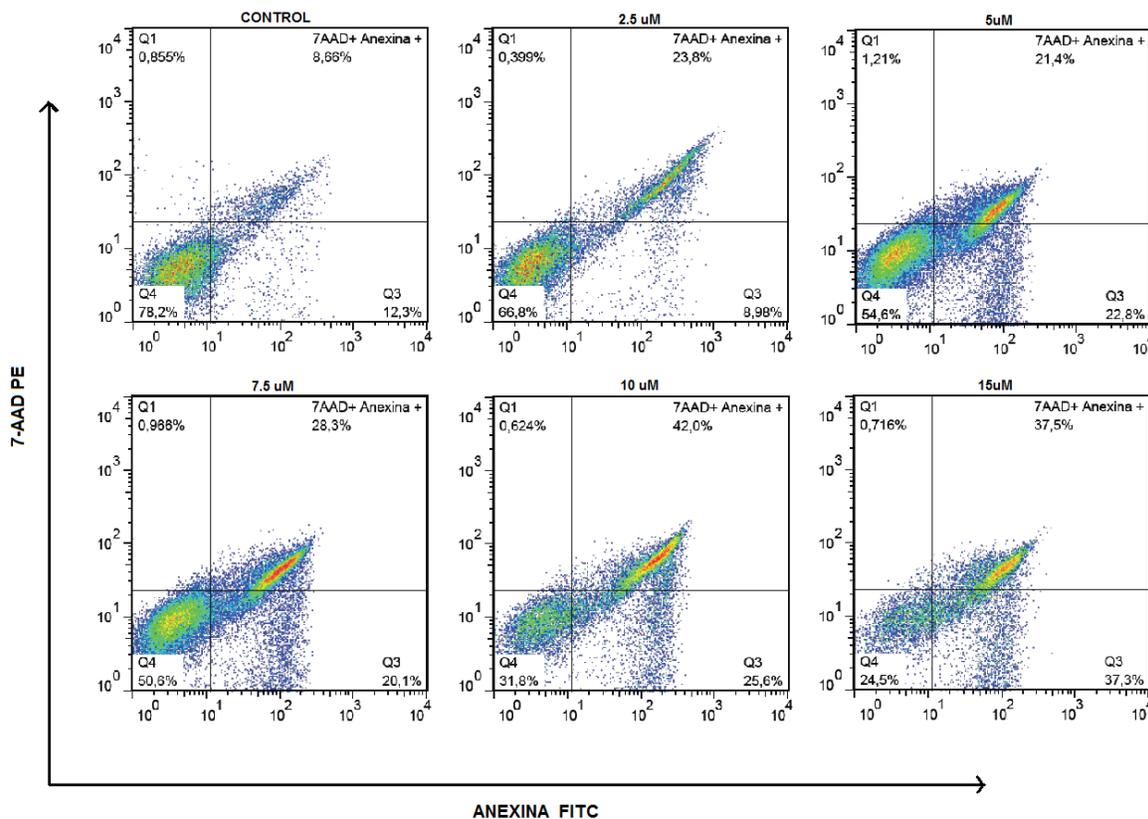


Figura 15.- Efecto de IM en la inducción de apoptosis en células K562 a las 48 horas de cultivo. Cien mil células K562 se cultivaron a las diferentes concentraciones de IM por 48 horas en medio StemSpan suplementado con citocinas para posteriormente ser teñidas con 7-AAD y Anexina y analizada mediante citometria de flujo. La figura muestra un ensayo representativo de 3 experimentos, de la muerte por apoptosis (poblaciones dobles positivas), evaluada en las diferentes condiciones de cultivo.

Como un control del efecto del fármaco, también se evaluó el efecto *in vitro* de IM sobre la proliferación de células de médula ósea normal. A partir de muestras de médula ósea provenientes de sujetos hematológicamente sanos se purificaron por columnas inmunomagnéticas las células progenitoras CD34+Lin- y se cultivaron en presencia de las diferentes concentraciones de IM. Los resultados demuestran que el IM tiene efecto mínimo sobre las células de médula ósea normal tanto a 24 como a 48 horas (Figuras 16 y 17), lo cual puede estar asociada a que este agente también es un inhibidor de los receptores c-kit y PDGFR presentes en células primitivas de MON (Appel et al, 2005). Aunado a lo anterior, es importante comentar que aunque el efecto en células normales se incrementa conforme aumenta la concentración de IM, el efecto en la viabilidad a 2.5 μ M después de 48 horas de cultivo es de una reducción del 20%, mientras que en la contraparte leucémica es del 50%. Además, no se observa un efecto en la morfología de las células normales como sucedió con la fracción leucémica (Figura 18).

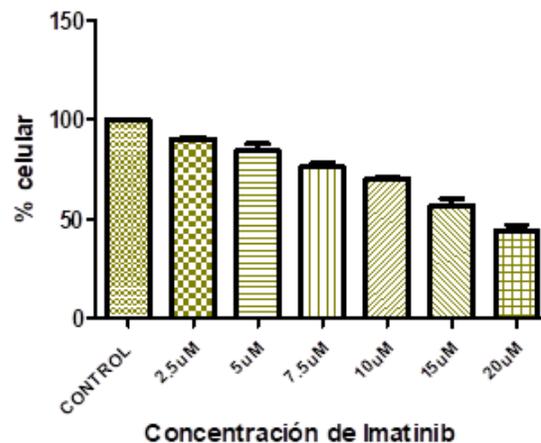


Figura 16.- Efecto de IM en la sobrevivencia de células CD34+Lin- de MON a las 24 horas. Células CD34+Lin- de MON fueron cultivadas por 24 horas en medio StemSpan suplementado con citocinas y con diferentes concentraciones de IM. Se muestran los porcentajes de recuperación de células después del conteo con azul de tripano n=3 P<0.05.

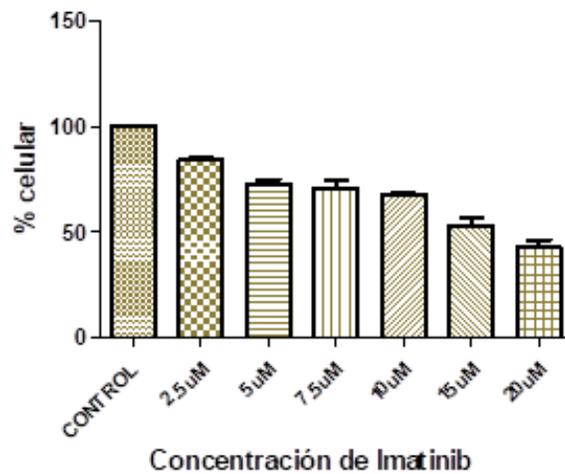


Figura 17.- Efecto de IM en la sobrevivencia de células CD34+Lin- de MON a las 48 horas. Células CD34+Lin- de MON fueron cultivadas por 48 horas en medio StemSpan suplementado con citocinas y con diferentes concentraciones de IM. Se muestran los porcentajes de recuperación de células después del conteo con azul de tripano n=3 P < 0.05.

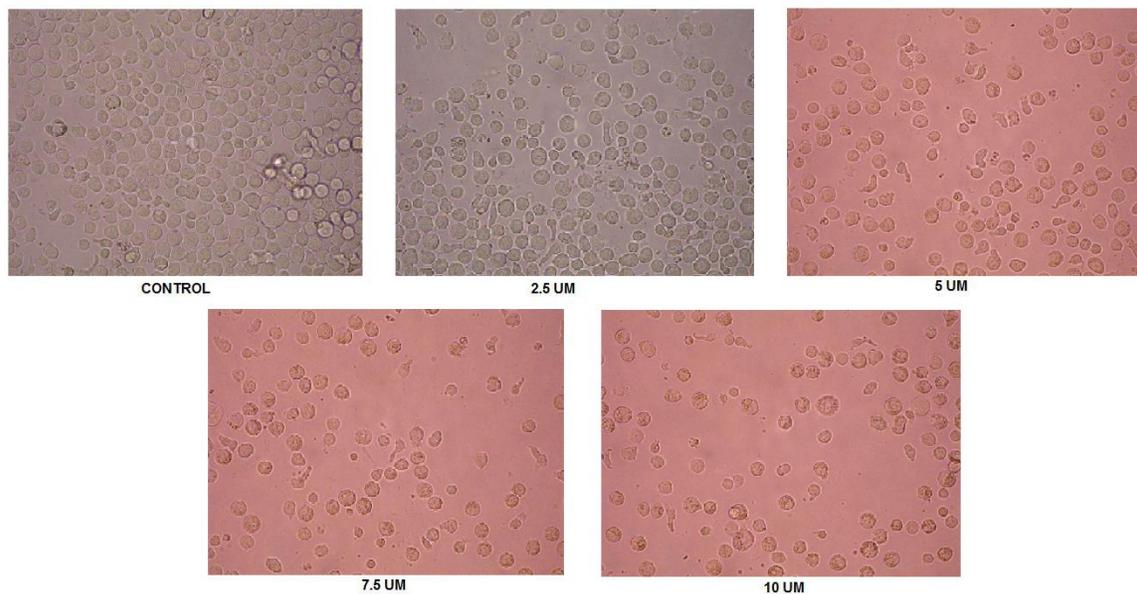


Figura 18.- Efecto de IM en la morfología de células CD34+ Lin- de MON a las 48 horas de cultivo. La imagen corresponde al día 3 de cultivo en medio StemSpan suplementado con citocinas, y con las diferentes concentraciones del fármaco; además de un grupo control al cual sólo se agregó PBS al 10% con DMSO que fue el vehículo el cual se disolvió el IM. Aumento 40X.

De igual manera que en la línea celular K562, se analizó la muerte por apoptosis en las células CD34+Lin- de médula ósea normal en respuesta al tratamiento con IM. Los resultados indican que mientras en el control hay 3.84% de células en apoptosis, en los cultivos tratados con 2.5 y 5 μ M de IM, este nivel se incrementa a 2.5% y 2.77%, respectivamente, lo que indica que por lo menos a estas concentraciones no hay inducción de muerte por apoptosis. Sin embargo, al incrementar la dosis de IM 7.5 μ M y 10 μ M, se induce un nivel de muerte del 6.3% y 12.3% respectivamente, lo cual representa 3.5 veces menos muerte que en su equivalente de LMC (Figura 19).

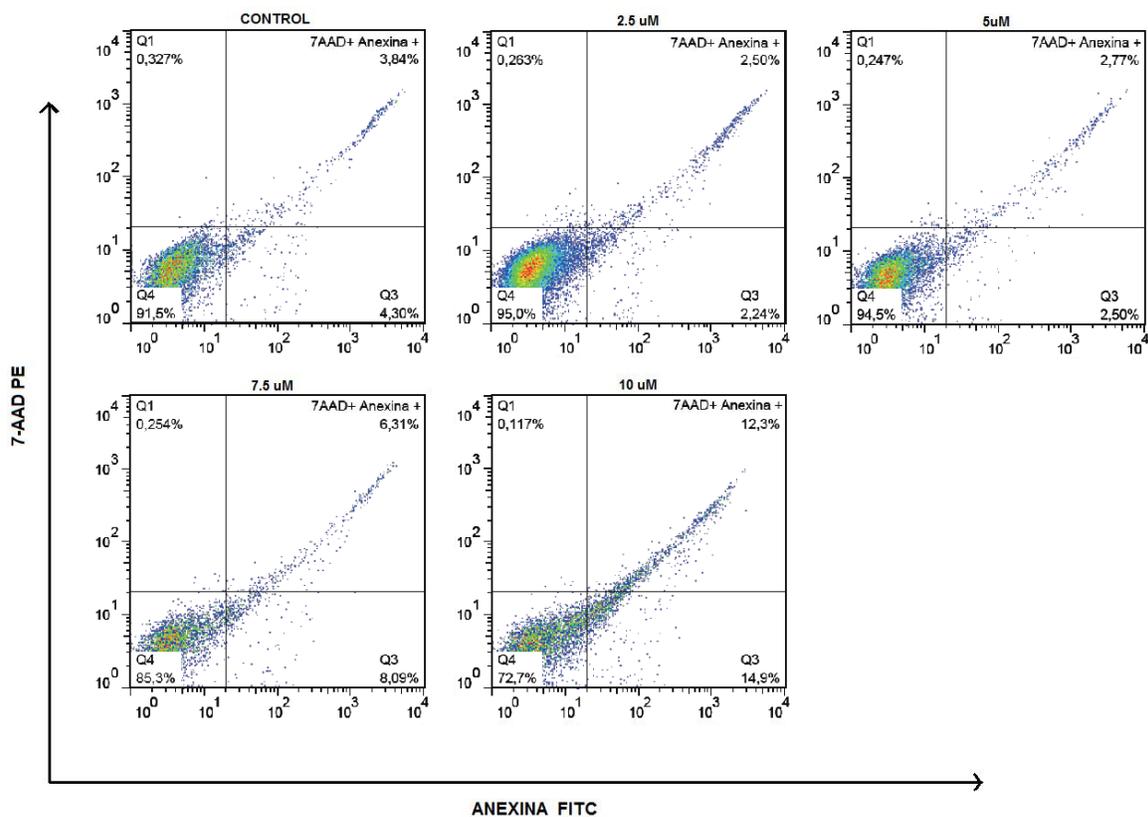


Figura 19.- Efecto de IM en la inducción de apoptosis en células CD34+ Lin- de MON a las 48 horas de cultivo. Cien mil células CD34 Lin- se cultivaron a las diferentes concentraciones de IM por 48 horas en medio StemSpan suplementado con citocinas para posteriormente ser teñidas con 7-AAD y Anexina y analizada mediante citometría de flujo. La figura muestra un ensayo representativo de la muerte por apoptosis (poblaciones dobles positivas), evaluada en las diferentes condiciones de cultivo.

Con base en las evaluaciones anteriores (viabilidad, morfología, muerte por apoptosis), se consideró el tiempo de 48 horas y la concentración de 2.5 μM para realizar los cultivos de las células primitivas purificadas de las muestras de pacientes, que serían utilizadas para realizar los microarreglos de expresión.

Separación de células troncales y progenitoras.

Una vez evaluadas las características de los diferentes cultivos, se procedió a purificar las poblaciones troncales (CD34+CD38-) y progenitoras (CD34+CD38+) provenientes de muestras primarias de MON y LMC, con las que se realizaron los microarreglos. La purificación se realizó mediante una inmunoselección negativa inicial y el posterior cell sorting para garantizar una mayor pureza de ambas poblaciones. La estrategia de separación se realizó tanto para la población de células de MON como de LMC (Figura 20).

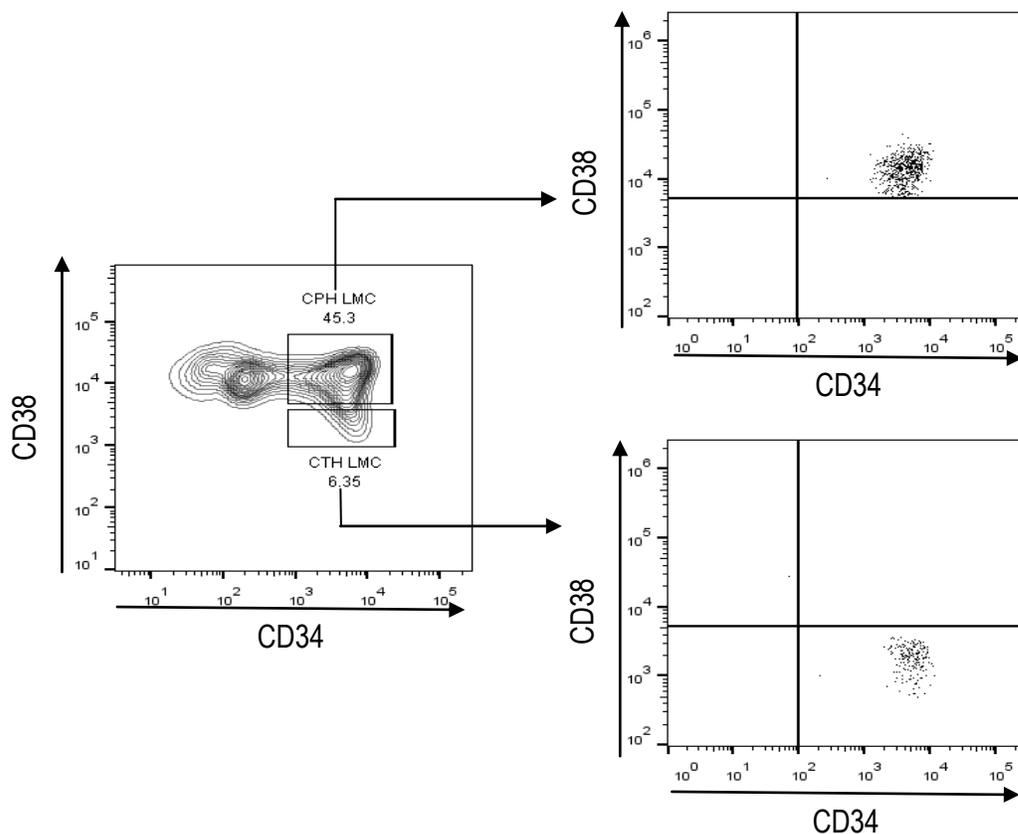


Figura 20.- Estrategia de purificación de las poblaciones troncales y progenitoras de LMC y MON. Las muestras primarias fueron enriquecidas mediante columnas inmunomagnéticas en la población CD34+lin-, la cual fue posteriormente incubada con anticuerpos anti CD34 y anti CD38 para su posterior selección por cell sorting. La figura muestra la estrategia de purificación para células provenientes de LMC y el mismo procedimiento se realizó en el caso de MON.

En el curso del proyecto se procesaron 83 muestras de MON. De éstas solo la fracción progenitora tuvo números celulares suficientes para ser evaluada en cultivos *in vitro* en presencia de IM, además de que un número menor de ellas alcanzó el número de integridad de RNA (RIN) necesario para ser procesadas en los microarreglos. De esta forma se garantizó que para el análisis de transcritos se tuvieran representadas las siguientes condiciones: población troncal tiempo cero, población progenitora tiempo cero, población progenitora 48 h sin IM y población progenitora 48 h con IM. En el caso de las muestras de LMC se procesaron 47 muestras y de ellas el número de muestras cultivadas *in vitro* y procesadas para los microarreglos cubriendo las condiciones anteriormente descritas fueron 38 y 5 respectivamente.

De acuerdo con los datos primeramente descritos y una vez teniendo purificadas las poblaciones progenitoras, se procedió a evaluar el efecto de IM sobre muestras primarias cultivadas *in vitro*. Una vez concluido este análisis se recuperaron las células y se utilizaron para realizar los microarreglos.

Durante la obtención de las poblaciones celulares por citometría de flujo, se obtuvieron números celulares muy reducidos tanto para MON como para LMC. En el caso de MON las poblaciones progenitoras estuvieron en un rango del 0.002% - 0.019% del número total de CMN, mientras que la fracción troncal osciló entre el 0.001% y 0.005% del total de CMN. En el caso de LMC los porcentajes fueron más variables ya que oscilaron entre 0.03% y 0.18% de células progenitoras y 0.0001% a 0.06% para la fracción troncal. Estos números concuerdan con lo previamente reportado por otros grupos y además dan evidencia de lo numericamente reducido de las poblaciones hematopoyéticas primitivas y en

consecuencia la relevancia de los datos que se puedan generar con ellas (Tabla 3).

Tabla 3.- Recuperación de células troncales y progenitoras hematopoyéticas después del proceso de enriquecimiento y separación por citometría de flujo

		NÚMERO DE CÉLULAS MONONUCLEARES (X10 ⁹)	NÚMERO DE CÉLULAS TRONCALES (%/CMN)	NÚMERO DE CÉLULAS PROGENITORAS (%/CMN)
MUESTRA				
MON	24/11	1.139	16062 (0.001%)	31625 (0.002%)
	27/11	1.200	60 000 (0.005%)	260 000 (0.019%)
LMC	47/11	1.651	1 000 000 (0.06%)	3 000 000 (0.18%)
	51/11	2.184	32 145 (0.0001%)	800 000 (0.03%)

Tabla 3.- Recuperación de células troncales y progenitoras hematopoyéticas después del proceso de enriquecimiento y separación por citometría de flujo. La tabla muestra datos representativos de las muestras de cada población tanto para MON como LMC.

Considerando los números celulares obtenidos se decidió realizar el perfil de expresión de células troncales únicamente a tiempo cero (es decir, recién obtenidas las poblaciones celulares), mientras que para las células progenitoras se incluyó la evaluación de expresión tanto a tiempo cero como en respuesta al tratamiento con IM por 48 horas.

Los datos de esta evaluación muestran que semejante a lo que sucedió con la estandarización previamente mostrada para la línea celular de LMC K562, las células progenitoras de LMC tuvieron una reducción del 40% en su viabilidad, efecto que no fue detectado en células progenitoras normales que provenían tanto de MON como de Sangre Periférica Movilizada, la cual fue utilizada como un control normal adicional. Estos hallazgos reafirman la selectividad de IM para células leucémicas y en consecuencia su dependencia a BCR/ABL para su proliferación (Figura 21). Aunado a lo anterior y semejante a lo que se describió previamente para la línea K562, las células progenitoras primarias de LMC

también mostraron un importante cambio morfológico el cual no es detectado en células normales (Figura 22).

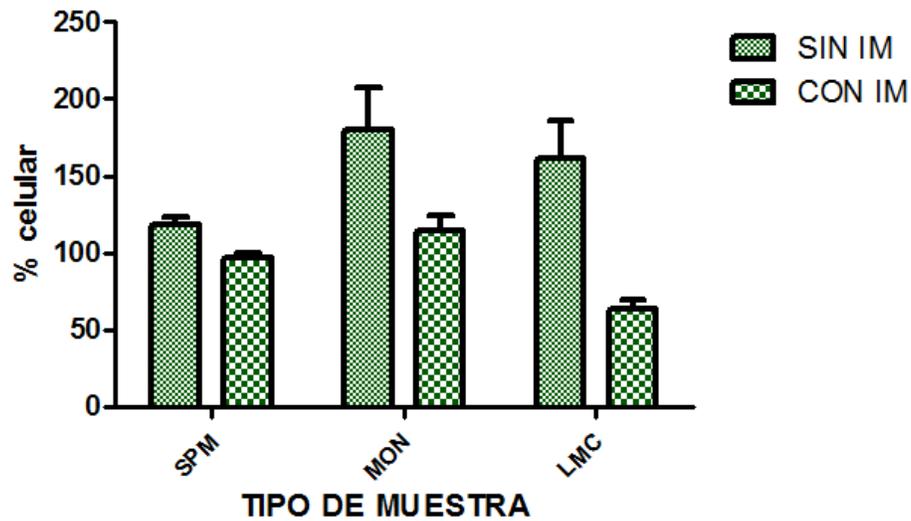


Figura 21.- Efecto de IM en la viabilidad de células progenitoras normales y leucémicas.

Células progenitoras CD34+CD38+Lin- provenientes de LMC MON y SPM fueron purificadas mediante cell sorting y cultivadas en medio StemSpan suplementado con citocinas, en presencia o ausencia de 2.5 μ M de IM durante 48 hrs. La figura representa el promedio de tres experimentos independientes por triplicado normalizado al 100% que corresponde al número celular sembrado al inicio del cultivo n=3 P<0.05.

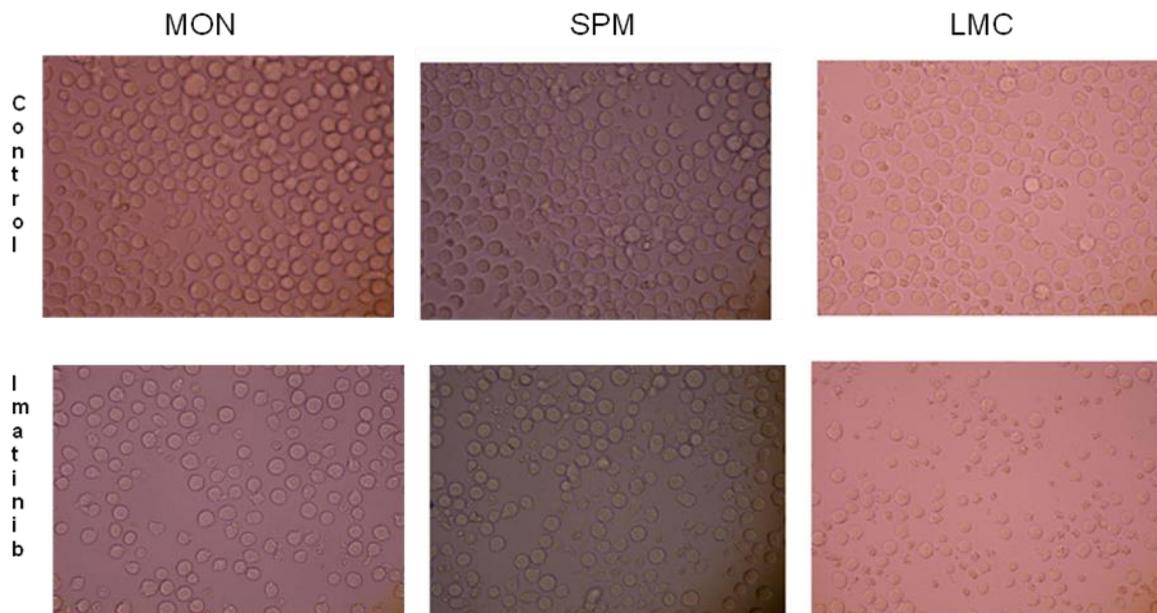


Figura 22.- Efecto de IM en la morfología de las células progenitoras. Células progenitoras CD34+CD38+Lin- provenientes de LMC, MON y SPM fueron purificadas mediante cell sorting y cultivadas en medio StemSpan suplementado con citocinas, en presencia o ausencia de 2.5 μ M de IM durante 48 hrs. La figura muestra una imagen representativa del estado de los cultivos al final del experimento.

Como una forma de analizar el estado funcional de las poblaciones progenitoras purificadas, se realizaron ensayos de formación de colonias los cuales se basan en la capacidad que tienen los progenitores hematopoyéticos para formar colonias en un medio semisólido en respuesta a la estimulación de citocinas. Estos cultivos fueron realizados en presencia y ausencia de IM, para corroborar que el fármaco tiene efecto en la expansión de células de pacientes con LMC.

Los datos de la Figura 23 muestran que tanto las poblaciones de células progenitoras de MON como de LMC tienen la capacidad de formar colonias pero como puede observarse el tratamiento *in vitro* con IM tuvo un efecto considerable en la formación de colonias en células de LMC reduciendo en un 90% su capacidad; además que de las pocas colonias encontradas, la forma y el tamaño se vieron considerablemente afectadas (Figura 24). En el caso de células progenitoras de MON, se observa que la capacidad formadora de colonias se redujo en un 55% y también se observó un número menor de células que forman parte de la colonia. Estos resultados ponen de manifiesto que el IM es mucho más selectivo sobre células de LMC y que en el caso de MON el efecto podría asociarse a lo ya publicado por Bartolovic et al, quien encuentra una supresión en el compartimento de células progenitoras hematopoyéticas a nivel de células formadoras de colonias, lo cual depende de la concentración de IM y pudiera estar asociada a la inhibición de cinasas como c-kit u otros receptores para los cuales IM ha mostrado efecto (Bartolovic et al, 2004).

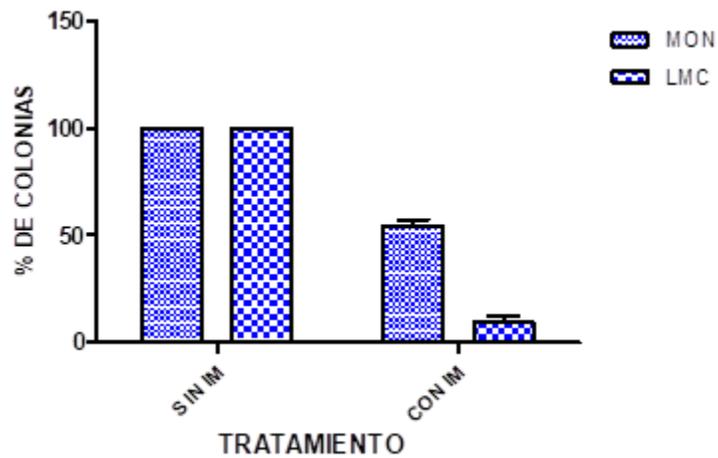


Figura 23.- Efecto de IM sobre la formación de colonias en células mononucleares de LMC.

Células progenitoras de MON y LMC fueron cultivadas durante 14 días en metilcelulosa suplementada con citocinas en presencia o ausencia de 2.5 μ M de IM. La figura representa el porcentaje de colonias obtenido después del cultivo en relación a las colonias obtenidas en el control sin fármaco (100%) para cada una de las fuentes n=3 P<0.05.

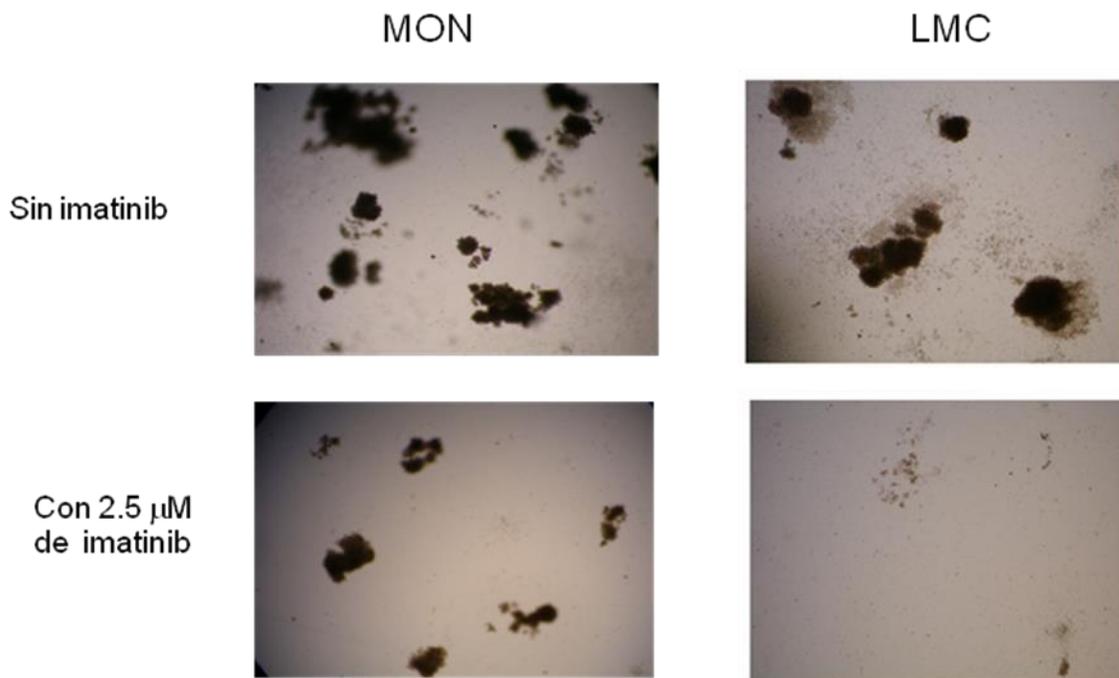
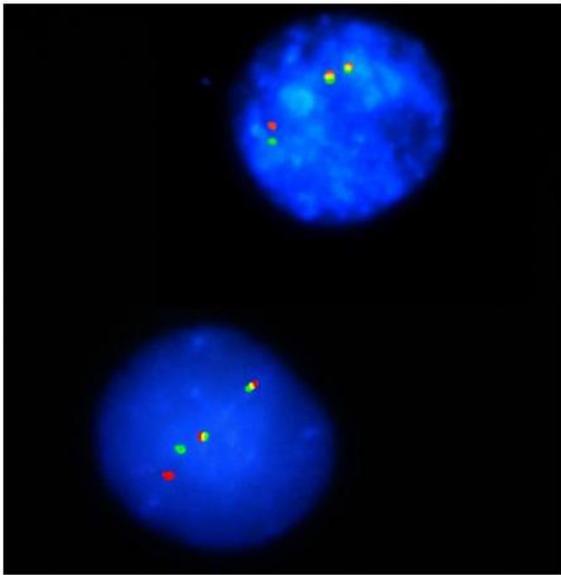


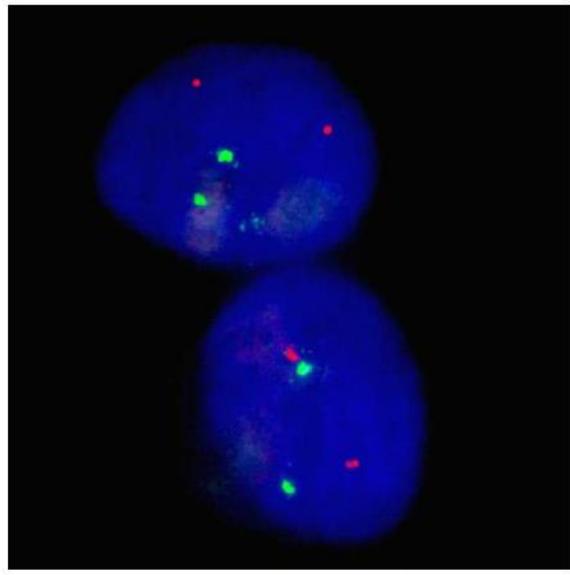
Figura 24.- Efecto de IM sobre la formación de colonias en células mononucleares de LMC y MON. La figura muestra una imagen representativa de las colonias obtenidas después de 14 días de cultivo de las células progenitoras en presencia o ausencia de 2.5 μ M de IM.

Considerando que el tratamiento con IM reduce numericamente las poblaciones de células progenitoras, pero también tiene un efecto en células normales, se verificó la permanencia de células positivas al cromosoma Philadelphia después del tratamiento con el fármaco. Para ello, células progenitoras CD34+CD38+Lin-purificadas a partir de pacientes con LMC fueron evaluadas mediante la técnica de hibridación in situ fluorescente (FISH) antes y después de tratamiento con IM. Esta estrategia experimental es usada en el monitoreo y detección de enfermedad mínima residual en LMC, mediante el uso de una sonda específica para la t(9;22) (LSI BCR/ABL Dual Color Translocation Probe, VYSIS) y permite distinguir a células que tienen el cromosoma Ph de las que no lo tienen, algo que no es posible observar con el monitoreo por RT-PCR el cual solo mide la expresión del transcrito para BCR/ABL.

Los resultados muestran que el 96% de las células de pacientes no tratados con IM fueron Ph+ mientras que solo un 4% fueron Ph-, correspondientes probablemente a la población residual normal. Después del tratamiento con IM por 48 horas, el porcentaje de células Ph+ se redujo a 66% y la población Ph- se elevó a 34% lo cual puede deberse a que inicialmente y sin IM las células Ph+ tienen ventajas selectivas sobre la población residual normal Ph- y una vez bajo tratamiento esta población normal tiene la capacidad de emerger y continuar con el proceso hematopoyético normal (Figuras 25 y 26).



CELS Ph+ CD34+CD38+Lin de LMC



CELS Ph- CD34CD38Lin de LMC

Figura 25.- Permanencia del cromosoma Philadelphia en células CD34+CD38+ después de ser tratadas con IM. Poblaciones purificadas de células CD34+CD38+ lin- seleccionadas por cell sorting fueron cultivadas en medio StemSpan suplementado con citocinas durante 48 horas en ausencia o presencia de 2.5 μ M de IM, para posteriormente ser analizadas mediante FISH usando la sonda específica LSI BCR/ABL ES Dual Color Translocation Probe, VYSIS. Se muestra del lado izquierdo núcleos Ph+ y del lado izquierdo núcleos pH-. El fluorocromo verde detecta el gen BCR y el fluorocromo rojo detecta ABL. Se identifica la translocación con la coloración intermedia amarilla emitida por el acercamiento de los dos fluorocromos del gen quimérico BCR/ABL. n=2.

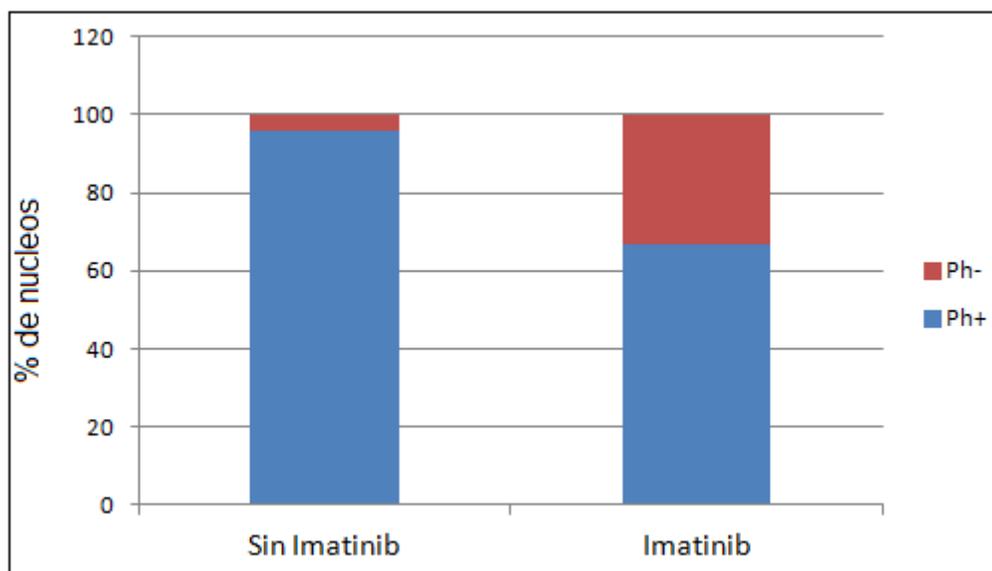


Figura 26.- Porcentaje de células CD34+CD38+Lin- Ph+ post-tratamiento. Se muestran los porcentajes de núcleos Ph+ y Ph- después del tratamiento por 48 horas con 2.5 μ M de IM. El análisis se realizó mediante FISH usando la sonda específica LSI BCR/ABL ES Dual Color Translocation Probe, VYSIS.

Finalmente, y tomando como ventaja que en algunas muestras leucémicas se contó con un número celular suficiente, se consideró evaluar el efecto del IM *in vitro* sobre estas poblaciones y compararla con el efecto ya mostrado sobre la población de células progenitoras.

Los resultados de la Figura 27 muestran que, como era de esperarse, la población troncal al ser más primitiva, tiene menor capacidad de proliferación en relación a la población progenitora sin tratamiento y una vez expuesta al fármaco se detecta una reducción de la población en un 25%, mientras que en los progenitores el efecto del IM es mayor, ya que se reduce en un 40%. Este resultado podría correlacionar con la reducción del transcrito para BCR/ABL de más de un 80%, que se observa después de tratamiento con IM y que no sucede en la misma magnitud para el caso de los progenitores (Figura 28).

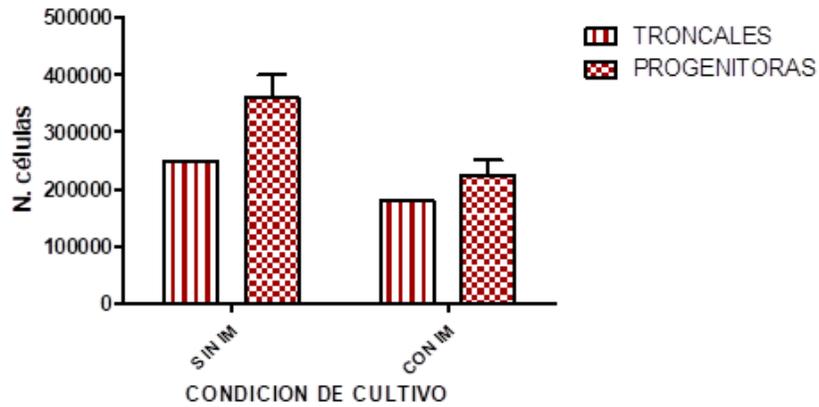


Figura 27.- Efecto de IM en la proliferación de células troncales CD34+CD38-Lin- de LMC.

Células troncales CD34+CD38-Lin- y células progenitoras hematopoyéticas CD34+CD38+Lin- fueron cultivadas durante 48 hrs en ausencia y presencia de 2.5 μ M de IM para posteriormente evaluar el número células total. La figura representa el promedio y desviación estandar de tres experimentos independientes $P < 0.05$.

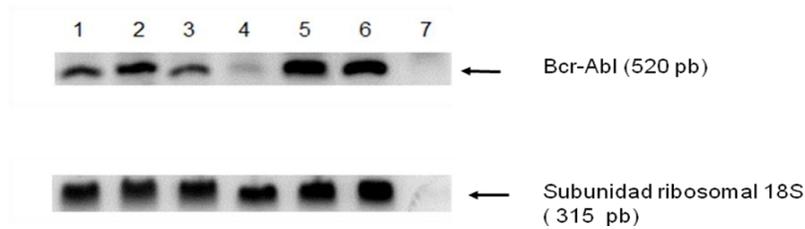


Figura 28.- Efecto de IM en la expresión de BCR/ABL en células troncales y progenitoras hematopoyéticas. Las células troncales hematopoyéticas CD34+CD38-Lin- y células progenitoras hematopoyéticas CD34+CD38+Lin- de LMC fueron cultivadas en medio StemSpan suplementados con citocinas en ausencia (control) o presencia de 2.5 μ M de IM por 48 horas, para posteriormente evaluar la expresión del transcrito para BCR/ABL mediante PCR anidado. La figura muestra una imagen representativa en donde en cada carril se encuentra lo siguiente: 1. CTH tiempo cero. 2. CPH tiempo cero. 3. CTH control, 4. CTH IM. 5. CPH control. 6. CPH IM. 7. Control negativo (agua como templado).

Perfiles de expresión génica de células troncales de LMC vs células troncales de MON.

Después de haber analizado las características generales de la población y de haber realizado la extacción de ARN de las muestras procesadas, se seleccionaron las 5 muestras de MON y 5 muestras de LMC sobre las cuales se realizaron los microarreglos de expresión. Con esta selección se tenían representadas las siguientes poblaciones y condiciones de cultivo:

- Células troncales con fenotipo CD34+CD38-lin- recién obtenidas y purificadas (Tiempo cero).
- Células progenitoras con fenotipo CD34+CD38-lin- recién obtenidas y purificadas (Tiempo cero).
- Células progenitoras con fenotipo CD34+CD38-lin- cultivadas en ausencia de IM durante 48 horas.
- Células progenitoras con fenotipo CD34+CD38-lin- cultivadas en presencia de 2.5 μ M de IM durante 48 horas.

En la tabla 4 se enlistan las muestras procesadas, los valores de cuantificación y los valores del número de integridad de RNA (RIN) de cada una de las muestras. Para el estudio de expresión por microarreglos se consideraron muestras con un RIN mayor a 7.

Tabla 4.- Lista de muestras de LMC y MON que fueron procesadas por microarreglos.

NÚMERO	MUESTRA	CODIGO DE MUESTRA	RIN	[] ng/ul	A260/280
1	LMC 47/11 34+38- T0	LMTR47T0	8.7	124	1.88
2	LMC 47/11 34+38+ T0	LMPR47T0	9.2	182	1.75
3	LMC 47/11 34+38- Ctrl48	LMTR47CT	10	104	1.85
4	LMC 47/11 34+38- IM48	LMTR47IM	9.6	52	1.9
5	LMC 47/11 34+38+ Ctrl48 1	LMPR47CT	8.8	204	1.85
6	LMC 47/11 34+38+ IM48 1	LMPR47IM	10	180	1.84

23	MON 7/12 34+38- T0	MO07TRT0	9	131	1.88
24	MON 7/12 34+38+ T0	MO07PRT0	8.9	146	1.91
25	MON 7/12 34+38+ CTRL48	MO07PRCT	8.7	201	1.92
26	MON7/12 34+38+ IM48	MO07PRIM	7.4	186	1.92
35	LMC 35/13 34+38- T0	LMTR35T0	6.4	61	1.8
36	LMC 35/13 34+38+ T0	LMPR35T0	8	103	1.93
37	LMC 35/13 34+38+ CTRL 48	LMPR3513CT	9.3	117	1.99
38	LMC 35/13 34+38+ IM48	LMPR3513IM	9	87	1.96
39	MON 36/13 34+38- T0	MOTR36T0	6.5	62	2
40	MON 36/13 34+38+ T0	MOPR36T0	7.3	89	1.9
41	MON 36/13 34+38+ CTRL48	MO36PRCT	8.1	172	1.98
42	MON 36/13 34+38+ IM48	MO36PRIM	8	120	2.01
43	LMC 222 34+38- T0	LMTR222T0	7	85	1.74
44	LMC 222 34+38+ T0	LMPR222T0	8	106	1.89
45	LMC 222 34+38+CTRL48	LMPR222CT	8.8	86	1.75
46	LMC 222 34+38+IM48	LMPR222IM	8.6	75	1.69
47	LMC 09/14 34+38- T0	LMTR914T0	9.1	48	1.79
48	LMC 09/14 34+38+ T0	LMPR914T0	9	85	1.96
49	LMC 09/14 34+38+CTRL48	LMPR914CT	10	63	1.82
50	LMC 09/14 34+38+IM48	LMPR914IM	9.5	77	1.98
51	LMC 14/14 34+38- T0	LMTR1414T0	9.7	71	1.94
52	LMC 14/14 34+38+ T0	LMPR1414T0	9.6	83	1.86
53	LMC 14/14 34+38+ Ctrl48	LMPR1414CT	9.9	83	1.77
54	LMC 14/14 34+38+ IM48	LMPR1414IM	9.7	77	1.86
59	MON 01/14 34+38- T0	MO114TRT0	8.8	90	1.83
60	MON 01/14 34+38+ T0	MO114PRT0	8.5	98	1.89
61	MON 01/14 34+38-CTRL48	MO114RCT	9.6	84	1.87

62	MON 01/14 34+38-IM48	MO114PRIM	9.5	70	1.83
63	MON 09/14 34+38- T0	MO914TRT0	8.8	114	1.91
64	MON 09/14 34+38+ T0	MO914PRT0	8	74	1.84
65	MON 09/14 34+38-CTRL48	MO914RCT	9.9	120	1.91
66	MON 09/14 34+38-IM48	MO914PRIM	10	86	1.92
67	MON 15/14 34+38- T0	MO1514TRT0	8.5	119	1.94
68	MON 15/14 34+38+ T0	MO1514PRT0	8.9	83	1.86
69	MON 15/14 34+38-CTRL48	MO1514RCT	9.2	105	1.77
70	MON 15/14 34+38-IM48	MO1514PRIM	7.1	75	1.78

Tabla 4.- La tabla indica los valores de RIN (Número de Integridad de ARN por sus siglas en inglés) y las concentraciones de ARN para cada muestra procesada.

Para evaluar los perfiles de expresión en células troncales y progenitoras hematopoyéticas normales y de LMC purificadas y analizadas como anteriormente se mencionó, se utilizó la plataforma Affymetrix Human Gene 1.0 ST array analizando la expresión de 29,096 genes.

El análisis comparativo de las células troncales (CD34+CD38-Lin-) de LMC y MON mostró la expresión diferencial de 584 genes (Figura 29). De estos genes diferencialmente expresados, 340 están sobreexpresados y 244 subexpresados mismos que fueron analizados utilizando el programa de enriquecimiento DAVID (Figura 30).

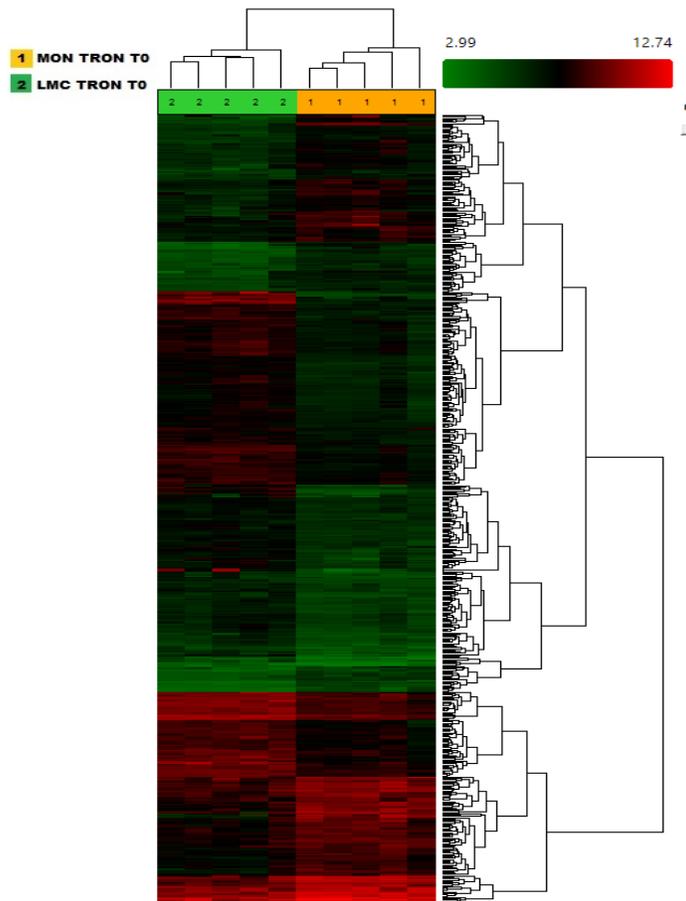


Figura 29.- Genes diferencialmente expresados entre células troncales de LMC y MON. Se muestra un clúster jerárquico de la comparación entre muestras de células troncales de leucemia y médula ósea normal. Comparando ambas condiciones encontramos la expresión diferencial de 584 genes. El análisis se realizó utilizando la consola de análisis de transcriptomas de Affymetrix (TAC) considerando una tasa de cambio de 2.0 y un valor de $P < 0.05$. Las muestras empleadas se encuentran en columnas, los genes en filas el color rojo indica sobre-expresión, verde sub-expresión y negro sin cambio.

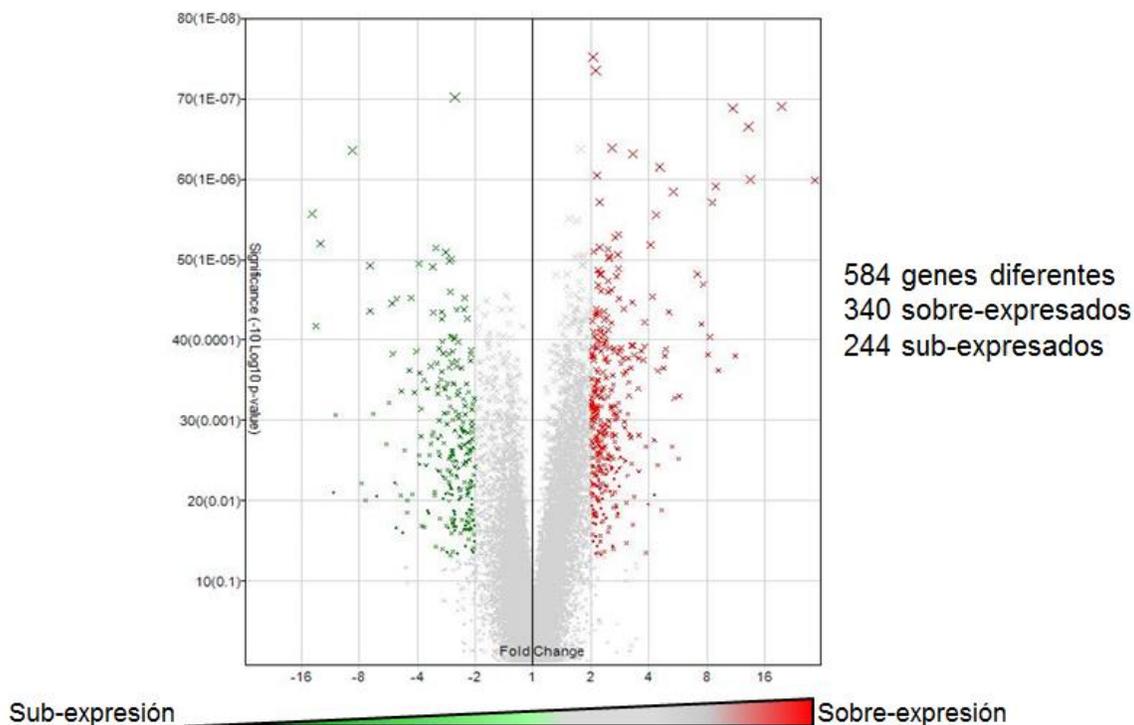


Figura 30.- Genes diferencialmente expresados entre células troncales de LMC y MON. El gráfico de volcán muestra los 584 genes diferencialmente expresados entre células troncales de LMC T0 y sus contrapartes normales, 340 sobre-expresados (rojo) y 244 sub-expresados (verde). El análisis se llevó a cabo utilizando la consola de análisis de transcriptomas de Affymetrix considerando una tasa de cambio de 2 y un valor de $P < 0.05$.

Para el caso de los genes sobre-expresados por células troncales CD34+CD38-Lin- de LMC, las vías más representadas son: “procesos metabólicos del ADN”, categoría en la que se incluyen genes como *HMGB2*, *XRCC2*, *BLM*, *CHEK1*, *TYMS*, *CDC45*, *POLE2*, *FANCI*, *FANCF*, *POLQ*, *HELLS*, *CDC7*, *GINS1*, *GINS2*, *CDC6*, *MCM4*, *BRCA1*, *RAD51* que tienen que ver principalmente con monitoreo y reparación de daño al ADN. La segunda categoría más representada corresponde a “ciclo celular” con genes como *HAUS6*, *KNTC1*, *CHEK1*, *CDC45*, *CASP8AP2*, *FANCI*, *FBXO5*, *SKA3*, *HELLS*, *CDC7*, *CDC6*, *KIF11*, *GMNN*, *SGOL1*, *RBL1*, *CASC5*, indicativo de que las células troncales de LMC se encuentran más activas en el ciclo celular en comparación con sus contrapartes normales. En tercer lugar se ubican los procesos relacionados con condensación del cromosoma con genes como: *MAD2L1*, *SGOL1*, *KNTC1*, *CASC5*, *SKA3*, *CENPK*, *MLF1IP*, *NUP43* lo cual

sugiere que los mecanismos que tiene que ver con remodelación de la cromatina se encuentran con mayor actividad en las células troncales de LMC (Figura 31).

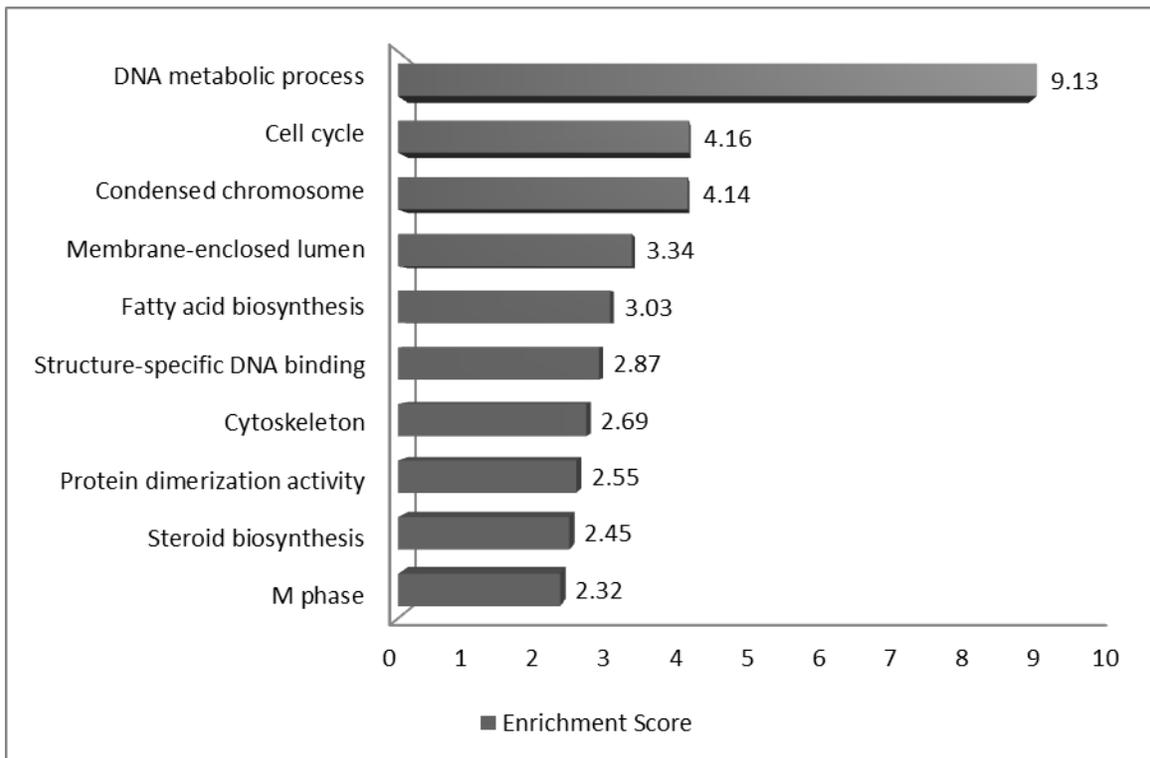


Figura 31.- Anotación funcional en categorías de Gene Ontology de los genes sobre-expresados por células troncales de LMC vs MON. El gráfico muestra la anotación funcional de los genes sobre expresados en categorías de Gene Ontology, entre céls troncales de LMC T0 y sus contrapartes normales, utilizando el progama DAVID. Se muestra la escala de enriquecimiento determinada por el programa.

Para el caso de los genes sub-expresados las vías más representadas son: “Regulación negativa de la transcripción” con genes como *KLF10*, *KLF11*, *ARID5A*, *ZHX2*, *PRDM16*, *ID2*, *ID1*, *BCL3*, *PER1*, *BCL6*, *SKIL* lo que puede ser indicativo de la pérdida de factores de transcripción que regulan de manera negativa procesos como ciclo celular y avance en el proceso de diferenciación. En segundo lugar genes relacionados con “proteínas con dominios de tipo Fibronectina” como *IL12RB2*, *IGF1R*, *SNED1*, *IL6ST*, *KAL1*, *SDK2*, *PTPRS*, *MPL*,

ABI3BP. En tercer lugar se encuentra “regulación de la actividad transcripcional” con genes como *HLF*, *NR3C2*, *RORA*, *TSC22D3*, *TSC22D2*, *BCL3*, *BCL6*, *RARA*, *BHLHE41*, *NFIL3*, *ETV3*, *PLAG1*, *KLF5*, indicativo de la pérdida de regulación negativa y de otros factores de transcripción (Figura 32).

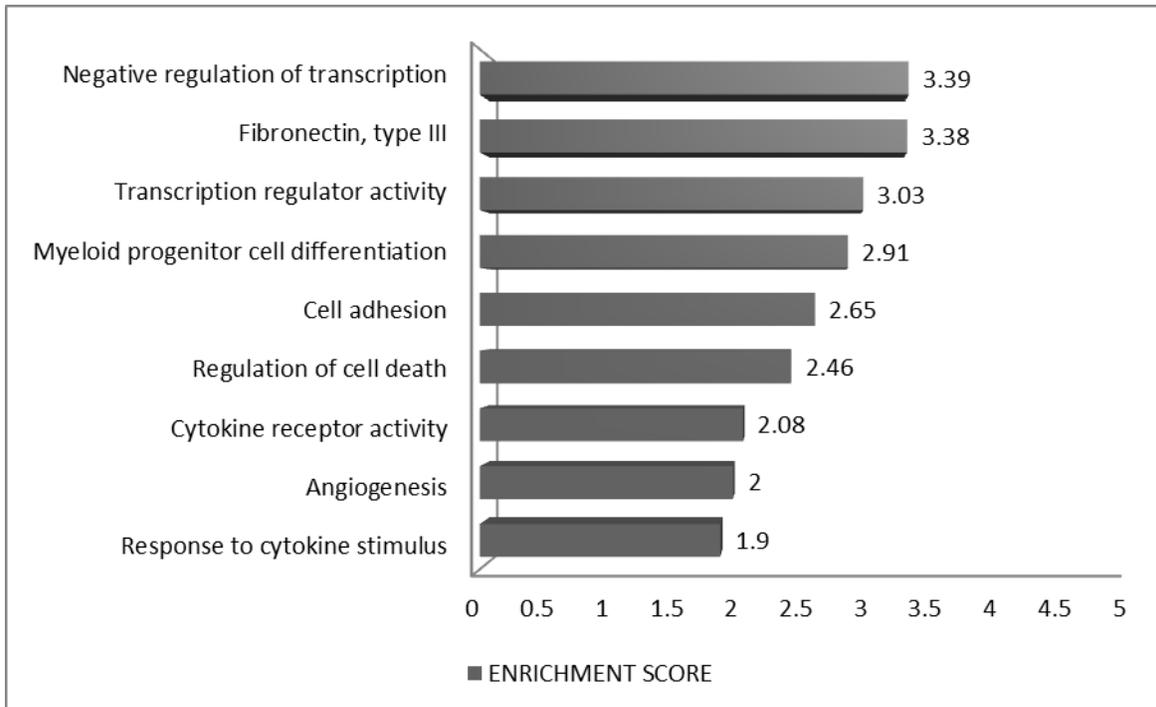


Figura 32.- Anotación funcional en categorías de Gene Ontology de los genes sub expresados por células troncales de LMC vs MON. El gráfico muestra la anotación funcional de los genes sub expresados en categorías de Gene Ontology, entre céls troncales de LMC T0 y sus contrapartes normales, utilizando el programa DAVID. Se muestra la escala de enriquecimiento determinada por el programa.

Al analizar exclusivamente los 10 genes más sobre-expresados, encontramos que en primer lugar se encuentra *GAS2*, un gen que tiene que ver con cambios en el citoesqueleto, *RXFP1*, receptor importante durante el proceso de reproducción y durante el parto, su ligando funciona como vasodilatador. *MAMDC2*, cuya función no está determinada aún. *PIEZO2* y *CACNA1D* son canales iónicos que no se habían reportado previamente en células troncales hematopoyéticas ni leucémicas, al igual que *RXFP1* y parecen posibles candidatos como marcadores membranales asociados a células troncales leucémicas. *DPP4*, rompe la interacción entre *CXCR4* y *CXCL12*, la cual es importante para el mantenimiento

de la CTH en su nicho. *PTPRD* es un miembro de la familia de la proteína tirosina fosfatasa (PTP). Se sabe que los PTP son moléculas de señalización que regulan una variedad de procesos celulares, incluidos el crecimiento celular, la diferenciación, el ciclo mitótico y la transformación oncogénica, algo interesante es que *PTPRD* puede inducir bidireccionalmente la diferenciación pre y post sináptica de neuronas al mediar la interacción con *IL1RAP* e *IL1RAPL1* transinápticamente, *IL1RAP* es una molécula también sobreexpresada en este estudio y que ha sido reportada como marcador exclusivo de células troncales leucémicas (Jaras et al., 2010; Tabla 5).

Gene Symbol	Fold Change	ANOVA p-value	FDR p-value	Description
GAS2	29.11	0.000001	0.002113	growth arrest-specific 2
RXFP1	19.5	1.24E-07	0.000758	relaxin/insulin-like family peptide receptor 1
MAMDC2	13.39	9.97E-07	0.002113	MAM domain containing 2
PIEZO2	13.15	2.22E-07	0.001076	piezo-type mechanosensitive ion channel component 2
HPGDS	11.16	0.000157	0.020181	hematopoietic prostaglandin D synthase
CPA3	9.17	0.00024	0.023154	carboxypeptidase A3 (mast cell)
DPP4	8.52	0.000002	0.003124	dipeptidyl-peptidase 4
PTPRD	8.28	0.000091	0.017957	protein tyrosine phosphatase, receptor type, D
CACNA1D	8.05	0.000151	0.02005	calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1D subunit
MSMO1	7.66	0.00002	0.010612	methylsterol monooxygenase 1
ETV3	-7.03	0.000044	0.013483	ets variant 3
PCDH9	-7.05	0.000012	0.008027	protocadherin 9
NR4A1	-7.39	0.00985	0.110612	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1
METTL24	-7.77	0.006062	0.088629	methyltransferase like 24
PLAG1	-8.69	4.34E-07	0.001403	pleiomorphic adenoma gene 1
SKIL	-10.62	0.000869	0.037752	SKI-like oncogene
FIGN	-10.91	0.00784	0.099114	fidgetin
FAM19A2	-12.68	0.000006	0.007243	family with sequence similarity 19 (chemokine (C-C motif)-like), member A2
EMP1	-13.37	0.000066	0.015424	epithelial membrane protein 1

ABI3BP	-14.06	0.000003	0.004017	ABI family, member 3 (NESH) binding protein
---------------	--------	----------	----------	---

Tabla 5.- La tabla muestra los 10 genes más sobre (naranja) y sub (verde) expresados entre células troncales de LMC CD34+CD38-Lin- a T0 y sus contrapartes normales. El análisis se llevó a cabo utilizando la consola de análisis de transcriptomas de Affymetrix considerando una tasa de cambio de 2 y un valor de $P < 0.05$. Se muestra el valor de tasa de cambio (fold change) con respecto a su contraparte normal, así como los valores de ANOVA y FDR.

En el caso de los genes menos expresados por las células troncales de LMC en comparación con las células troncales de MON encontramos a ABI3BP, el cual es regulador de la proliferación y diferenciación de células troncales mesenquimales y progenitoras cardíacas. Se ha reportado *EMP1* tiene una actividad antiproliferativa en cáncer de mama y cáncer colorectal asociándose con una baja supervivencia a 5 años en cáncer gástrico. *FIGN*, que codifica para la proteína fidgetina que está implicada en la ruptura y despolimerización de microtubulos, y en el alargamiento de centrosomas y microtúbulos astrales ocasionando, posiblemente alteraciones en el proceso de división celular. *SKIL* es otro de los genes con baja expresión que ha sido reportado como un represor en los promotores de genes con elementos de respuesta a *TGFβ*. *PLAG1* se reportó por primera vez en adenoma pleiomórfico de glándulas salivales y su sobre-expresión, rearrreglos y mutaciones han sido asociadas a proliferación y transformación (Tabla 5).

Perfiles de expresión génica de células progenitoras de LMC vs células progenitoras de MON.

Al hacer la comparación de los perfiles de expresión génica entre células progenitoras (CD34+CD38+lin-) de LMC vs células progenitoras de MON encontramos la expresión diferencial de 198 genes agrupándose las 5 muestras de células progenitoras de LMC en un clúster y las 5 muestras de células progenitoras de MON en otro clúster de acuerdo a la similitud de sus perfiles de expresión (Figura 33).

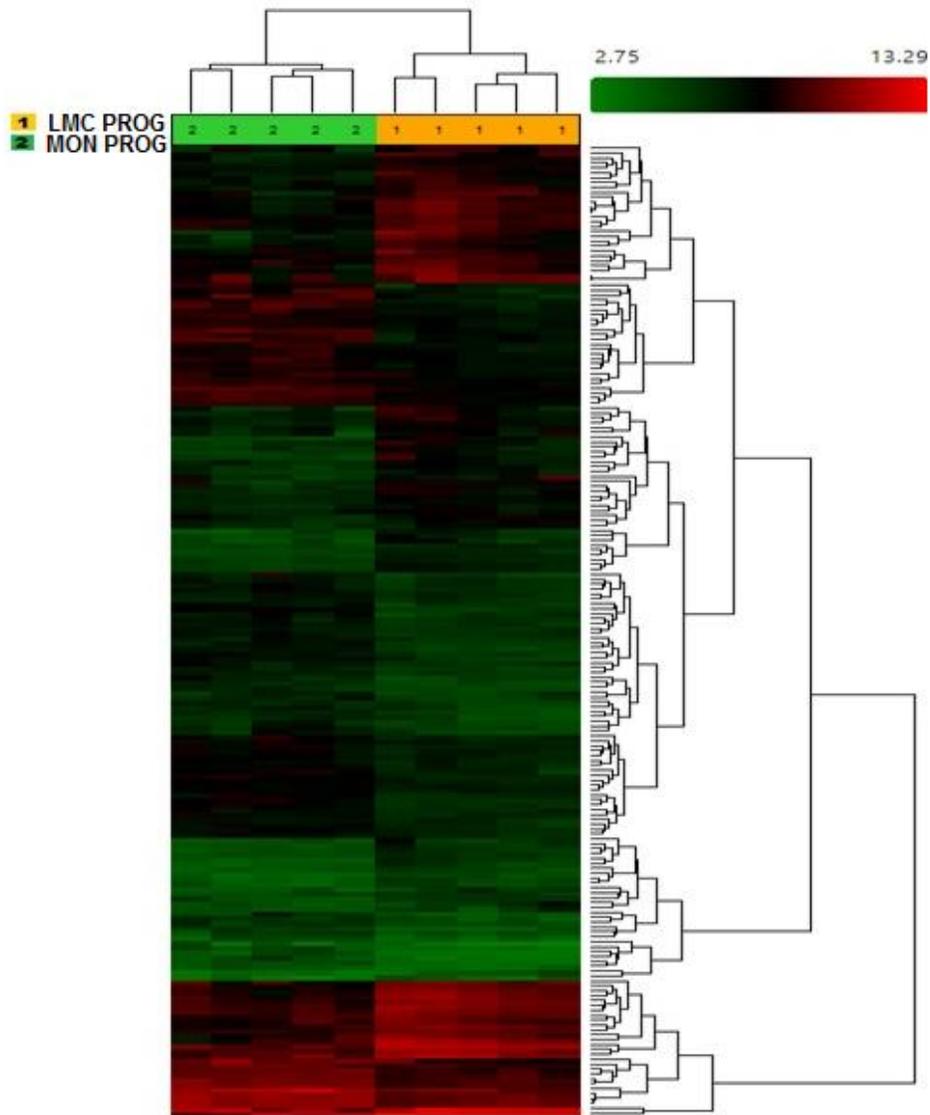


Figura 33.- Genes diferencialmente expresados entre muestras de células progenitoras CD34+CD38+Lin- de LMC y MON. Se muestra el cluster jerárquico que compara los niveles de expresión de genes de ambas condiciones. Se encontró la expresión diferencial de 198 genes. El análisis se realizó utilizando la consola de análisis de transcriptomas de affymetrix (TAC) considerando una tasa de cambio de 2.0 y un valor de $P < 0.05$. Las muestras empleadas se encuentran en columnas, los genes en filas.

De los 198 genes diferencialmente expresados por las células progenitoras de LMC, 101 estuvieron sobre-expresados y 97 subexpresados utilizando una tasa de cambio de 2 como punto de corte (Figura 34).

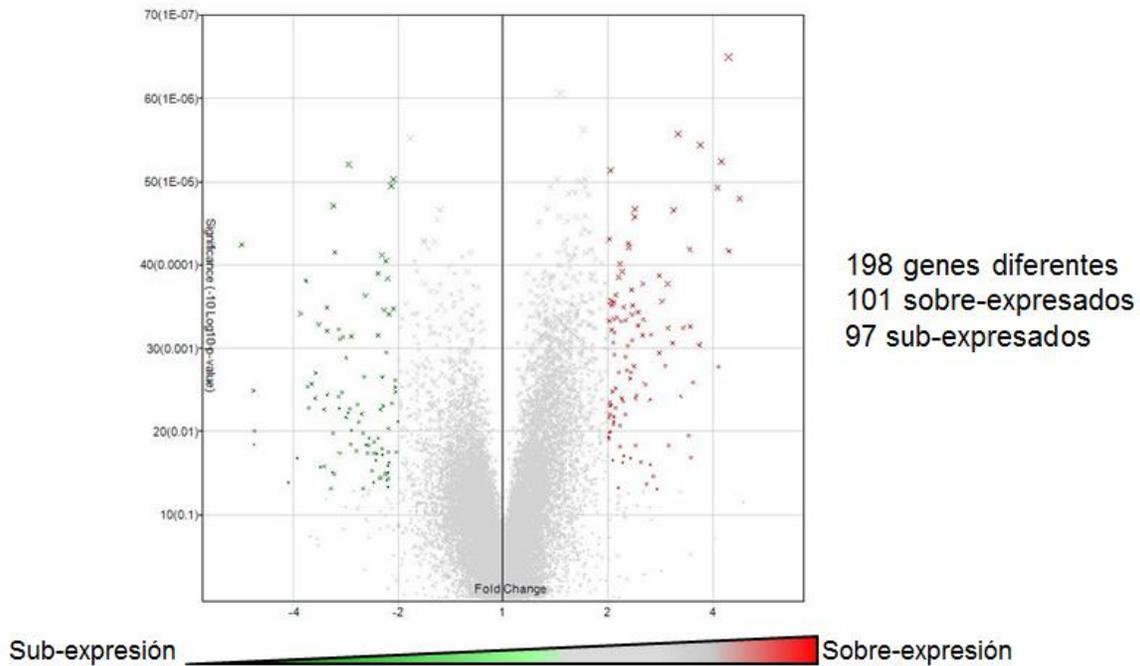


Figura 34.- Genes diferencialmente expresados entre células progenitoras CD34+CD38+Lin- de LMC y MON. El gráfico de volcán muestra los 198 genes diferencialmente expresados, 101 sobre-expresados (rojo) y 97 sub-expresados (verde), entre células progenitoras de LMC T0 y sus contrapartes normales, El análisis se llevó a cabo utilizando la consola de análisis de transcriptomas de Affymetrix considerando una tasa de cambio de 2 y un valor de $P < 0.05$.

Al hacer el análisis de enriquecimiento de vías utilizando el programa DAVID se encontró que la vía más representada para los genes sobre-expresados por células progenitoras de LMC fue “Biosíntesis de colesterol” categoría que incluye genes como *HMGCR*, *CYP51A1*, *DHCR7*, *DHCR24* y están implicados en distintos puntos de la vía de síntesis de colesterol. La segunda vía más representada es “Glicoproteína” con genes como *GYPB*, *GYPE*, *GCNT2*, *MAMDC2*, *TSPAN2*, *ENPP2*, *LEPR*, *TMEM156*, *CCL5*, *MANSC1*, *CFHR1*, *VWDE*, *TEK*, *KCNK5*, *GALC*, *CFH*, *SCN9A*, *CALCRL*, *SLC4A4*, *ANGPT2*, *GPR174*, *RXFP1*, *HSPG2*, *KLRG1*, *ST8SIA6*, *CD40LG*, la mayoría de estos genes se encuentran a nivel de membrana y sus funciones son diversas. La tercera vía más representada por los genes sobre-expresados es “Procesos metabólicos del colesterol” con genes como *HMGCR*, *CYP51A1*, *DHCR7*, *OSBPL6*, *LEPR*, *DHCR24* (Figura 35).

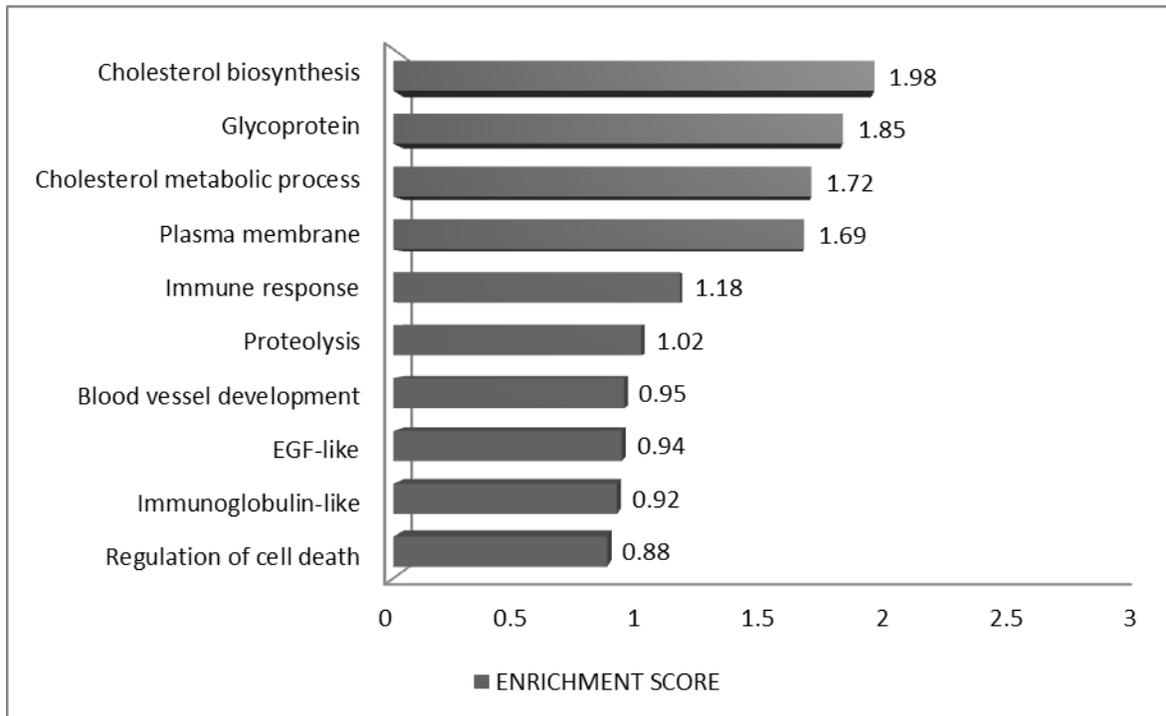


Figura 35.- Anotación funcional en categorías de Gene Ontology de los genes sobre-expresados por células progenitoras CD34+CD38+ Lin- de LMC vs MON. El gráfico muestra la anotación funcional de los genes sobre-expresados en categorías de Gene Ontology, entre células progenitoras de LMC T0 y sus contrapartes normales, utilizando el programa DAVID. Se muestra la escala de enriquecimiento determinada por el programa.

Con respecto a las vías más representadas por los genes sub-expresados en primer lugar se encuentra “Regulación negativa de la unión al ADN” con genes como *ID2*, *ID1*, *SMAD7*, *NLRP3*, *TRIB1* los cuales interfieren en la unión de algunos factores de transcripción al ADN impidiendo su señalización, sugerente de la pérdida de la regulación a nivel transcripcional que se da en los progenitores leucémicos. La segunda vía más representada es “Adhesión Celular” con genes como *ICAM1*, *SELP*, *CDH9*, *PKP2*, *SELL*, *SDK2*, *NINJ1*, *CDH2*, *MFAP4*, *NEGR1*, *CDH10*, los cuales participan en interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular indicativo de la pérdida de adhesión de la célula progenitora leucémica tanto con células de su nicho como con proteínas, algo común dado la salida de estas células a la circulación. La tercera vía más representada es “Respuesta de Defensa” con genes como: *SELP*, *RNASE3*, *CXCL2*, *MNDA*, *LYZ*,

BCL3, *NLRP3*, *CD180*, *BLNK*, *CXCL10*, que codifican moléculas implicadas en la respuesta inmune (Figura 36).

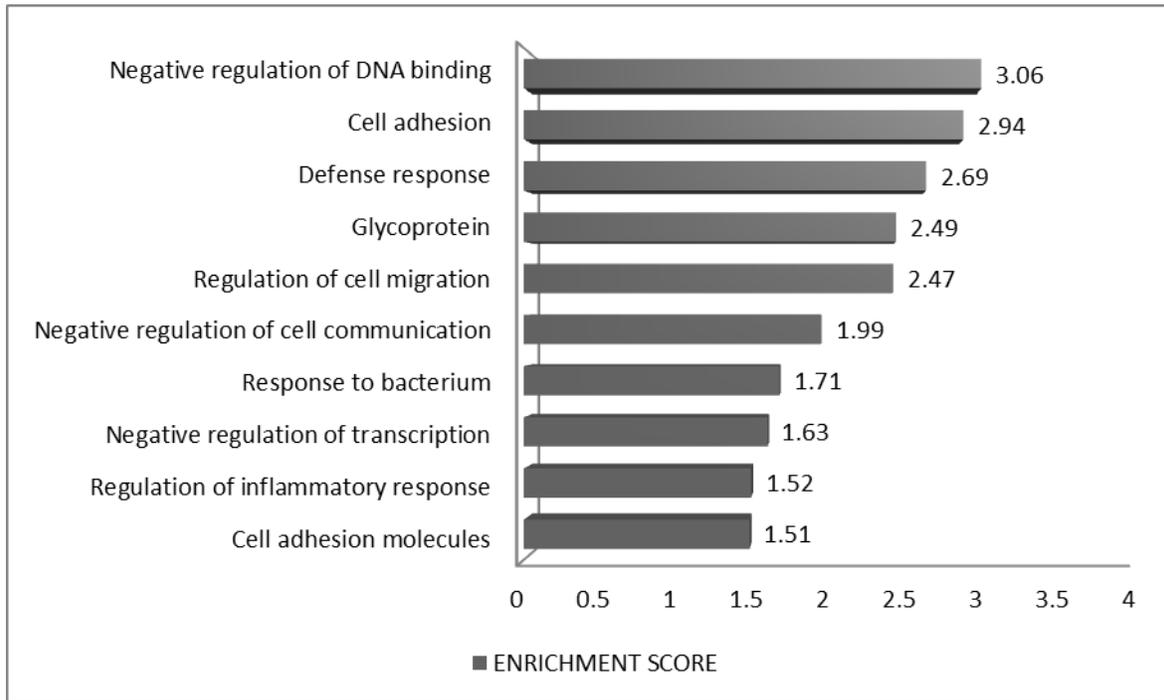


Figura 36.- Anotación funcional en categorías de Gene Ontology de los genes sub-expresados por células progenitoras de LMC vs MON. El gráfico muestra la anotación funcional de los genes sub-expresados en categorías de Gene Ontology, entre células progenitoras de LMC T0 y sus contrapartes normales, utilizando el programa DAVID. Se muestra la escala de enriquecimiento determinada por el programa.

Al analizar los 10 genes más sobre-expresados en la membrana de células progenitoras de LMC, encontramos en primer lugar a *RXFP1* que también fue encontrado en la fracción troncal. En segundo lugar a *SCN9A* que codifica un canal de sodio dependiente de voltaje implicado en la nocicepción principalmente en dolor asociado a inflamación (Cox et al., 2006). En tercer lugar *PIEZO2* y *MAMDC2* al igual que lo que sucedió en el análisis de células troncales de LMC. *TSPAN2* que codifica a la tetraspanina 2 caracterizada por la presencia de 4 dominios hidrofóbicos e implicada en invasión y motilidad celular en cáncer de pulmón (Otsubo et al., 2014). *KLRG1* codifica para el receptor tipo lectina de células Natural Killer, juega un papel inhibitor sobre las células asesinas naturales

(NK) y las funciones de las células T, al unirse a sus ligandos que no son del MHC. Puede mediar la pérdida del auto-reconocimiento uniéndose a sitios altamente conservados en cadherinas N, E y R (Li et al., 2009). *LEPR*, codificante para el receptor de la hormona leptina, miembro de la familia de receptores gp130 que estimulan la transcripción via STAT, está implicado en la regulación del metabolismo de grasas (Thiagarajan et al., 2017). *RAB27B* es otro de los genes sobre-expresados y codifica para una proteína de membrana miembro de la familia RAS, tiene que ver con el tráfico y fusión de vesículas y ha sido implicado en invasión, proliferación, apoptosis y resistencia a quimioterapia (Li et al., 2017). *GYPB* codificante para la glicoforina B una de las mayores glicoproteínas expresadas en la membrana del eritrocito, curiosamente de expresión restringida en la médula ósea (Blumenfeld y Huang, 1997). *FCGR2A* codifica para un receptor de membrana encontrado en células fagocíticas como macrófagos y neutrófilos (Takai, 2005; Tabla 6).

En el caso de los genes sub-expresados a nivel de membrana por las células progenitoras de LMC en comparación de sus contrapartes de MON, encontramos a *KCNA3* con menor expresión y cuyo producto forma un canal de potasio dependiente de voltaje con funciones en proliferación y activación de linfocitos T; este gen se ha encontrado metilado en cáncer colorectal (He et al., 2017). *EMP1* es el segundo gen menos expresado, codifica para la proteína epitelial de membrana 1 y se ha implicado como factor de pronóstico pobre en LLA, regulando migración, proliferación y adhesión celular (Ariès et al., 2014). *MPEG1* es el tercer gen con menos expresión codifica a la perforina 2, se le asignó el nombre al gen por la expresión de esta proteína en estadios terminales de la diferenciación de macrófagos, sin embargo también se expresa en fibroblastos, su actividad principal es antibacteriana (McCormack y Podack, 2015). Otro de los genes con menor expresión fue *GRASP* codificante para la proteína de anclaje para el receptor general de fosfoinositol 1, el cual juega una función importante en el tráfico intracelular y contribuye a la organización macromolecular de los receptores de glutamato metabotrópicos (Venkataraman et al., 2012). *ICAM1* es el siguiente gen con menos expresión, codifica para una proteína de unión en la membrana de células endoteliales y células del sistema inmune, se une a integrinas y establece

contactos célula-célula, también puede establecer contacto célula-matriz extracelular, la disminución de esta molécula de adhesión ha reducido la capacidad de migración e invasión de líneas celulares de cáncer de mama (Di et al., 2016). *CDH2* es otro gen sub-expresado por CPH de LMC, codifica para la proteína de adhesión dependiente de calcio N-cadherina, la cual se expresa en CPH y es importante para la interacción con células estromales mesenquimales (Wein et al., 2010).

El siguiente gen con menor expresión es CD180, que codifica a una proteína que tiene repeticiones extracelulares ricas en leucina (LRR) y una cola citoplásmica corta. Las LRR extracelular se asocian con una molécula llamada MD-1 y forman el complejo receptor de la superficie celular, RP105 / MD-1. Pertenece a la familia de receptores de patógenos, receptores tipo Toll (TLR). RP105 / MD1, trabajando en conjunto con TLR4, controla el reconocimiento de células B y la señalización de lipopolisacáridos (LPS) (Miura et al., 1998). El gen *IL12RB2* también se encontró subexpresado, la proteína codificada por este gen es una proteína transmembrana tipo I identificada como una subunidad del complejo receptor de interleucina 12. Se demostró que la coexpresión de esta y de las proteínas *IL12RB1* conduce a la formación de sitios de unión de IL-12 de alta afinidad y a la reconstitución de la señalización dependiente de IL-12. La expresión de este gen está regulada positivamente por el interferón gamma en las células Th1 y desempeña un papel en la diferenciación de las células Th1 (Rogge et al., 1997), se ha encontrado metilado en adenocarcinoma de pulmón y se ha asociado a un mal pronóstico (Suzuki et al., 2007; Tabla 6).

Gene Symbol	Fold Change	ANOVA p-value	FDR p-value	Description
RXFP1	4.45	3.20E-07	0.009322	relaxin/insulin-like family peptide receptor 1
SCN9A	3.69	0.000004	0.017817	sodium channel, voltage-gated, type IX, alpha subunit
PIEZO2	3.46	0.000546	0.061798	piezo-type mechanosensitive ion channel component 2
MAMDC2	3.18	0.000003	0.017643	MAM domain containing 2
TSPAN2	3.09	0.000022	0.024627	tetraspanin 2
KLRG1	2.86	0.000274	0.055312	killer cell lectin-like receptor subfamily G, member 1
LEPR	2.81	0.000133	0.04407	leptin receptor
RAB27B	2.81	0.001153	0.078273	RAB27B, member RAS oncogene family
GYPB	2.77	0.049514	0.274435	glycophorin B (MNS blood group)
FCGR2A	2.44	0.000534	0.06172	Fc fragment of IgG, low affinity IIa, receptor (CD32)
UGT3A2	-2.73	0.009588	0.1586	UDP glycosyltransferase 3 family, polypeptide A2
IGSF6	-2.74	0.014147	0.186904	immunoglobulin superfamily, member 6
IL12RB2	-2.76	0.005393	0.130062	interleukin 12 receptor, beta 2
CD180	-3.08	0.010447	0.1652	CD180 molecule
CDH2	-3.08	0.00002	0.024627	cadherin 2, type 1, N-cadherin (neuronal)
ICAM1	-3.2	0.003638	0.117911	intercellular adhesion molecule 1
GRASP	-3.27	0.005426	0.130251	GRP1 (general receptor for phosphoinositides 1)-associated scaffold protein
MPEG1	-3.46	0.001987	0.095542	macrophage expressed 1
EMP1	-3.65	0.002875	0.10921	epithelial membrane protein 1
KCNA3	-5.65	0.000057	0.036407	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 3

Tabla 6.- Genes sobre-expresados y sub-expresados a nivel de membrana entre células progenitoras CD34+CD38+Lin- de LMC y MON. La tabla muestra los 10 genes más sobre-expresados y los diez genes más sub-expresados a nivel de membrana, el análisis se realizó mediante la consola de análisis de transcriptomas (TAC) de Affimetrix considerando una tasa de cambio de 2 y un valor de $P < 0.05$.

Los perfiles de expresión génica de células troncales de LMC son más similares a los de células progenitoras de MON que a los de células troncales de MON.

La agrupación jerárquica mostró que las células troncales de LMC son transcripcionalmente más similares a los progenitores de LMC que a sus contrapartes normales. Curiosamente, los perfiles de expresión génica de células progenitoras y troncales de LMC fueron más cercanos a los de progenitores normales, mientras que las células troncales normales mostraron el perfil de expresión más diferente de las cuatro poblaciones de células (Figura 37).

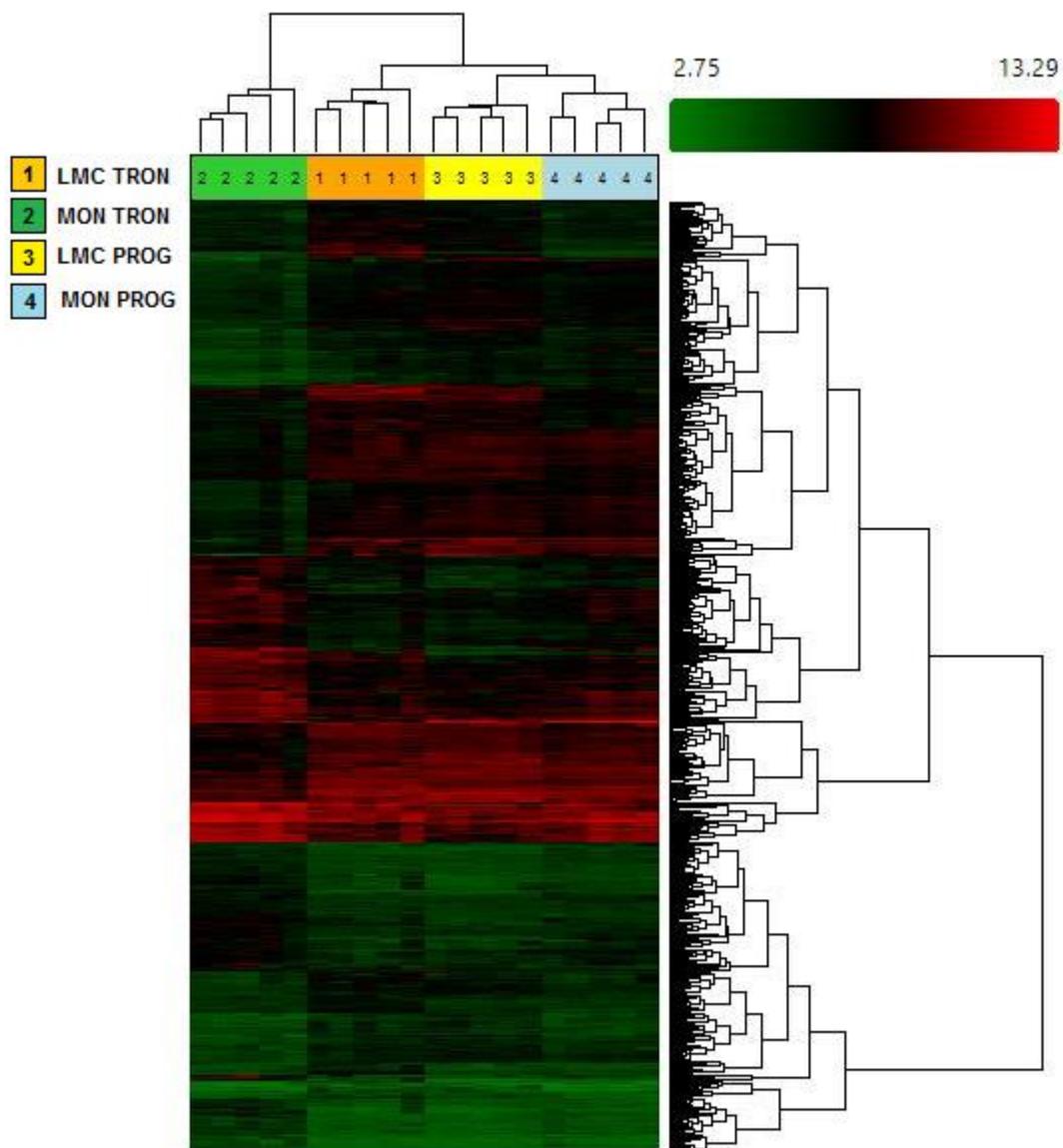


Figura 37.- Genes diferencialmente expresados entre muestras de células troncales CD34+CD38-Lin- y progenitoras CD34+CD38+Lin- de LMC y MON. Se muestra el clúster jerárquico que agrupa a las muestras de acuerdo a su similitud en los niveles de expresión de genes. El análisis se realizó utilizando la consola de análisis de transcriptomas de affymetrix (TAC) considerando una tasa de cambio de 2.0 y un valor de $P < 0.05$. Las muestras empleadas se encuentran en columnas, los genes en filas.

Cuando comparamos los perfiles de expresión génica entre células troncales y progenitoras de muestras normales de médula ósea, encontramos 1,093 genes expresados diferencialmente. De éstos, 476 estaban regulados positivamente en CPH (incluyendo *ABI3BP*, *PREX2*, *HLF*, *EMP1*, *ARG2*, *DLK1* y *CDH7*) y 617 estaban regulados negativamente (incluyendo *CLC*, *MPO*, *CA1*, *CTSG*, *CD36*, *IRF8*, *CPA3* y *ELANE*). Un análisis de comparación similar entre CTH de LMC y CPH mostró 497 genes expresados diferencialmente. De estos, 280 fueron sobreexpresados en la población progenitora (incluyendo *GAS2*, *PREX2*, *HLF*, *IGJ*, *AMICA1*, *CACNA1D* y *HLA-DQA1*), mientras que 217 genes fueron subexpresados (incluyendo *CLC*, *MPO*, *CA1*, *DH1*, *HDC*, *CD40L*, *LEF1* y *MTSS1*) (Figura 38).

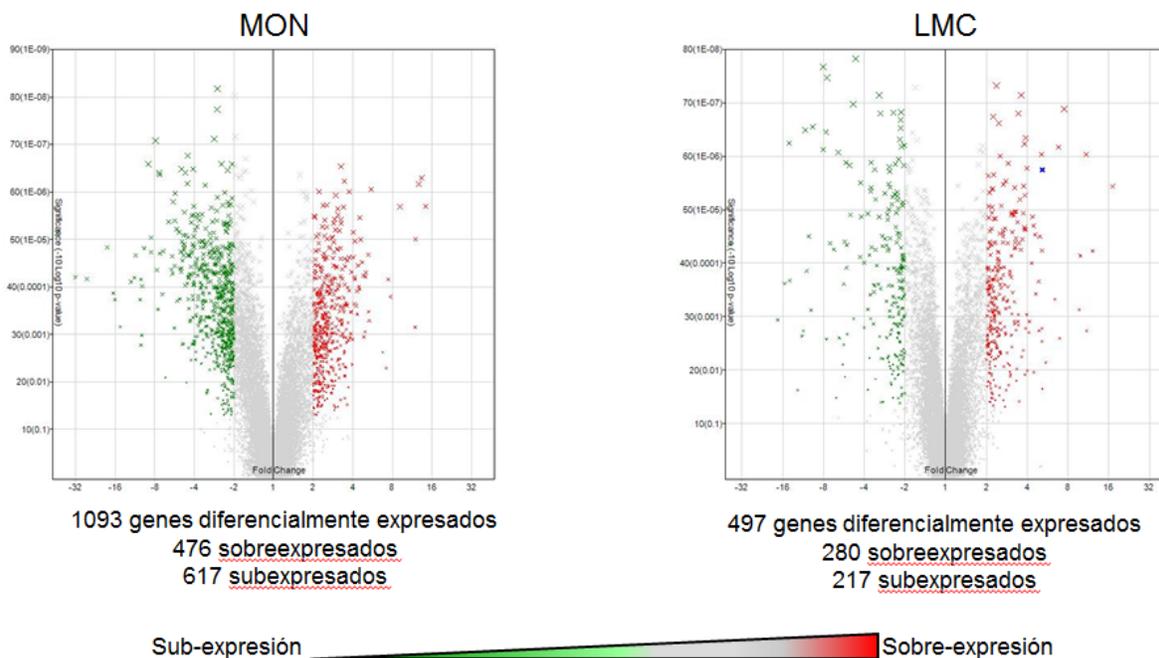


Figura 38.- Comparación de los genes diferencialmente expresados entre células troncales y progenitoras de MON y LMC. El gráfico de volcán muestra 1093 genes diferencialmente expresados entre células troncales y progenitoras de MON, 476 sobre-expresados (rojo) y 617 sub-expresados (verde). 497 genes estuvieron diferencialmente expresados entre células troncales y progenitoras de LMC, 280 sobre-expresados (rojo) y 217 sub-expresados (verde). El análisis se llevó a cabo utilizando la consola de análisis de transcriptomas de Affymetrix considerando una tasa de cambio de 2 y un valor de $P < 0.05$.

Perfiles de expresión génica en células progenitoras CD34+CD38+Lin-de MON y LMC, cultivadas con o sin IM.

La evaluación de los perfiles de expresión génica en células progenitoras CD34+CD38+Lin- de MON y LMC se realizó antes y después del período de cultivo durante 48 horas en medio sin suero suplementado con las citocinas: EPO, TPO, Flt-3L, SF, IL6, IL3, G-CSF y GM-CSF, en ausencia o presencia de 2,5 μM IM. Cuando se cultivaron progenitores derivados de MON en ausencia de IM, se encontraron 1,216 genes expresados diferencialmente (489 regulados positivamente y 727 regulados negativamente) en comparación con las células antes del cultivo. Al analizar las vías más representadas en categorías de GO por los genes sobre-expresados se observó que las rutas más representadas fueron: “Ciclo celular” con genes como *CLSPN*, *CCNE2*, *KIF2C*, *CDCA8*, *GFI1B*, *CDCA2*, *NUP37*, *TUBG1*, *CCNA2*, *ASPM*, *DHCR24*, *CDK1*, *KIF11*, *DCLRE1A*, *MAD2L1*, *CCND3*, *BCAT1*, *BLM*, *SKA2*, *SKA1*, *EXO1*, *CDC20*, *CDKN3*, *SMC2*, *CDC25A*, *BRCA1*, *GSG2*, *CCNB1*, *CCNB2*, los cuales desempeñan funciones en el control del ciclo y la división celular; “Biosíntesis de esteroides” con genes como *TM7SF2*, *EBP*, *MVD*, *HMGCR*, *FDPS*, *HMGCS1*, *LSS*, *C14ORF1*, *ACAT2*, *FDFT1*, *DHCR7*, *MVK*, *IDI1*, *HSD17B7*, *DHCR24* los cuales están implicados principalmente en la biosíntesis de colesterol, y “Segregación cromosómica” con genes como *CENPO*, *RAD51C*, *SGOL2*, *DLGAP5*, *SGOL1*, *KIF18A*, *NDC80*, *CENPE*, *BIRC5*, *SMC2*, *BRCA1*, *SPC25*, *NCAPH*, *MAD2L1* los cuales están implicados en la segregación cromosómica durante el proceso de mitosis y meiosis (Figura 39).

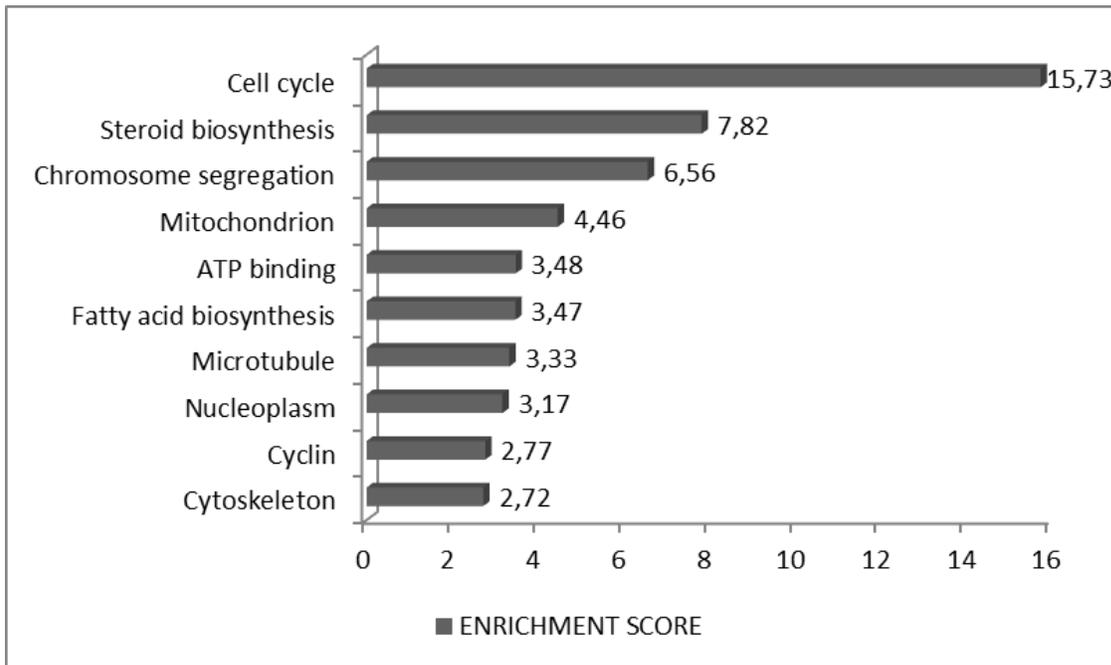


Figura 39.- Anotación funcional en categorías de Gene Ontology de los genes sobre-expresados por células progenitoras CD34+CD38+Lin- de MON cultivadas por 48 h en ausencia de IM, cuando son comparadas con células progenitoras CD34+CD38+Lin- de MON T0. El gráfico muestra la anotación funcional de los genes sobre-expresados en categorías de Gene Ontology, utilizando el programa DAVID. Se muestra la escala de enriquecimiento determinada por el programa.

Cuando se analizaron las vías representadas por los genes sub-expresados fueron: “Regulación de la transcripción” con genes como *FOSL2*, *ARID4A*, *NFKB1*, *NFKB2*, *FOS*, *EPC1*, *PHTF1*, *LRRFIP1*, *NFIL3*, *SIK1*, *EGR1*, *EGR3*, *CSRNP1*, *IRF8*, *IRF1*, *RBM14*, *KLF2*, *KLF4*, *TOB1* con funciones reguladoras de procesos de diferenciación de células mieloides entre otros; “Regulación de la apoptosis” con genes como *IER3*, *MCL1*, *PTGS2*, *STK17B*, *NFKBIA*, *AKAP13*, *SOX4*, *NFKB1*, *PMAIP1*, *GCH1*, *AZU1*, *PLEKHG2*, *RB1CC1*, *TRAF5*, *HIP1* fueron de los procesos biológicos más representados (Figura 40).

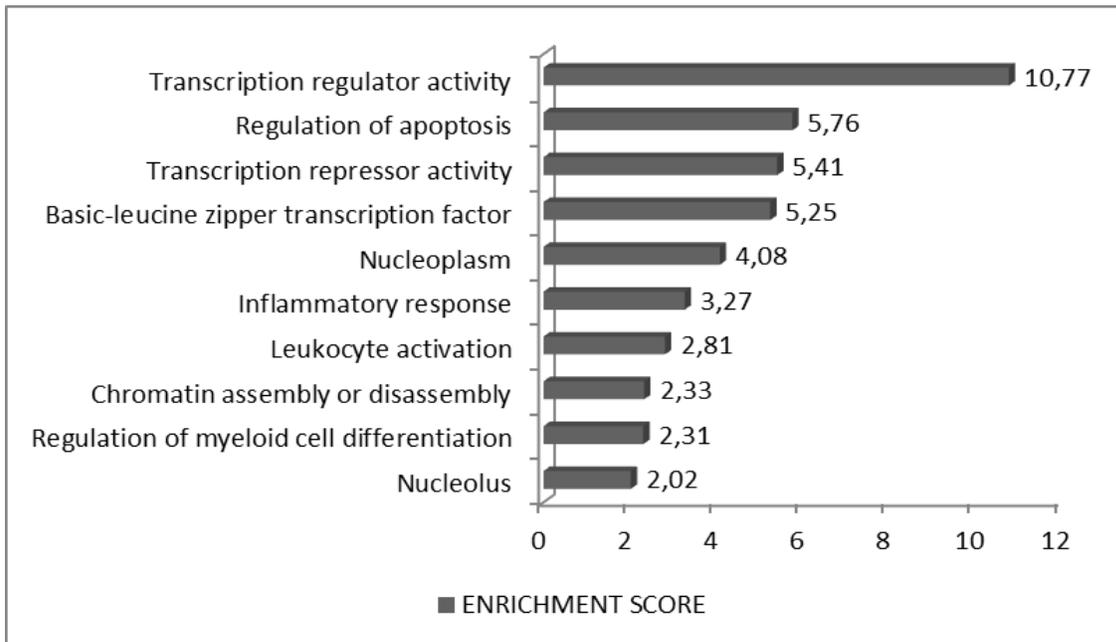


Figura 40.- Anotación funcional en categorías de Gene Ontology de los genes sub-expresados por células progenitoras CD34+CD38+Lin- de MON cultivadas por 48 h en ausencia de IM, cuando son comparadas con células progenitoras CD34+CD38+Lin- de MON T0. El gráfico muestra la anotación funcional de los genes sub-expresados en categorías de Gene Ontology, utilizando el programa DAVID. Se muestra la escala de enriquecimiento determinada por el programa.

Cuando las células progenitoras CD34+CD38-Lin- se cultivaron en presencia de IM, 928 genes se expresaron diferencialmente al final del período de cultivo; 441 fueron sobre-expresados y 487 sub-expresados. Es digno de mención que varias de las rutas y genes más representados en células cultivadas HPC de MON en ausencia de IM también se representaron en células cultivadas en presencia del fármaco (Figuras 41 y 42).

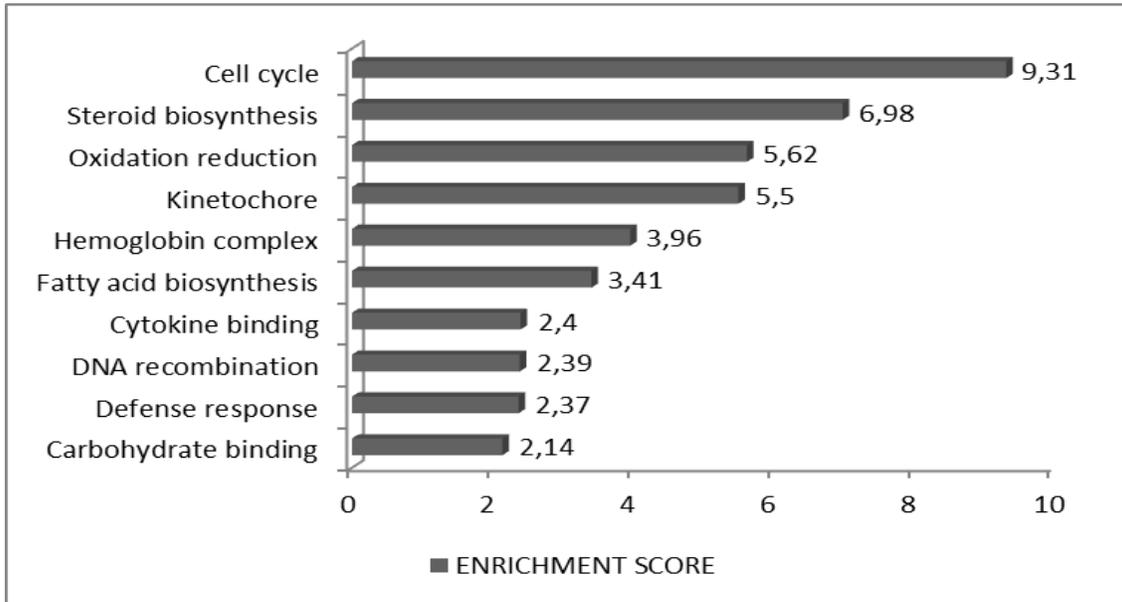


Figura 41.- Anotación funcional en categorías de Gene Ontology de los genes sobre-expresados por células progenitoras CD34+CD38+Lin- de MON cultivadas por 48 hr en presencia de IM cuando son comparadas con células progenitoras CD34+CD38+Lin- de MON T0. El gráfico muestra la anotación funcional de los genes sobre-expresados en categorías de Gene Ontology, utilizando el programa DAVID. Se muestra la escala de enriquecimiento determinada por el programa.

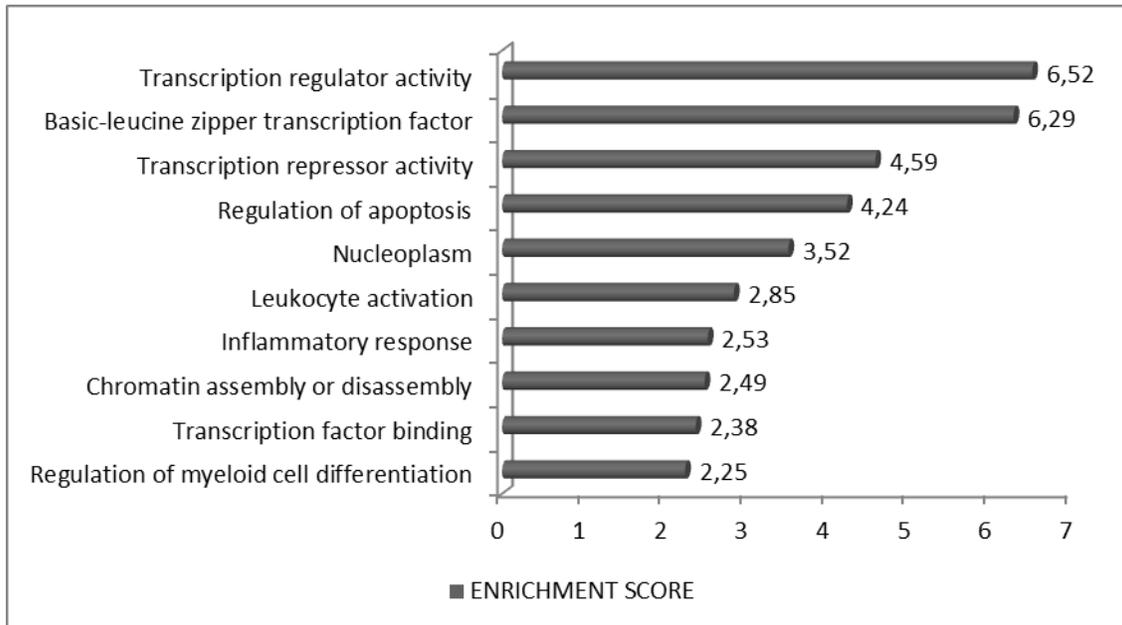


Figura 42.- Anotación funcional en categorías de Gene Ontology de los genes sub-expresados por células progenitoras CD34+CD38+Lin- de MON cultivadas por 48 hr en presencia de IM cuando son comparadas con células progenitoras CD34+CD38+Lin- de MON

T0. El gráfico muestra la anotación funcional de los genes sub-expresados en categorías de Gene Ontology, utilizando el programa DAVID. Se muestra la escala de enriquecimiento determinada por el programa.

Cuando los progenitores derivados de LMC se cultivaron sin IM, se encontró que 498 genes estaban regulados positivamente y 375 estaban regulados negativamente, para un total de 873 genes expresados diferencialmente. Curiosamente, los procesos biológicos que se representaron de manera significativa en el análisis de GO para las células normales también se observaron en las células de LMC. Es decir, en términos de genes regulados positivamente, dichos procesos incluían “Ciclo celular”, “Condensación cromosómica”, “Segregación de cromosomas” y “Unión a ATP” (Figura 43).

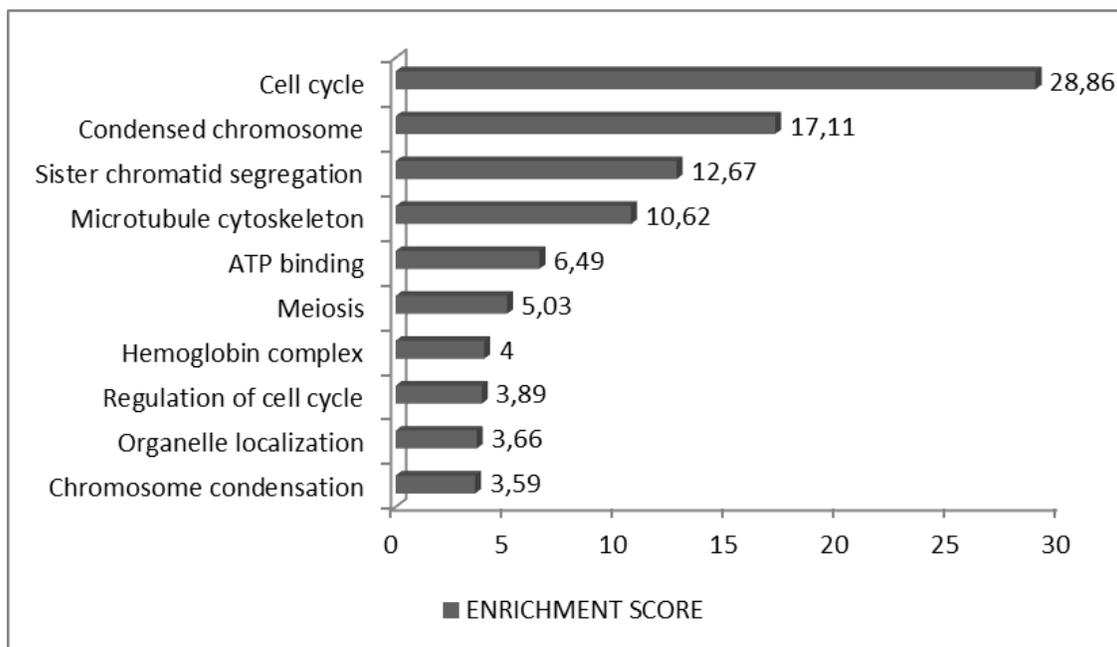


Figura 43.- Anotación funcional en categorías de Gene Ontology de los genes sobre-expresados por células progenitoras CD34+CD38+Lin- de LMC cultivadas por 48 hr en ausencia de IM cuando son comparadas con células progenitoras CD34+CD38+Lin- de MON

T0. El gráfico muestra la anotación funcional de los genes sobre-expresados en categorías de Gene Ontology, utilizando el programa DAVID. Se muestra la escala de enriquecimiento determinada por el programa.

Las vías más representadas por los genes sub-expresados fueron “Regulación de la transcripción” “Regulación de la apoptosis” y “Factor de transcripción cierre de leucina” de igual manera, los procesos biológicos representados significativamente en el análisis de GO para las células normales también se observaron en las células de LMC. (Figura 44).

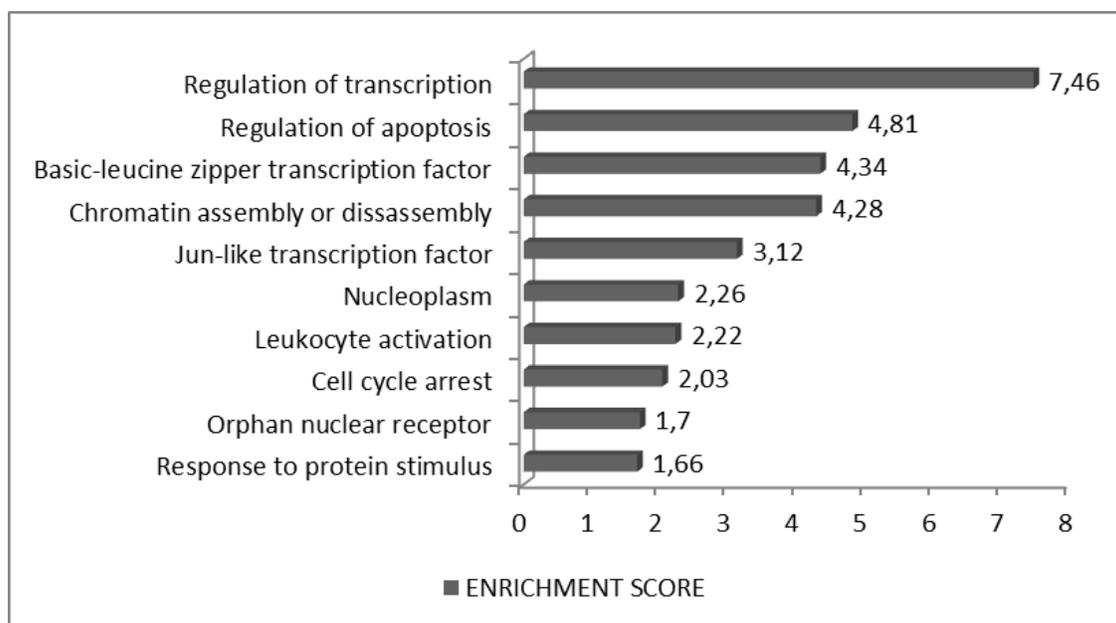


Figura 44.- Anotación funcional en categorías de Gene Ontology de los genes sub-expresados por células progenitoras CD34+CD38+Lin- de LMC cultivadas por 48 hr en ausencia de IM cuando son comparadas con células progenitoras CD34+CD38+Lin- de MON T0. El gráfico muestra la anotación funcional de los genes sub-expresados en categorías de Gene Ontology, utilizando el programa DAVID. Se muestra la escala de enriquecimiento determinada por el programa.

Cuando se cultivaron células de LMC con IM, se expresaron diferencialmente 752 genes; 455 genes se sobre-expresaron y 297 se sub-expresaron. Con respecto a las células normales, varias de las rutas y genes más representados en las células de LMC cultivadas en ausencia de IM también se representaron en células cultivadas en su presencia (Figuras 45 y 46).

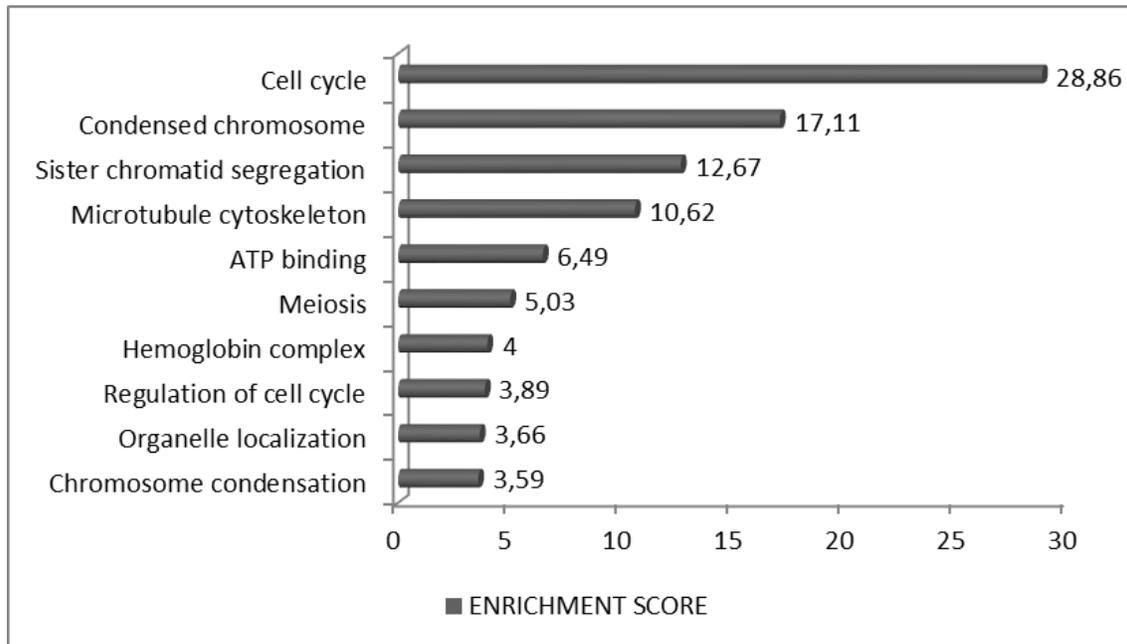


Figura 45.- Anotación funcional en categorías de Gene Ontology de los genes sobre-expresados por células progenitoras CD34+CD38+Lin- de LMC cultivadas por 48 hr en presencia de IM cuando son comparadas con células progenitoras CD34+CD38+Lin- de MON T0. El gráfico muestra la anotación funcional de los genes sobre-expresados en categorías de Gene Ontology, utilizando el programa DAVID. Se muestra la escala de enriquecimiento determinada por el programa.

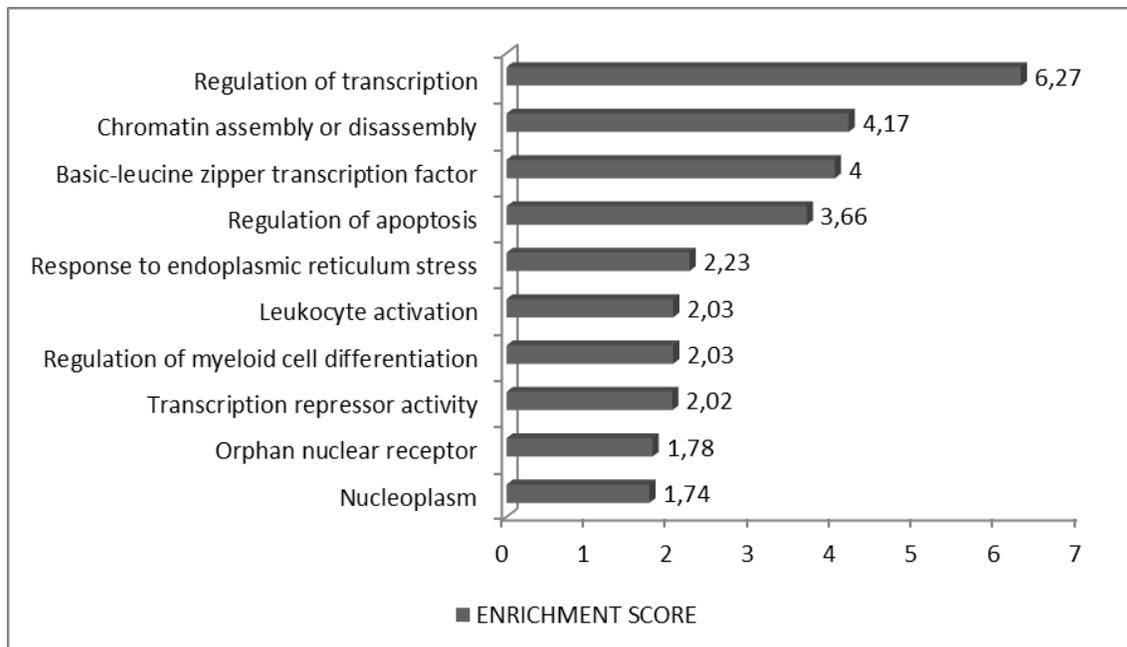


Figura 46.- Anotación funcional en categorías de Gene Ontology de los genes sub-expresados por células progenitoras CD34+CD38+Lin- de LMC cultivadas por 48 hr en presencia de IM cuando son comparadas con células progenitoras CD34+CD38+Lin- de MON T0. El gráfico muestra la anotación funcional de los genes sub-expresados en categorías de Gene Ontology, utilizando el programa DAVID. Se muestra la escala de enriquecimiento determinada por el programa.

PIEZO2, RXFP1 y MAMDC2 se expresan preferentemente en células troncales de LMC.

Con base en el perfil de genes individuales que mostraron altos niveles de expresión en CTH de LMC, en comparación con sus contrapartes normales, nos centramos en el análisis y validación de tres genes particulares: PIEZO2, RXFP1 y MAMDC2. Los resultados muestran que los tres genes se expresaron marcadamente en células troncales leucémicas y también muestran alta expresión en CPH leucémicas a niveles significativos. Es importante mencionar que MAMDC2 estuvo prácticamente ausente en la población progenitora lo que podría sugerirlo como marcador específico de células troncales y asociado con tratamiento ya que cuando se analizó su expresión en células tratadas con IM *in vitro*, no logramos detectarlo, evento que no sucede en el caso PIEZO2 y RXFP1(Figura 47).

En términos de genes que se regularon negativamente en las células de LMC, nos centramos en ABI3BP, cuyos niveles de expresión fueron muy bajos en CTH y CPH de LMC. Curiosamente, dichos niveles aumentaron significativamente en ambos tipos de células después del cultivo *in vitro*, tanto en ausencia como en presencia de IM (Figura 47).

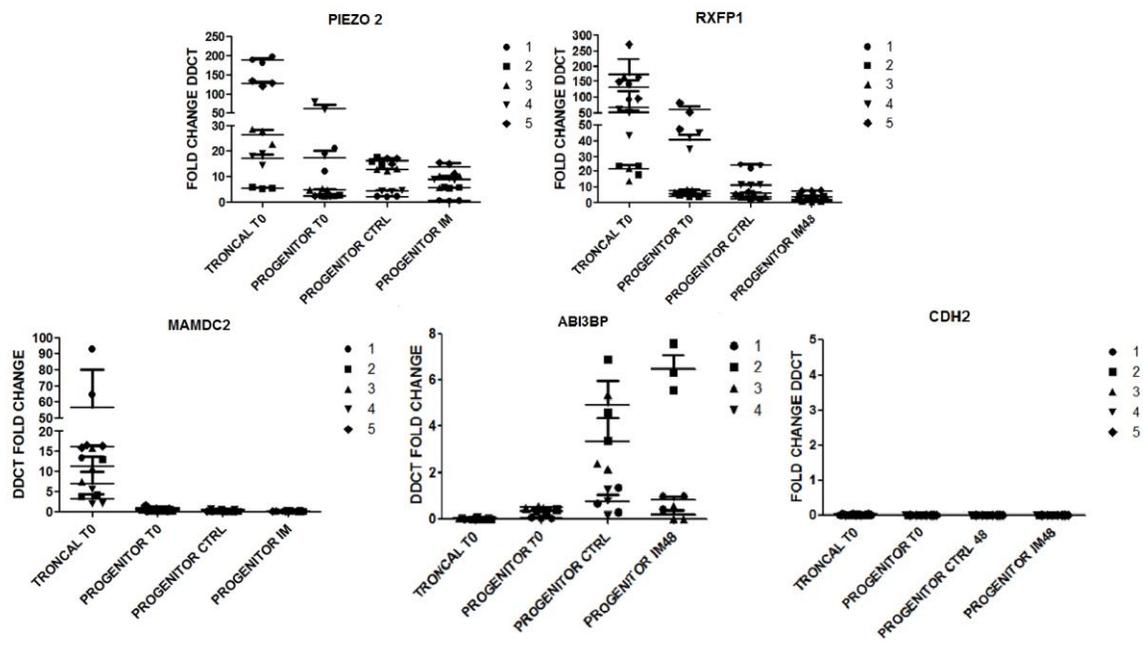


Figura 47.- Expresión de los genes PIEZO2, RXFP1, MAMDC2, ABI3BP y CDH2 en células troncales y progenitoras de LMC. Entre todos los genes que se expresaron diferencialmente entre las CTH y CPHs de LMC y MON, con base a los datos de microarreglos, se seleccionaron PIEZO2, RXFP1, MAMDC1, CDH2 y ABI3BP para evaluarlos mediante qRT-PCR. Las fracciones celulares analizadas correspondieron a CTHs (TRONCAL T0), CPH antes del cultivo (PROGENITOR T0), CPH después de 48 horas de cultivo en ausencia (PROGENITOR CTRL) o presencia (PROGENITOR IM) de IM. La cantidad relativa de cada gen se determinó usando el método $\Delta\Delta Ct$, normalizado con la expresión del gen GAPDH y comparados con cada condición de MON. Para cada cuantificación de genes, se usaron cinco muestras de células (1-5), que eran diferentes de las utilizadas para el análisis de microarreglos.

DISCUSIÓN.

Entre todos los tumores malignos humanos descritos hasta la fecha, la LMC es posiblemente el más conocido en términos de su biología. La evidencia presentada por diferentes grupos, indica que este trastorno hematológico surge a nivel de una célula troncal hematopoyética que se transforma por medio de una translocación cromosómica, lo que resulta en la generación de un gen quimérico (BCR/ABL), que codifica para una tirosina cinasa anormalmente activa. Tal alteración citogenética y molecular ha sido reconocida como el sello distintivo de la enfermedad y los modelos animales *in vivo* han demostrado que BCR/ABL es el único cambio molecular responsable de la inducción de LMC (Van Etten, et. al., 2013). La eliminación selectiva de células troncales de LMC mediante terapias dirigidas se ha convertido en un objetivo principal en la hematología actual. Se están realizando muchos esfuerzos para tratar de desarrollar formas novedosas y más efectivas, que incluyan tanto mecanismos dependientes de BCR/ABL como mecanismos independientes (Chávez.González, et. al., 2017; Petzer, et. al. 2003), para eliminar células troncales de LMC sin afectar a sus contrapartes normales. Evidentemente, tal objetivo requiere la identificación completa y la caracterización fisiológica de estas células primitivas.

Las CTH normales y derivadas de LMC comparten varias características biológicas, incluido su inmunofenotipo (CD34+CD38-Lin-), su quiescencia, su capacidad de autorrenovación y su capacidad para diferenciarse en linajes mieloide, eritroide y linfoide. De hecho, a diferencia de la leucemia mieloide aguda, en la que hay una detención de la maduración en el linaje mieloide, en LMC el programa de maduración de las células neoplásicas no parece estar alterado, por lo que las células morfológicamente normales se generan a lo largo de la fase crónica de la enfermedad (Petzer y Gunsilius, 2003). En términos funcionales, sin embargo, se han observado diferencias significativas entre las CTH normales y de LMC, tanto *in vitro* como *in vivo* (Holyoake, et. al, 2002; Mayani, et al., 2009). Tales diferencias resultan de alteraciones en la biología molecular de CTH leucémicas que impactan en su fisiología. Los progenitores hematopoyéticos de

LMC también muestran una biología alterada, en comparación con sus contrapartes normales, tanto *in vivo* como *in vitro* (Mayani, et al., 2009).

Durante los últimos años, ha habido un gran interés en la evaluación de los perfiles de expresión génica global de CTH y CTLs con el fin de identificar los genes particulares que se expresan diferencialmente en cada tipo de célula (McWeeney, et. al., 2010; Gerber, et. al., 2013; Kovacic, et. al., 2012). Los enfoques genómicos han demostrado firmas moleculares que distinguen la fase crónica de la fase acelerada y la crisis blástica en el nivel de células mononucleares (McWeeney, et. al., 2010) y/o en células progenitoras con inmunofenotipo CD34+ (Zheng, et. al., 2006). Al tratar de contribuir en la comprensión de la biología molecular de CTHs y CPHs de LMC a nivel transcriptómico, en el presente estudio hemos realizado un análisis comparativo de los perfiles de expresión génica global de células troncales y progenitoras hematopoyéticas normales y de LMC. Usando este enfoque, hemos identificado algunas de las principales vías y genes específicos que se expresan diferencialmente en células de LMC, en comparación con sus contrapartes normales. Hemos analizado además los perfiles de expresión de estas células después de que se cultivarón *in vitro*, con o sin IM.

Excepto por el trabajo de Gerber y colegas (Gerber, et. al., 2013) la mayoría de los estudios informados hasta la fecha sobre los perfiles de expresión génica de las células de LMC utilizaban células MNC o células CD34+ como población diana. Por lo tanto, uno de nuestros objetivos iniciales fue realizar dichos estudios en subpoblaciones específicas de células CD34+, por lo que pudimos evaluar las diferencias entre las CTH y las CPH tanto en sujetos normales como en pacientes con LMC. Mediante el uso de un enfoque de clasificación de células, pudimos obtener poblaciones de células prácticamente puras en términos de su inmunofenotipo (CD34+CD38-Lin- que representan células, enriquecidas para CTH y células CD34+CD38+Lin-, enriquecidas en CPHs). Sin embargo, en el caso de las células derivadas de LMC, dichas poblaciones consistían muy probablemente en una mezcla de células Ph+ y Ph-, ya que es bien sabido que en la médula LMC, tanto las células leucémicas como las normales coexisten dentro

de la misma población. Aunque en este momento no podemos descartar la posibilidad de que la presencia de células normales residuales dentro de las fracciones de células LMC pudieran haber influido en los resultados obtenidos, es claro que cada una de las cuatro poblaciones de células analizadas mostró un perfil de expresión génica particular. Esto sugiere que los perfiles observados para las células leucémicas son reflejos verdaderos de los patrones de expresión génica de CTH y CPH de LMC.

Cuando comparamos los perfiles de expresión génica de las cuatro poblaciones de células obtenidas, encontramos que los perfiles de las células troncales y progenitoras de LMC eran más cercanos a los de progenitores normales, mientras que las CTH normales mostraban el perfil de expresión más diferente de todos. También encontramos que los perfiles de expresión de CTH y CPH de LMC estaban más cerca unos de otros que los de CTH y CPH de médula normal. Estas observaciones están en contraste con las de Gerber et al. Estos autores utilizaron un enfoque similar al nuestro y encontraron que los patrones globales de expresión génica entre las fracciones de CTH normales y de LMC estaban más cerca unos de otros comparado con las CTH normales con CPH normales (Gerber, et. al., 2013). También descubrieron que solo 97 genes se expresaban diferencialmente entre de MON y LMC CD34 + CD38- Lin-, lo que difiere claramente de nuestro estudio, en el que se expresaron diferencialmente 584 genes. Cabe mencionar que en su estudio, Gerber y sus colegas incluyeron niveles de expresión de ALDH como parte de su estrategia de purificación celular; por lo tanto, es posible que los diferentes resultados observados puedan deberse, al menos en parte, a la diferencia en la estrategia de clasificación celular.

A pesar de estas diferencias, cabe destacar que en el estudio de Gerber y cols., así como en nuestro estudio, el análisis de los perfiles de expresión de CTHs de LMC mostró sobreexpresión de genes implicados en la reparación del ADN, el ciclo celular y la condensación cromosómica, mientras que los genes involucrados en la diferenciación de células mieloides se sub-expresaron. A nivel genético individual, ambos estudios, mostraron que GAS2 y DPP4 se encontraban entre los genes más sobreexpresados en CTHs de LMC. La proteína codificada por GAS2

es un sustrato para Caspasa-3 que juega un papel importante en la forma de la célula, la apoptosis, el ciclo celular y las actividades de calpaína (Schneider, et. al., 1988; Benetti, et. al., 2001). La expresión de GAS2 está alterada en diferentes tipos de cáncer como el cáncer colorrectal (Chang, et. al., 2016), y es importante señalar que se ha encontrado que este gen está sobreexpresado en células CD34+ de pacientes con LMC (Zhou, et. al., 2014). De manera similar, se ha encontrado que DPP4 (CD26), una enzima de la membrana celular que altera específicamente el eje SDF1-CXCR4, está altamente expresada en células LMC CD34+CD38-Lin-, mientras que su expresión en CTH normales es baja o ausente (Järas, et. al., 2010). Esto ha llevado a la propuesta de que CD26 podría usarse como un biomarcador para CTHs de LMC. Nuestros resultados están claramente en concordancia con los estudios anteriores.

Entre todos los genes que se sobre-expresaron en CTHs de LMC, nos centramos en tres de ellos: PIEZO2, RXFP1 y MAMDC2. La razón para enfocarse en esos genes particulares fue triple. En primer lugar, todos mostraron un valor de expresión de > 13 veces el cambio, en comparación con sus niveles de expresión en CTH normales. En segundo lugar, su función en este tipo de célula particular, es decir, en CTHs de LMC, no se conoce. En tercer lugar, estos tres genes codifican proteínas de membrana celular, lo que indica que tales proteínas podrían usarse como biomarcadores potenciales para las células troncales de LMC.

PIEZO2 codifica una proteína transmembranal que desempeña un papel en la mecanorecepción, incluidas las corrientes de activación mecánica activadas rápidamente en las neuronas somatosensoriales (Coste, et. al., 2010; Chesler, et. al., 2016). Se ha informado que la mayoría de las neuronas sensoriales mielinizadas que se proyectan hacia la médula ósea expresan PIEZO2 (Nencini e Ivanusic, 2017), y que este gen desempeña un papel importante como regulador crítico de la angiogénesis tumoral y la permeabilidad vascular (Yang, et. al., 2016). RXFP1, también conocido como LGR7, codifica una proteína de la membrana celular acoplada a la proteína G que es el receptor de la relaxina (Kern y Bryant-Greenwood, 2009). La relaxina puede ejercer una amplia gama de efectos, que incluyen la vasodilatación, los efectos antifibróticos, los efectos angiogénicos,

antiapoptóticos y antiinflamatorios (Sarwar, et. al., 2017). Informes recientes indican que RXFP1 participa en el desarrollo de varios tipos de cáncer, incluido el cáncer de próstata (Feng, et. al., 2010; Klonisch, et. al., 2017).

A diferencia de las dos proteínas, el papel de MAMDC2 aún no está claro. Su paralogo MDGA2/MAMDC1 se une a CAM, participando en la adhesión celular; por lo tanto, es posible que MAMDC2 también esté involucrado en los mecanismos de adhesión celular. MDGA2/MAMDC1 actúa como una molécula antitumoral en el cáncer gástrico (Wang, et. al., 2016); sin embargo, el papel de MAMDC2 en el cáncer, si lo hay, aún no se ha dilucidado. El gen MAMDC2 está mutado en pacientes con síndrome de Kabuki, un síndrome de anomalía congénita, retraso mental múltiple caracterizado por una apariencia facial distinta (Kuniba, et. al., 2009). Los roles reales de estas tres proteínas en CTL aún no se comprenden; sin embargo, como se mencionó anteriormente, podrían usarse como biomarcadores (después de la confirmación en series más grandes de pacientes) en CTH de pacientes con LMC.

En cuanto a los perfiles de expresión observados en los progenitores hematopoyéticos, encontramos que las vías genéticas implicadas en el metabolismo del colesterol se encuentran entre las vías más representadas. La importancia de esta observación aún no está clara; sin embargo, cabe destacar que se ha observado una alta incidencia de valores bajos de colesterol en pacientes con LMC (Marini, et. al., 1989) y algunos grupos han encontrado que dicha hipocolesterolemia puede tener importancia pronóstica (Muller, et. al, 1989).

En términos de vías sub-expresadas, la adhesión celular fue uno de los más representados. Esto está de acuerdo con el hecho de que los mecanismos de adhesión celular están alterados en la LMC, lo que lleva a la movilización de células inmaduras hacia la circulación. De hecho, se ha demostrado claramente, tanto *in vitro* como *in vivo*, que la adhesión celular es uno de los principales procesos biológicos que se ven afectados en las células de LMC (Goldman y Melo, 2003; Sawyers, 1999; Wertheim, et. al., 2002).

El trabajo reciente del grupo de John Dick en pacientes con LMA ha demostrado que, en lugar de inmunofenotipo, las firmas de expresión génica definen la función de la célula troncal leucémica (Eppert, et. al., 2011). Es decir, parece que los programas de expresión de células troncales no son exclusivos de la población de linfocitos CD34+CD38-, sino que persisten en las poblaciones progenitoras (CD34+CD38+lin-) y de blastos (CD34-CD38+/-), aunque en niveles significativamente más bajos. Estas y otras observaciones apuntan a la necesidad del desarrollo y la validación de nuevos biomarcadores de CTL. Esto también es cierto para las células troncales en tumores sólidos. De acuerdo con esta noción, el presente estudio contribuye a nuestro conocimiento sobre las firmas de expresión génica global de distintas poblaciones de células hematopoyéticas primitivas leucémicas y normales, e identifica tres nuevos biomarcadores potenciales (PIEZO2, RXFP1 y MAMDC2) para CTL.

Intentar comprender, a nivel genómico, los efectos de IM y otros inhibidores de tirosina cinasa en pacientes con LMC, y la naturaleza molecular de la resistencia a TKI, basada en perfiles de expresión génica, ha sido un objetivo importante para varios grupos.

En este sentido, se ha logrado un progreso significativo en los últimos años (McWeeney, et. al., 2010; Gerber, et. al., 2013; De Lavallade, et. al., 2010; Long, et. al., 2015; Cha et. al., 2016). Hasta la fecha, sin embargo y según nuestro conocimiento, los cambios genómicos inducidos por la administración *in vitro* de IM a poblaciones puras de CPH no se han informado. Al tratar de determinar si el cultivo *in vitro* de células progenitoras tanto normales como LMC afectaría sus perfiles de expresión génica, dichas poblaciones celulares se cultivaron durante un período de dos días en condiciones estándar, con y sin IM. Es importante señalar que este tipo de experimentos no se realizaron en cultivos de células troncales debido al número extremadamente bajo de células obtenidas. El cultivo *in vitro* de CPH dio como resultado cambios significativos en sus perfiles de expresión génica. Para las células normales, más de 1.200 genes se expresaron diferencialmente; el ciclo celular, la biosíntesis de esteroides y la segregación cromosómica se encontraban entre las vías más sobre-expresadas, mientras que

la regulación de la transcripción y la apoptosis se encontraban entre los procesos biológicos más sub-expresados. Cuando se añadió IM a los cultivos, se observó que la expresión de casi mil genes se alteró y varias de las rutas y genes más representados en las células cultivadas en ausencia de IM también se representaron en células cultivadas en presencia del fármaco.

El cultivo de progenitores de LMC también provocó cambios en la expresión de varios cientos de genes (más de 850 genes en cultivos sin IM y más de 750 genes en presencia del fármaco). En cuanto a las células normales, el ciclo celular, la condensación cromosómica, la biosíntesis de esteroides y la unión a ATP se encontraban entre los procesos biológicos más representativos que estaban regulados positivamente, mientras que la regulación de la transcripción y la apoptosis se encontraban entre las rutas más representadas en términos de genes regulados negativamente.

Estos hallazgos indican que el simple hecho de cultivar células en medio líquido libre de suero en presencia de una combinación de ocho citocinas indujo cambios importantes en los patrones de expresión de un número significativo de genes. Parece muy probable que tales cambios hayan sido inducidos por las citocinas estimuladoras añadidas al medio de cultivo; sin embargo, se deben realizar más estudios para determinar los factores reales que causan dichos cambios. Curiosamente, los cambios observados fueron similares independientemente de la ausencia o la presencia de IM. La razón de esto no está del todo clara, sin embargo, parece muy probable que el cóctel de ocho citocinas haya ejercido un efecto tan fuerte, "forzando" a las células a mostrar un perfil de expresión génica particular, y la presencia de IM cambió ese perfil solamente de una manera leve. En células de LMC, la proliferación reducida observada en cultivos suplementados con IM podría deberse a cambios en la expresión de un gen particular. Sin embargo, también es posible que tal efecto no se deba a cambios significativos, sino a cambios sutiles en el nivel de expresión de genes específicos.

CONCLUSIONES.

En el presente estudio hemos determinado los perfiles de expresión génica de las fracciones celulares, obtenidas de sujetos normales y pacientes con LMC, que estaban altamente enriquecidos para células troncales hematopoyéticas (CTH) y progenitoras (CPH). Nuestros resultados indican que los perfiles transcripcionales de las células troncales y progenitoras de LMC fueron más cercanos a los de los progenitores normales, mientras que las CTH normales mostraron un perfil de expresión más alejado de los otros grupos. Encontramos que los perfiles de expresión de CTH y CPH de LMC estaban más cerca unos de otros que los de CTH y CPH de médula normal. Los principales procesos biológicos desregulados en las células de LMC incluyen la reparación del ADN, el ciclo celular, la condensación cromosómica, la adhesión celular y la respuesta inmune.

También determinamos los cambios transcriptómicos en células troncales y progenitoras normales y LMC en condiciones de cultivo y encontramos que varios genes implicados en el ciclo celular, la biosíntesis de esteroides y la segregación cromosómica estaban regulados positivamente, mientras que los genes implicados en la regulación de la transcripción y la apoptosis estaban regulados negativamente. Estos cambios fueron básicamente los mismos, independientemente de la adición de IM al cultivo. Finalmente, hemos identificado tres genes -PIEZO2, RXFP1 y MAMDC2- que se expresan preferentemente por células primarias LMC y que codifican proteínas de membrana celular; por lo tanto, son biomarcadores potenciales para células troncales de LMC.

REFERENCIAS.

1. Appel S, Balabanov S, Brümmendorf T, Brossart P. 2005. Effects of Imatinib on Normal Hematopoiesis and Immune Activation. *Stem Cells* 23: 1082-1088.
2. Ariës IM, Jerchel IS, van den Dungen RE, van den Berk LC, Boer JM, Horstmann MA, Escherich G, Pieters R, den Boer ML. 2014. EMP1, a novel poor prognostic factor in pediatric leukemia regulates prednisolone resistance, cell proliferation, migration and adhesion. *Leukemia* 28: 1828-37.
3. Avilés-Vázquez S, Chávez-González A, Mayani H. 2013. Tyrosine kinase inhibitors (TKI): a new revolution in the treatment of chronic myeloid leukemia (CML) *Gac Med Mex.* 149(6): 646-654.
4. Banerjee P, Crawford L, Samuelson E, Feuer G. 2010. Hematopoietic stem cells and retroviral infection. *Retrovirology.* 4: 7-8.
5. Barnes D, Palaiologou D, Panousopoulou E, Schultheis B, Yong AS, Wong A, Pattacini L, Goldman JM, Melo JV. 2005. Bcr-Abl expression levels determine the rate of development of resistance to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia. *Cancer Res.* 65: 8912-8919.
6. Bartolovic K, Balabanov S, Hartmann U, Komor M, Boehmler M, Bühring HJ, Möhle R, Hoelzer D, Kanz L, Hofmann WK, Brümmendorf TH. 2004. Inhibitory effect of imatinib on normal progenitor cells *in vitro*. *Blood* 103: 523-529.
7. Benetti R, Del Sal G, Monte M, Paroni G, Brancolini C, Schneider C. 2001. The death substrate Gas2 binds m-calpain and increases susceptibility to p53-dependent apoptosis. *EMBO J.* 20: 2702–2714.
8. Bhatia R, Holtz M, Niu N, Gray R, Snyder DS, Sawyers CL, Arber DA, Slovak ML, Forman SJ. 2003. Persistence of malignant hematopoietic progenitors in chronic myelogenous leukemia patients in complete cytogenetic remission following imatinib mesylate treatment. *Blood* 101: 4701-4707.
9. Blumenfeld OO, Huang CH. 1997. Molecular genetics of glycoprotein MNS variants. *Transfus Clin. Biol.* 4:357-65
10. Bonnet D, Dick JE. 1997. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* 3: 730-737.

11. Bruns I, Czibere A, Fischer J, Roels F, Cadeddu R, Buest S, Bruennert D, Huenerlituerkoglu A, Stoecklein N, Singh R, Zerbini L, Kobbe G, Gattermann N, Kronenwett R, Brors B, Haas R. 2009. The hematopoietic stem cell in chronic phase CML is characterized by a transcriptional profile resembling normal myeloid progenitor cells and reflecting loss of quiescence. *Leukemia* 23: 892–899.
12. Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H, Meyer T, Muller M, Drucker BJ, Lyndon NB. 1996. Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase *in vitro* and *in vivo* by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res.* 56: 100-104.
13. Burchert A, Wang Y, Cai D, von Bubnoff N, Paschka P, Müller-Brüsselbach S, Ottmann OG, Duyster J, Hochhaus A, Neubauer A. 2005. Compensatory PI3-kinase/Akt/mTor activation regulates imatinib resistance development. *Leukemia* 19: 1774-1782.
14. Cha K, Li Y, Yi GS. 2016. Discovering gene expression signatures responding to tyrosine kinase inhibitor treatment in chronic myeloid leukemia. *BMC Med. Genomics.* 9(Suppl 1):29.
15. Chang CC, Huang CC, Yang SH, Chien CC, Lee CL, Huang CJ. 2016. Data on clinical significance of GAS2 in colorectal cancer cells. *Data Brief.* 8: 82-86.
16. Chávez-González A, Avilés-Vázquez S, Moreno-Lorenzana D, Mayani H. 2013. Hematopoietic stem cells in chronic myeloid leukemia. In: Alimoghaddam K (ed). *Stem cell biology in normal life and diseases. Intech.* 137-164.
17. Chávez-González MA, Ayala-Sánchez M, Mayani H. 2009. La leucemia mieloide crónica en el siglo XXI: biología y tratamiento. *Rev. Invest. Clin.* 61(3): 221-232.
18. Chavez-Gonzalez A, Centeno-Llanos S, Moreno-Lorenzana D, Sandoval-Esquivel MA, Aviles-Vazquez S, Bravo-Gomez ME, Ruiz-Azuara L, Ayala-Sanchez M, Torres-Martinez H, Mayani H. 2017. Casiopeina III-Ea, a copper-containing small molecule, inhibits the *in vitro* growth of primitive hematopoietic cells from chronic myeloid leukemia. *Leuk. Res.* 52: 8-19.

19. Chávez-González A, Rosas-Cabral A, Vela-Ojeda J, González JC, Mayani H. 2004. Severe functional alterations in vitro in CD34(+) cell subpopulations from patients with chronic myeloid leukemia. *Leuk. Res.* 28: 639-647.
20. Chesler A T, Szczot M, Bharucha-Goebel D, Ceko M, Donkervoort S, Laubacher C. 2016. The role of piezo2 in human mechanosensation. *N. Engl. J. Med.* 375: 1355-1364.
21. Copland M, Hamilton A, Elrick LJ, Baird JW, Allan EK, Jordanides N, Barow M, Mountford JC, Holyoake TL. 2006 Dasatinib (BMS-354825) targets an earlier progenitor population than imatinib in primary CML but does not eliminate the quiescent fraction, *Blood* 107: 4532-4539.
22. Copland M, Pellicano F, Richmond L, et al. 2008. BMS-214662 potently induces apoptosis of chronic myeloid leukemia stem and progenitor cells and synergizes with tyrosine kinase inhibitors. *Blood* 111: 2843-2854.
23. Coste, B., J. Mathur, J. Schmidt, T. J. Earley, S. Ranade, M. J. Petrus, et al. 2010. Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science* 330: 55-60.
24. Cox JJ, Reimann F, Nicholas AK, Thornton G, Roberts E, Springell K, Karbani G, Jafri H, Mannan J, Raashid Y, Al-Gazali L, Hamamy H, Valente EM, Gorman S, Williams R, McHale DP, Wood JN, Gribble FM, Woods CG. 2006. An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. *Nature* 444: 894-898.
25. De Groot R, Raaijmakers J, Lammers J, et al. 1999. STAT5 activation by BCR-Abl contributes to transformation of K562 leukemia cells. *Blood* 94: 1108-1112.
26. De Lavallade H, Finetti P, Carbuccia N, Khorashad JN, Charbonnier A, Foroni L, et al. 2010. A gene expression signature of primary resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Leuk. Res.* 34: 254-257.
27. Di D, Chen L, Wang L, Sun P, Liu Y, Xu Z, Ju J. 2016. Downregulation of human intercellular adhesion molecule-1 attenuates the metastatic ability in human breast cancer cell lines. *Oncol. Rep.* 35: 1541-1548.
28. Diamond JM, Melo JV. 2011. Mechanisms of resistance to BCR-ABL kinase inhibitors. *Leuk. Lymphoma* 52: 12-22.

29. Diaz-Blanco E, Bruns I, Neumann F, Fischer JC, Graef T, Roskopf M, Brors B, Pechtel S, Bork S, Koch A, Baer A, Rohr U, Kobbe G, Von Haeseler A, Gattermann N, Haas R y Kronenwett R. 2007. Molecular signature of CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells of patients with CML in chronic phase. *Leukemia* 21: 494–504.
30. Drucker B, Lydon N. 2001. Lesson learned from the development of an Abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. *J. Clin. Inv.* 105: 3-7.
31. Drucker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, Resta DJ, Reese SF, Ford JM, Capdeville R, y Talpaz M. 2001. Activity of a specific inhibitor of the Bcr-Abl tyrosine kinase in the blast crisis of the chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 344: 1038-1042.
32. Druker B, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal G, Fanning S, Zimmermann J, Lydon N. 1996. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat. Med.* 2: 561-566.
33. Elrick LJ, Jorgensen HG, Mountford JC, Holyoake TL. 2005. Punish the parent not the progeny. *Blood* 105: 1862-1866.
34. Eppert K, Takenaka K, Lechman ER, Waldron L, Nilsson B, van Galen P, et al. 2011. Stem cell gene expression programs influence clinical outcome in human leukemia. *Nat. Med.* 17: 1086-1093.
35. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, Kantarjian HM. 1999. Chronic Myelogenous Leukemia: Biology and Therapy. *Ann. Intern. Med.* 131: 207-219.
36. Feng S, Agoulnik I, Truong A, Li Z, Creighton C, Kaftanovskava E, et al. 2010. Suppression of relaxin receptor RXFP1 decreases prostate cancer growth and metastasis. *Endocr. Relat. Can.* 17: 1021-1033.
37. Forsberg EC, Passegué E, Prohaska SS, Wagers AJ, Koeva M. 2010. Molecular signatures of quiescent, mobilized and leukemia-initiating hematopoietic stem cells. *PLoS ONE* 5(1): e8785.
38. Frank O, Brors B, Fabarius A, Li L, Haak M, Merk S, Schwindel U, Zheng C, Müller MC, Gretz N, Hehlmann R, Hochhaus A, Seifarth W. 2006. Gene expression signature of primary imatinib-resistant chronic myeloid leukemia patients. *Leukemia* 20: 1400-1407.

39. Gallipoli P, Pellicano F, Morrison H, et al. 2013. Autocrine TNF- α production supports CML stem and progenitor cell survival and enhances their proliferation. *Blood* 122: 3335-3339.
40. Gerber JM, Gucwa JL, Esopi D, Gurel D, Haffner MC, Vala M, et al. 2013. Genome-wide comparison of the transcriptomes of highly enriched normal and chronic myeloid leukemia stem and progenitor cell populations. *Oncotarget* 4: 715-728.
41. Goldman JM, Melo JV. 2003. Chronic myeloid leukemia – advances in biology and new approaches to treatment. *N. Engl. J. Med.* 349: 1449-1462.
42. Graham S, Jorgenssen H, Allan E, Pearson C, Alcorn MJ, Richmond L, Holyoake TL. 2002. Primitive quiescent Philadelphia positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 *in vitro*. *Blood* 99: 319-325.
43. Graham S, Vass J, Holyoake T, Graham G. 2007. Transcriptional analysis of quiescent and proliferating CD34 human hemopoietic cells from normal and chronic myeloid leukemia sources. *Stem Cells* 25: 3111–3120.
44. Golemovic M, Verstovsek S, Giles F, Cortes J, Manshoury T, Manley PW, Mestan J, Dugan M, Alland L, Griffin JD, Arlinghaus RB, Sun T, Kantarjian H, Beran M. 2005. AMN107, a Novel Aminopyrimidine Inhibitor of Bcr-Abl, Has *In vitro* Activity against Imatinib-Resistant Chronic Myeloid Leukemia. *Clin. Cancer Res.* 11: 4941-4947.
45. Hamada A, Miyano H, Watanabe H, et al. 2003. Interaction of imatinib mesilate with human P-glycoprotein. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 307: 824-828.
46. Hamilton A, Elrick L, Myssina S, Copland M, Jørgensen H, Melo JV, Holyoake T. 2006. BCR-ABL activity and its response to drugs can be determined in CD34+ CML stem cells by CrkL phosphorylation status using flow cytometry. *Leukemia* 20: 1035-1039.
47. He T, Wang C, Zhang M, Zhang X, Zheng S, Linghu E, Guo M. 2017. Epigenetic regulation of voltage-gated potassium ion channel molecule Kv1.3 in mechanisms of colorectal cancer. *Discov. Med.* 23: 155-162.
48. Hehlmann R, Heimpel H, Hasford J. 1993. Randomized comparison of busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia: prolongation of survival by hydroxyurea. The German CML Study Group. *Blood* 82: 398-407.

49. Hehlmann R, Hochaus A, Baccarani M. 2007. Chronic Myeloid Leukemia. *Lancet* 370: 342–50.
50. Henkes M, van der Kuip H, Aulitzky W. 2008. Therapeutic options for chronic myeloid leukemia: focus on imatinib. *Ther. Clin. Risk Man.* 4: 163-187.
51. Holyoake TL, Jiang X, Jorgensen HG, Graham S, Alcorn MJ, Laird C, Eaves AC, Eaves CJ. 2001. Primitive quiescent leukemic cells from patients with chronic myeloid leukemia spontaneously initiate factor-independent growth *in vitro* in association with up-regulation of expression of interleukin-3. *Blood* 97: 720-728.
52. Holyoake T, Jiang X, Drummond MW, Eaves AC, Eaves CJ. 2002. Elucidating critical mechanisms of deregulated stem cell turnover in the chronic phase of chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 16: 549–558.
53. Inokuchi K. 2006. Chronic Myelogenous Leukemia: From Molecular Biology to Clinical Aspects and Novel Targeted Therapies. *J. Nippon. Med. Sch.* 73: 178-192.
54. Jabbour E, Kantarjian H, Jones D, Talpaz M, Bekele N, O'Brien S, Zhou X, Luthra R, Garcia-Manero G, Giles F, Rios MB, Verstovsek S, Cortes J. 2006. Frequency and clinical significance of BCR-ABL mutations in patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib mesylate. *Leukemia* 20: 1767-1773.
55. Jamieson CH, Ailles LE, Dylla SJ, Muijtjens M, Jones C, Zehnder JL, Gotlib J, Li K, Manz MG, Keating A, Sawyers CL, Weissman IL. 2004. Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. *N. Engl. J. Med.* 351: 657–667.
56. Järas M, Johnels P, Hansen N, Ågerstam H, Tsapogas P, Risslera M, Lassen C, Olofsson T, Bjerrum O, Richter J, Fioretos T. 2010. Isolation and killing of candidate chronic myeloid leukemia stem cells by antibody targeting of IL-1 receptor accessory protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107: 16280-16285.
57. Jorgensen HG, Holyoake, TL. 2007. Characterization of cancer stem cells in chronic myeloid leukaemia. *Biochem. Soc. Tran.* 35: 1347-1351.
58. Kantarjian H, Shah NP, Hochhaus A, Cortes J, Shah S, Ayala M, Moiraghi B, Shen Z, Mayer J, Pasquini R, Nakamae H, Huguet F, Boqué C, Chuah C, Bleickardt E, Bradley-Garelik MB, Zhu C, Szatrowski T, Shapiro D, Baccarani

- M. 2010. Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 362: 2260–2270.
59. Kern A, Bryant-Greenwood GD. 2009. Mechanisms of relaxin receptor (LGR7/RXFP1) expression and function. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1160: 60–66.
60. Klonisch T, Glogowska A, Thanasupawat T, Burg M, Krcek J, Pitz M, Jaggupilli A, Chelikani P, Wong GW, Hombach-Klonisch S. 2017. Structural commonality of C1q TNF-related proteins and their potential to activate relaxin/insulin-like family peptide receptor 1 signalling pathways in cancer cells. *Br. J. Pharmacol.* 174: 1025-1033.
61. Kohn. 2005. Hematopoietic Stem Cells. *Encyclopedia of Life Sciences.*
62. Kovacic B, Hoelbl A, Litos G, Alacakaptan M, Schuster C, Fischhuber KM, Kerényi MA, Stengl G, Moriggl R, Sexl V, Beug H. 2012. Diverging fates of cells of origin in acute and chronic leukaemia. *EMBO Mol. Med.* 4: 283-297.
63. Kronenwett R, Butterweck U, Steidl U, Kliszewski S, Neumann F, Bork S, Diaz Blanco E, Roes N, Graf T, Brors B, Eils R, Maercker C, Kobbe G, Gattermann N, Haas R. 2005. Distinct molecular phenotype of malignant CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells in chronic myelogenous leukemia. *Oncogene* 24: 5313-5324.
64. Kuniba H, Yoshiura K, Kondoh T, Ohashi H, Kuroswa K, Tonoki H, Nagai T, Okamoto N, Kato M, Fukushima Y, Kaname T, Naritomi K, Matsumoto T, Moriuchi H, Kishino T, Kinoshita A, Miyake N, Matsumoto N, Niikawa N. 2009. Molecular karyotyping in 17 patients and mutation screening in 41 patients with Kabuki syndrome. *J. Hum. Genet.* 54: 304-309.
65. Levescot A, Flamant S, Basbous S, Jacomet F, Féraud O, Anne Bourgeois E, Bonnet ML, Giraud C, Roy L, Barra A, Chomel JC, Turhan A, Guilhot F, Girard JP, Gombert JM, Herbelin A. 2014. BCR-ABL-induced deregulation of the IL-33/ST2 pathway in CD34+ progenitors from chronic myeloid leukemia patients. *Can. Res.* 15: 2669-76.
66. Li J, Jin Q, Huang F, Tang Z, Huang J. 2017. Effects of Rab27A and Rab27B on Invasion, proliferation, apoptosis, and chemoresistance in human pancreatic cancer cells. *Pancreas* 46: 1173-1179.

67. Li S. 2008. Src-family kinases in the development and therapy of Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia. *Leuk. Lymph.* 49: 19-26.
68. Li Y, Hofmann M, Wang Q, Teng L, Chlewicki LK, Pircher H, Mariuzza RA. 2009. Structure of natural killer cell receptor KLRG1 bound to E-cadherin reveals basis for MHC-independent missing self recognition. *Immunity* 31: 35-46.
69. Long MD, van den Berg PR, Russell JL, Singh PK, Battaglia S, Campbell MJ. 2015. Integrative genomic analysis in K562 chronic myelogenous leukemia cells reveals that proximal NCOR1 binding positively regulates genes that govern erythroid differentiation and imatinib sensitivity. *Nucleic Acids Res.* 43: 7330-7348.
70. Lymperi S, Ferraro F, Scadden DT. 2010. The HSC niche concept has turned 31. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1192: 12-18.
71. Maguer-Satta V, Petzer AL, Eaves AC, Eaves CJ. 1996. BCR-ABL expression in different subpopulations of functionally characterized Ph+ CD34+ cells from patients with chronic myeloid leukemia. *Blood* 88: 1796-1804
72. Marini A, Carulli G, Azar A, Grassi B, Ambrogi F. 1989. Serum cholesterol and triglycerides in hematological malignancies. *Acta Haematol.* 81: 75-79
73. Mayani H. 2007. Hematopoiesis. *Cancerologa* 2: 95-107.
74. Mayani H. 2010. Biological Differences Between Neonatal and Adult Human Hematopoietic Stem/Progenitor Cells. *Stem Cells Dev.* 19: 285-298.
75. Mayani H, Flores-Figueroa E, Chavez-Gonzalez A. 2009. *In vitro* biology of human myeloid leukemia. *Leuk. Res.* 33: 624-637.
76. McCormack R, Podack ER. 2015. Perforin-2/Mpeg1 and other pore-forming proteins throughout evolution. *J. Leukoc. Biol.* 98: 761-768.
77. McWeeney SK, Pemberton LC, Loriaux MM, Vartanian K, Willis SG, Yochum G, Wilmot B, Turpaz Y, Pillai R, Druker BJ, Snead JL, MacPartlin M, O'Brien SG, Melo JV, Lange T, Harrington CA, Deininger MW. 2010. A gene expression signature of CD34+ cells to predict major cytogenetic response in chronic- phase chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib. *Blood* 115: 315-325.

78. Miura Y, Shimazu R, Miyake K, Akashi S, Ogata H, Yamashita Y, Narisawa Y, Kimoto M. 1998. RP105 is associated with MD-1 and transmits an activation signal in human B cells. *Blood* 92: 2815-2822.
79. Moen M, McKeage K, Plosker G, Siddiqui M. 2007. Imatinib: A review of its use in chronic myeloid leukaemia. *Drugs*. 67(2): 299-320.
80. Moreno-Lorenzana D, Avilés-Vazquez S, Sandoval-Esquivel MA, Alvarado-Moreno A, Ortiz-Navarrete V, Torres-Martínez H, Ayala-Sánchez M, Mayani H, Chavez-Gonzalez A. 2016. CDKIs p18(INK4c) and p57(Kip2) are involved in quiescence of CML leukemic stem cells after treatment with TKI. *Cell Cycle* 15: 1276-87.
81. Morrison SJ, Scadden DT. 2014. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature* 505: 327-334.
82. Muller CP, Wagner AU, Maucher C, Steinke B. 1989. Hypocholesterolemia, an unfavorable feature of prognostic value in chronic myeloid leukemia. *Eur. J. Haematol.* 43: 235-239.
83. Nencini S, Ivanusic J. 2017. Mechanically sensitive A δ nociceptors that innervate bone marrow respond to changes in intra-osseous pressure. *J. Physiol.* 595: 4399-4415.
84. Nowicki MO, Pawlowski P, Fischer T, Hess G, Pawlowski T, Skorski T. 2003. Chronic myelogenous leukemia molecular signature. *Oncogene* 22: 3952-3963.
85. O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, Gathmann I, Baccarini M, Cervantes F, Cornelissen JJ, Fischer T, Hochhaus A, Hughes T, Lechner K, Nielsen JL, Rousselot P, Reiffers J, Saglio G, Shepherd J, Simonsson B, Gratwohl A, Goldman JM, Kantarjian H, Taylor K, Verhoef G, Bolton AE, Capdeville R, Druker BJ, IRIS Investigators. 2003. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 348: 994-1004.
86. O'Hare T, Eide CA, Deininger MW. 2007. Bcr-Abl kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia. *Blood* 110: 2242-2249.
87. Ohmine K, Ota J, Ueda M, Ueno S, Yoshida K, Yamashita Y, Kirito K, Imagawa S, Nakamura Y, Saito K, Akutsu M, Mitani K, Kano Y, Komatsu N,

- Ozawa K, Mano H. 2001. Characterization of stage progression in chronic myeloid leukemia by DNA microarray with purified hematopoietic stem cells. *Oncogene* 20: 8249-8257.
88. Orkin SH. 1996. Development of the hematopoietic system. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6: 597-602.
89. Orkin SH, Zon LI. 2008. Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology. *Cell* 132: 631-644.
90. Otsubo C, Otomo R, Miyazaki M, Matsushima-Hibiya Y, Kohno T, Iwakawa R, Takeshita F, Okayama H, Ichikawa H, Saya H, Kiyono T, Ochiya T, Tashiro F, Nakagama H, Yokota J, Enari M. 2014. TSPAN2 is involved in cell invasion and motility during lung cancer progression. *Cell Rep.* 7: 527-538.
91. Passegué E, Jamieson CH, Ailles LE, Weissman IL. 2003. Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics?. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 100(Suppl 1): 11842-118549.
92. Park CY, Tseng D, Weissman IL. 2009. Cancer stem cell-directed therapies: recent data from the laboratory and clinic. *Mol. Ther.* 17: 219-230.
93. Pellicano F, Holyoake T. 2007. Stem cells in chronic myeloid leukaemia. *Cancer Biom.* 3: 183-191.
94. Pendergast AM1, Quilliam LA, Cripe LD, Bassing CH, Dai Z, Li N, Batzer A, Rabun KM, Der CJ, Schlessinger J. 1993. BCR/ABL- induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein. *Cell* 75: 175-185.
95. Petzer AL, Gunsilius E. 2003. Hematopoietic stem cells in chronic myeloid leukemia. *Arch. Med. Res.* 34: 496-506.
96. Radich JP, Da H, Mao M, Oehler V, Schelter J, Druker B, Sawyers C, Shah N, Stock W, Willman C, Friend S, Linsley PS. 2006. Gene expression changes associated with progression and response in chronic myeloid leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103: 2794-2799.
97. Ramirez, P. Di Persio J. 2008. Therapy options in Imatinib failures. *The Oncologist* 13: 424-434.
98. Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F. y Weissman I.L. 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414: 105-111.

99. Rogge L, Barberis-Maino L, Biffi M, Passini N, Presky DH, Gubler U, Sinigaglia F. 1997. Selective expression of an interleukin-12 receptor component by human T helper 1 cells. *J. Exp. Med.* 185: 825-831.
100. Sarwar, M., X. J. Du, T. B. Dschietziq, y R. J. Summers. 2017. The actions of relaxin in the cardiovascular system. *Br. J. Pharmacol.* 174:933–949.
101. Sawyers, CL. 1999. Chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 340: 1330-1340.
102. Sawyers CL, Shah NP. 2005. Chronic Myeloid Leukemia. en *Hematology basic principles and practice.* 4 ed. Ed. Elsevier. USA.
103. Schneider C, King RM, Philipson L. 1988. Genes specifically expressed at growth arrest in mammalian cells. *Cell* 54: 787-793.
104. Shah NP. 2005. Loss of response to imatinib: Mechanisms and management. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 183-187.
105. Silver RT, Woolf SH, Hehlmann R. 1999. An evidence-based analysis of the effect of busulfan, hydroxyurea, interferon, and allogeneic bone marrow transplantation in treating the chronic phase of chronic myeloid leukemia: developed for the American Society of Hematology. *Blood* 94:1517-1536.
106. Soverini S, Colarossi S, Gnani A, Rosti G, Castagnetti F, Poerio A, Iacobucci I, Amabile M, Abruzzese E, Orlandi E, Radaelli F, Ciccone F, Tiribelli M, di Lorenzo R, Caracciolo C, Izzo B, Pane F, Saglio G, Baccarani M, Martinelli G, The GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia. 2006. Contribution of ABL kinase domain mutations to imatinib resistance in different subsets of Philadelphia-positive patients. *Clin. Cancer Res.* 12: 7374-7379.
107. Stratowa C. 2007. Microarrays in Disease Diagnosis and Prognosis. *Encyclopedia of Life Sciences* 1-6.
108. Sullivan C, Peng C, Chen Y, Li D, Li S. 2010. Targeted therapy of chronic myeloid leukemia. *Biochem. Pharm.* 80: 584-591.
109. Suzuki M, Iizasa T, Nakajima T, Kubo R, Iyoda A, Hiroshima K, Nakatani Y, Fujisawa T. 2007. Aberrant methylation of IL-12Rbeta2 gene in lung adenocarcinoma cells is associated with unfavorable prognosis. *Ann Surg. Oncol.* 14: 2636-2642.

110. Takai T. 2005. Fc receptors and their role in immune regulation and autoimmunity. *J Clin. Immunol.* 25: 1-18.
111. Talpaz M, Shah NP, Kantarjian H et al. 2006. Dasatinib in imatinib-resistant Philadelphia chromosome–positive leukemias. *New. Engl. J. Med.* 354: 2531-2541.
112. Thiagarajan PS, Zheng Q, Bhagrath M, Mulkearns-Hubert EE, Myers MG, Lathia JD, Reizes O. 2017. STAT3 activation by leptin receptor is essential for TNBC stem cell maintenance. *Endocr. Relat. Cancer* 24: 415-426.
113. Valent, P. 2007. Imatinib-resistant chronic myeloid leukemia (CML): Current concepts on pathogenesis and new emerging pharmacologic approaches *Biologics: Targets & Therapy* 1: 433–448.
114. Van Etten RA, Mauro M, Radich JP, Goldman JM, Saglio G, Jamieson C, Soverini S, Gambacorti-Passerini C, Hehlmann R, Martinelli G, Perrotti D, Scadden DT, Skorski T, Tefferi A, Mughal TI. 2013. Advances in the biology and therapy of chronic myeloid leukemia (CML): Proceedings of the 6th post-ASH CML and myeloproliferative neoplasms workshop. *Leuk. Lymphoma* 54: 1151-1158.
115. Vardiman JW. 2009. Chronic Myelogenous Leukemia, *BCR-ABL1+*. *Am J Clin Pathol.* 132: 250-260.
116. Venkataraman A, Nevriy DJ, Filtz TM, Leid M. 2012. Grp1-associated scaffold protein (GRASP) is a regulator of the ADP ribosylation factor 6 (Arf6)-dependent membrane trafficking pathway. *Cell Biol Int.* 36: 1115-1128.
117. Wang K, Liang Q, Li X, Tsoi H, Zhang J, Wang H, Go MY, Chiu PW, Ng EK, Sung JJ, Yu J. 2016. MDGA2 is a novel tumour suppressor cooperating with DMAP1 in gastric cancer and is associated with disease outcome. *Gut.* 65: 1619-1631.
118. Wang L, Giannoudis A, Lane S, Williamson P, Pirmohamed M, Clark R E. 2008. Expression of the uptake drug transporter hOCT1 is an important clinical determinant of the response to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Clin. Pharmacol. Therap.* 83: 258-264.

119. Wang LD, Wagers AJ. 2011. Dynamic niches in the origination and differentiation of haematopoietic stem cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12: 643-655.
120. Warren LA, Rossi DJ. 2009. Stem cells and aging in the hematopoietic system. *Mech Ageing Dev.* 130: 46-53.
121. Wein F, Pietsch L, Saffrich R, Wuchter P, Walenda T, Bork S, Horn P, Diehlmann A, Eckstein V, Ho AD, Wagner W. 2010. N-Cadherin is expressed on human hematopoietic progenitor cells and mediates interaction with human mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Res.* 4: 129-139.
122. Weisberg E, Manley PW, Cowan-Jacob S, Hochhaus A, Griffin JD. 2007. Second generation inhibitors of BCRABL for the treatment of imatinib resistant chronic myeloid leukaemia. *Nat. Rev. Can.* 7: 345-356.
123. Weisberg E, Manley P, Mestan J, et al. 2006. AMN107 (nilotinib): a novel and selective inhibitor of BCR-ABL. *Br. J. Cancer* 94: 1765-1769.
124. Weisberg, E, Wright, RD, McMillin D W. et al. 2008. Stromal-mediated protection of tyrosine kinase inhibitor-treated BCR-ABL-expressing leukemia cells. *Mol. Can. Ther.* 7: 1121-1129.
125. Wertheim JA, Miller JP, Xu L, He Y, Pear WS. 2002. The biology of chronic myelogenous leukemia: mouse models and cell adhesion. *Oncogene* 21: 8612-8628.
126. White D, Saunders V, Grigg A, Arthur C, Filshie R, Leahy MF, Lynch K, To LB, Hughes T. 2007. Measurement of *in vivo* BCR-ABL kinase inhibition to monitor imatinib-induced target blockade and predict response in chronic myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* 25: 4445-4451.
127. Yang H, Liu C, Zhou R M, Yao J , Li X M, Shen Y, Cheng H, Yuan J, Yan B, Jiang Q. 2016. Piezo2 protein: a novel regulator of tumor angiogenesis and hyperpermeability. *Oncotarget* 7: 44630-44643.
128. Zhang B, Li M, McDonald T, Holyoake TL, Moon RT, Campana D, Shultz L, Bhatia R. 2013. Microenvironmental protection of CML stem and progenitor cells from tyrosine kinase inhibitors through N-cadherin and Wnt- β -catenin signaling. *Blood* 121: 1824-1838.
129. Zheng C, Li L, Haak M, Brors B, Frank O, Giehl M, Fabarius A, Schatz M, Weisser A, Lorentz C, Gretz N, Hehlmann R, Hochhaus A, Seifarth W.

2006. Gene expression profiling of CD34 + cells identifies a molecular signature of chronic myeloid leukemia blast crisis. *Leukemia* 20: 1028-1034.
130. Zhou, H., Ge Y, Sun L, Ma W, Wu J, Zhang X, Hu X, Eaves CJ, Wu D, Zhao Y. 2014. Growth Arrest Specific 2 is up-regulated in chronic myeloid leukemia cells and required for their growth. *PLoS ONE*. 9(1):e86195.

ANEXO 1

Artículo publicado.

ORIGINAL RESEARCH

Global gene expression profiles of hematopoietic stem and progenitor cells from patients with chronic myeloid leukemia: the effect of in vitro culture with or without imatinib

Sócrates Avilés-Vázquez¹, Antonieta Chávez-González¹, Alfredo Hidalgo-Miranda², Dafne Moreno-Lorenzana¹, Lourdes Arriaga-Pizano³, Miguel Á. Sandoval-Esquivel¹, Manuel Ayala-Sánchez⁴, Rafael Aguilar⁵, Luis Alfaro-Ruiz² & Hector Mayani¹ 

¹Oncology Research Unit, Oncology Hospital, National Medical Center, Mexican Institute for Social Security, Mexico City, Mexico

²National Institute of Genomic Medicine, Mexico City, Mexico

³Immunochimistry Research Unit, National Medical Center, Mexican Institute for Social Security, Mexico City, Mexico

⁴Department of Hematology, La Raza Medical Center, Mexican Institute for Social Security, Mexico City, Mexico

⁵Department of Hip Surgery, Villa Coapa General Hospital, Mexican Institute for Social Security, Mexico City, Mexico

Keywords

Cell Biomarkers, chronic myeloid leukemia, gene expression profiles, hematopoietic stem/progenitor cells, imatinib

Correspondence

Hector Mayani, Oncology Research Unit, IMSS National Medical Center, Tallo 2, D-102, San Pablo Tepetlapa, Coyoacan, Mexico City 04620. Tel: 52-55-5627 6959; Fax: 52-55-5627 6959; E-mail: hmayani@prodigy.net.mx

Funding Information

This study was supported by grant no. SALUD 2007-C01-69664 from the Mexican Council of Science and Technology (CONACYT) to HM.

Received: 24 May 2017; Revised: 11 August 2017; Accepted: 14 August 2017

Cancer Medicine 2017; 6(12):2942–2956

doi: 10.1002/cam4.1187

Abstract

In this study, we determined the gene expression profiles of bone marrow-derived cell fractions, obtained from normal subjects and Chronic Myeloid Leukemia (CML) patients, that were highly enriched for hematopoietic stem (HSCs) and progenitor (HPCs) cells. Our results indicate that the profiles of CML HSCs and HPCs were closer to that of normal progenitors, whereas normal HSCs showed the most different expression profile of all. We found that the expression profiles of HSCs and HPCs from CML marrow were closer to each other than those of HSCs and HPCs from normal marrow. The major biologic processes dysregulated in CML cells included DNA repair, cell cycle, chromosome condensation, cell adhesion, and the immune response. We also determined the genomic changes in both normal and CML progenitor cells under culture conditions, and found that several genes involved in cell cycle, steroid biosynthesis, and chromosome segregation were upregulated, whereas genes involved in transcription regulation and apoptosis were downregulated. Interestingly, these changes were the same, regardless of the addition of Imatinib (IM) to the culture. Finally, we identified three genes—PIEZO2, RXFP1, and MAMDC2—that are preferentially expressed by CML primitive cells and that encode for cell membrane proteins; thus, they could be used as biomarkers for CML stem cells.

Introduction

Chronic myeloid leukemia (CML) is a neoplastic hematological disease characterized by the abnormal overproduction and accumulation, both in blood and bone marrow, of myeloid cells. Its annual incidence is about 1.3 per 100,000 population, and it is slightly more common in males than in females [1]. The Philadelphia

chromosome, a truncated chromosome 22 resulting from the reciprocal translocation between DNA segments from chromosomes 9 and 22, is observed in more than 95% of CML patients; thus, it is recognized as the hallmark of the disease [2, 3]. Such a translocation fuses the breakpoint cluster region (BCR) gene on chromosome 22 to the ABL gene on chromosome 9. The resultant chimeric gene—*bcr-abl* oncogene encodes for a constitutively active

tyrosine kinase protein that is central to the pathogenesis of CML, since it alters proliferation, cell death, and adherence/migration of the neoplastic cells [4].

In trying to find efficient drugs against CML, several tyrosine kinase inhibitors (TKIs) have been developed that specifically inhibit the action of the BCR-ABL protein [5]. Among them, Imatinib (IM) was the first to be developed and FDA-approved, and today it has become a first-line treatment worldwide [6], since major cytogenetic and molecular responses are achieved in the majority of patients that are treated with such a TKI [7, 8]. It is noteworthy, however, that resistance to IM is observed in a proportion of patients, which can be attributed to different mechanisms, including point mutations in the ATP-binding domain [9–12].

Work by several laboratories has demonstrated that CML is a clonal disease that arises on a stem cell that, although abnormal in functional terms, shares several biological features with its normal counterpart. Indeed, both normal and CML hematopoietic stem cells (HSCs) are comprised within a cell population expressing the CD34 antigen, and lacking the expression of CD38 and any lineage-specific antigen; so that they are referred to as lineage-negative (Lin^-) cells. The vast majority of normal and leukemic HSCs are quiescent, thus, leukemic HSCs (leukemic stem cells or LSCs) are insensitive to most chemotherapeutic agents, including tyrosine kinase inhibitors, such as IM [12–15]. Furthermore, both normal HSCs and LSCs reside in specific niches within the bone marrow; such niches play important roles in stem cell function and recent evidence suggests that they contribute to leukemic cell resistance to drugs by protecting them from the action of antineoplastic agents [16, 17].

Considering the above, finding specific differences between normal HSCs and LSCs has become a primary goal for several research groups, including ours. Some studies have shown that molecules such as CD25, CD26, IL1RAP, TPO-R, and SIRT1 could be markers for LSCs [18–22]; however, it is clear that further efforts are needed for a more complete characterization of LSCs. One relatively recent approach has been to assess global gene expression profiles of normal HSCs and LSCs, in order to identify particular genes that are differentially expressed in both cell types [23–25].

In trying to contribute to our understanding of the gene expression dynamics of HSCs in normal and leukemic conditions, in this study we performed a comparative analysis of the global gene expression profiles between LSCs from CML patients and normal HSCs. Our goal was to identify key genes and pathways—preferentially, or solely, expressed by LSCs—that could be used as markers for the identification and selection of LSCs ($\text{CD34}^+ \text{CD38}^- \text{Lin}^-$ cells), and as targets for inhibiting

the growth of such cells. We also analyzed the population of progenitor cells (HPCs; $\text{CD34}^+ \text{CD38}^+ \text{Lin}^-$ cells) since it has been clearly shown that these cells play an important role in the pathophysiology of CML [14]. Finally, we asked whether *in vitro* culture of such cell populations, in the absence or presence of IM, could also result in significant changes in their gene expression profiles.

Materials and Methods

Patient samples

Bone marrow samples from five chronic-phase CML patients at diagnosis were obtained at the Hematology Department, Medical Specialties Hospital, La Raza Medical Center, IMSS, Mexico City. Cytogenetic analysis was performed in all five patients at the time of diagnosis; all of them showed the Philadelphia chromosome in 100% of the cells analyzed (20–25 metaphases per patient). Bone marrow samples from five hematologically normal patients undergoing orthopedic surgery were obtained at the Hip Surgery Department, Villa Coapa Regional Hospital, IMSS, Mexico City. All samples were obtained after informed consent, according to the Ethics Committee of the IMSS National Medical Center.

Isolation and culture of primitive cells

Mononuclear cells were isolated from bone marrow samples using Ficoll Paque Plus (GE Healthcare Life Sciences)-based gradients. $\text{CD34}^+ \text{lin}^-$ cells were enriched using the StemSep Human Hematopoietic Progenitor Cell Enrichment Kit (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada), according to the manufacturer's instructions. The enriched cells were collected in StemSpan medium, stained with CD34-FITC and CD38-APC antibodies (eBioscience, San Diego, CA), and sorted using a BD FACSAria (BD Biosciences, San Jose, CA) into hematopoietic progenitor ($\text{CD34}^+ \text{CD38}^+ \text{Lin}^-$; HPCs) and stem ($\text{CD34}^+ \text{CD38}^- \text{Lin}^-$; HSCs) cells (Fig. S1). HSCs were immediately placed in Trizol and stored at -80°C until RNA extraction. HPCs were divided into three equal fractions. The first one was placed in Trizol and stored at -80°C for RNA extraction. The second one was cultured for 48 h in StemSpan Serum-Free Expansion Media (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada) supplemented with the following cytokines: Erythropoietin (EPO); Thrombopoietin (TPO); Flt-3-ligand (Flt-3L); Stem Cell Factor (SCF); Interleukin-6 (IL6); IL3; Granulocyte Colony-stimulating Factor (G-CSF); and Granulocyte-Macrophage CSF (GM-CSF), each one at 10 ng/mL. The third fraction was cultured under the same conditions plus 2.5 $\mu\text{mol/L}$ IM (Gleevec, Novartis Pharmaceuticals). After culture, cells were washed and placed in Trizol.

RNA extraction

Total RNA was extracted with Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. A NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE) was used to quantify the RNA extracts. The quality of extracted RNA was assessed using a Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) and samples with a RIN >7 were selected for performing microarray screening and analysis.

Gene expression microarrays

One hundred and fifty nanogram of each RNA sample were processed using Affymetrix GeneChip Whole Transcript (WT) PLUS Reagent Kit (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Fifteen microgram of cRNA was input into the second cycle cDNA reaction. 5.5 μ g of ss-cDNA were input for fragmentation. Each DNA fragment was end labeled with biotin using terminal deoxynucleotidyl transferase before being hybridized to the arrays. Hybridization cocktails were prepared and applied to Gene Chip Human Gene 1.0 ST arrays (Affymetrix, Santa Clara, CA). Hybridization was performed at 60 rpm for 16 h at 45°C. Wash and stain processes were performed with the Genechip Expression Wash and Stain Kit in the GeneChip Fluidics Station 450 (Affymetrix, Santa Clara, CA). The probe arrays were scanned using the GeneChip Scanner 3000 7G and Affymetrix GeneChip Command Console Software (AGCC) (Affymetrix, Santa Clara CA, USA) to produce.CEL intensity files.

Microarray analysis

Affymetrix Expression Console was used to process the original.CEL files. The.chp files were generated using the RMA-sketch workflow after signal summarization (Median polish) and data normalization (Sketch-Quantile method). Gene level analysis was further conducted with Affymetrix Transcriptome Analysis Console software. Twenty nine thousand and ninety-six genes were tested at core level to compare their expression between four groups of chronic myeloid leukemia and hematologically normal controls: stem cells T0, progenitor cells T0, progenitor cells CTRL (cultured for 48 hrs without imatinib), progenitor cells IM (cultured for 48 h with 2.5 μ mol/L Imatinib). Genes with a fold change ≥ 2 or ≤ -2 and with a *P*-value ≤ 0.05 were considered differentially expressed in each comparison. The Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID) tool (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) was used to identify biological processes containing differentially expressed genes, according with the

gene-ontology classification. The microarray data are available at Gene Expression Omnibus (GEO; access number GSE97562).

Real Time RT-PCR

To validate the microarray results, cDNA was generated using M-MLV Reverse Transcriptase and random primers (Invitrogen, Carlsbad, CA.) from RNA of cells from five different CML patients and five hematologically normal, hip-replacement surgery adult patients (samples were different from the ones used for gene microarray). Five genes were selected for qPCR validation using gene-specific TaqMan[®] assays (Life Technologies, Carlsbad, CA): PIEZO2 (Hs00401026_m1), MAMDC2 (Hs00299196_m1), RXFP1 (Hs01073141_m1), CDH2 (Hs00983056_m1), and ABL3BP (Hs00227206_m1). GAPDH (Hs03929097_g1) served as control for relative quantification. Quantitative PCR experiments were performed in a 7900 FAST real time thermal cycler (Applied Biosystems), the conditions used were: 95°C for 10 min, 40 cycles of 95°C for 10 sec and 60°C for 1 min; all samples were analyzed in triplicate. Fold change in gene expression was determined with the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method using GAPDH as the housekeeping gene.

Results

Gene expression profiles of CML HSCs are more similar to those of leukemic or normal HPCs than to the ones of normal marrow HSCs

As a first approach, we performed a global comparison of the gene expression profiles from the four cell populations analyzed, that is, CD34⁺ CD38⁻ Lin⁻ (enriched for HSCs) and CD34⁺ CD38⁺ Lin⁻ (enriched for HPCs) cells from both, hematologically normal subjects and CML patients. By using Affymetrix Human Gene 1.0 ST array we assessed the expression of 29,096 genes and found the differential expression of 2298 genes between the four hematopoietic populations (ANOVA analysis; considering *P* < 0.05 and a fold change equal or higher than two, as a cut-off). Hierarchical clustering showed that CML LSCs are transcriptionally more similar to CML progenitors than to their normal counterparts. Interestingly, the gene expression profiles of CML stem and progenitor cells were closer to the one of normal progenitors, whereas normal HSCs showed the most different expression profile of the four cell populations (Fig. 1A).

When we compared the gene expression profiles between stem and progenitor cells from normal bone marrow samples, we found 1093 genes differentially expressed (Fig. 1B). Of these, 476 were upregulated in HPCs

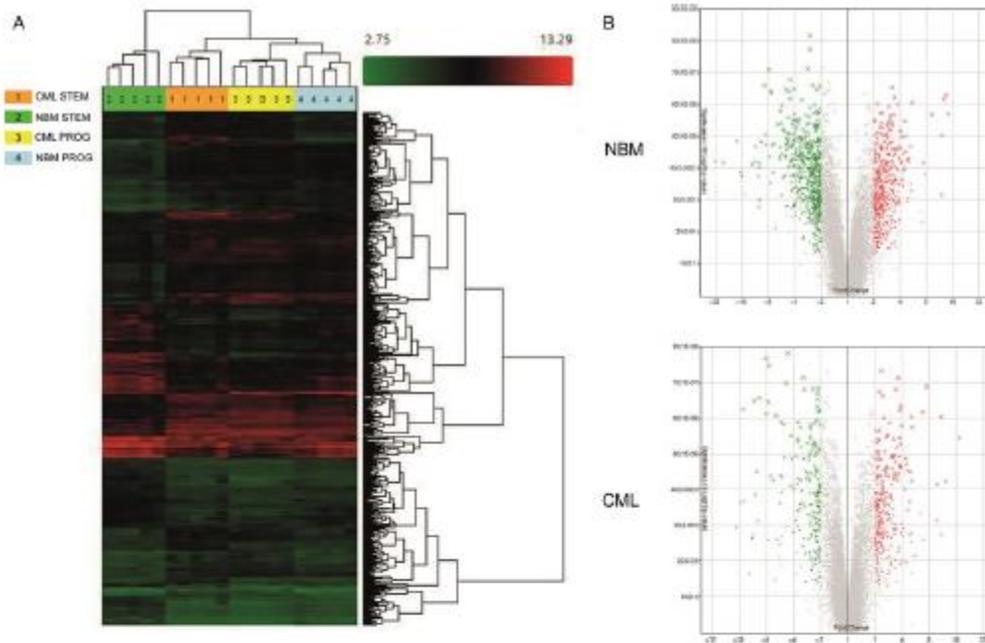


Figure 1. Differentially expressed genes between hematopoietic stem and progenitor cells from CML and normal bone marrow (NBM). (A) Hierarchical cluster shows 2298 genes differentially expressed between NBM and CML HSCs (STEM) and HPCs (PROG). Samples are in columns, genes are in rows. NBM- and CML-derived CD34⁺ CD38⁻ Lin⁻ and CD34⁺ CD38⁺ Lin⁻ cells ($n = 5$) were compared using the TAC Affymetrix software, considering a fold change in 2.0 and $P < 0.05$. (B) The volcano plot shows 1093 genes differentially expressed between stem and progenitor cells from NBM (476 genes upregulated -red- and 617 downregulated -green- in progenitor cells), and 497 genes differentially expressed in CML stem and progenitor cells (280 genes upregulated -red- and 217 genes downregulated -green- in progenitor cells). The analysis was made using TAC Affymetrix software, considering a fold change in 2.0 and $P < 0.05$.

(including ABI3BP, PREX2, HLF, EMP1, ARG2, DLK1, and CDH7) and 617 were downregulated (including CLC, MPO, CA1, CTSG, CD36, IRF8, CPA3, and ELANE). A similar comparison analysis between CML LSCs and HPCs showed 497 genes differentially expressed (Fig. 1C). Of these, 280 were upregulated in the progenitor population (including GAS2, PREX2, HLF, IGI, AMICA1, CACNA1D, and HLA-DQA1), whereas 217 genes were downregulated (including CLC, MPO, CA1, DH1, HDC, CD40L, LEF1, and MTSS1).

CML LSCs overexpress genes involved in DNA repair, cell cycle, and chromosome condensation

Comparative analysis of CD34⁺ CD38⁻ Lin⁻ cells from CML and hematologically normal subjects showed the differential expression of 584 genes (Fig. 2A). Of these, 340 were upregulated in CML cells (Fig. 2B) -including genes like GAS2, RXFP1, MAMDC2, PIEZO2, HPGDS, CPA3, DPP4, CACNA1D, (Table S1)- and 244 were

downregulated (Fig. 2B), as compared to normal cells, including ABI3BP, EMP1, PLAG1, PCDH9, ETV3, SELP, IL12RB2, and ID1 (Table S1). A functional annotation using DAVID software was performed to identify the biological processes that were preferentially represented, according with Gene Ontology (GO). When considering only upregulated genes, the most represented pathway was the one involving DNA metabolic processes, including genes that participate in DNA repair and replication, such as HMGB2, XRCC2, BLM, CHEK1, TYMS, CDC45, POLE2, FANCI, FANCF, and POLQ. The second most represented biologic process was cell cycle, including genes like CDC7, CDC6, HAUS6, KIF11, KIF15, SGOL1, KNTC1, and TTK. Genes that participate in chromosome condensation, including XPO1, MAD2L1, SGOL1, KNTC1, CASC5, SKA3, CENPK, and MLF1IP, corresponded to the third most represented biologic process (Fig. 3A).

When analysis was performed based on downregulated genes, the most represented process was negative regulation of transcription, with genes such as KLF4, KLF10, KLF11, ARID5A, ZHX2, PRDM16, ID2, ID1, BCL3, and

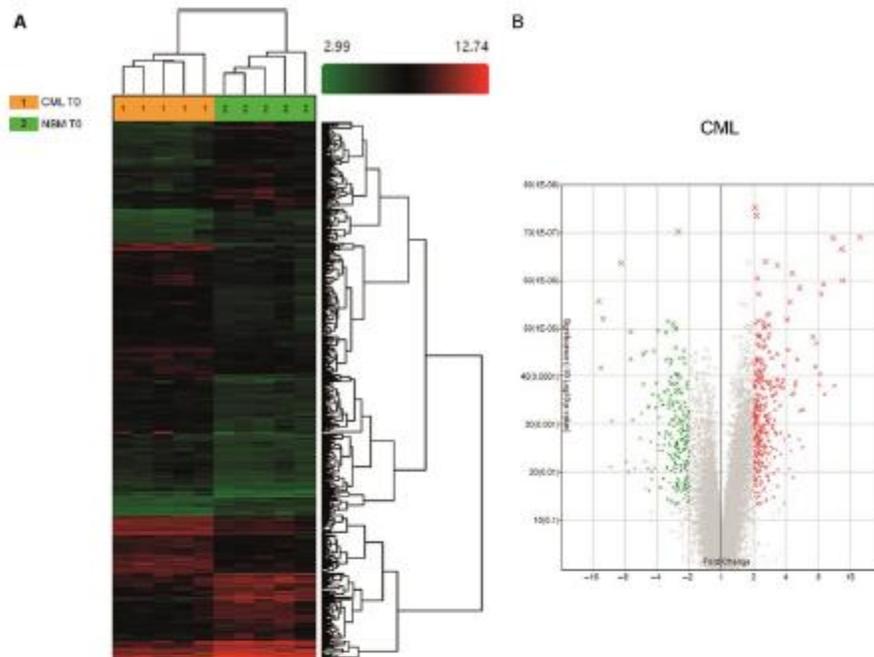


Figure 2. Differentially expressed genes between HSCs from CML and normal marrow. (A) Hierarchical clustering analysis using 584 differentially expressed genes between NBM and CML HSCs. Samples are in columns, genes are in rows. The analysis was made using TAC Affymetrix software, considering a fold change in 2.0 and $P < 0.05$. (B) Volcano plot of the 584 differentially expressed genes; 340 genes were upregulated (red) and 244 were downregulated (green) in CML cells. The analysis was made using TAC Affymetrix software considering 2.0 as a fold change and a $P < 0.05$.

ETV3. The Fibronectin Type III pathway was the second most downregulated pathway, including genes such as IL12RB2, IGF1R, SNED1, IL6ST, KAL1, SDK2, PTPRS, MPL, and ABI3BP. The third most downregulated pathway was cell adhesion, with genes such as ICAM1, SELP, EMCN, SDK2, PTPRS, PCDH9, NIN1, CDH2, and PCDH17, among others (Fig 3B).

CML progenitor cells overexpress genes involved in cholesterol biosynthesis and metabolism, and in the immune response

When comparing the gene expression profiles of CML and normal CD34⁺ CD38⁺ Lin⁻ cells, we found the differential expression of 198 genes (Fig. 4A). One hundred and one genes were upregulated in CML cells (Fig. 4B), including KYNU, MSMO1, RXFP1, CFH, HDC, DHCR24, SCN9A, and CCL5 (Table S2), whereas 97 were downregulated (Fig. 4B), including IRF8, SKIL, KCNA3, ELANE, ARHGAP32, CRHBP, NBP14, HCAR3, and ID2 (Table S2). When we performed the functional annotation, based on upregulated genes, the most represented biologic processes were cholesterol biosynthesis and metabolism,

including genes such as HMGCR, CYP51A1, DHCR7, and DHCR24, glycoprotein biosynthesis, including GYPB, GYPE, GCNT2, MAMDC2, TSPAN2, MANSC1, KCNK5, and ANGPT2, and the immune response, with genes such as CFHR1, KYNU, ENPP2, CD40LG, IFITM3, NCF4, CFH, and CCL5 (Fig. 5A). In terms of downregulated genes, the most represented processes were regulation of DNA binding, including ICAM1, ID2, ID1, SMAD7, BCL3, NLRP3, and TRIB1, cell adhesion, including ICAM1, SELP, CDH9, PKP2, SELL, SDK2, NIN1, CDH2, and CDH10, and defense response, including SELP, RNASE3, CXCL2, MND4, LYZ, BCL3, NLRP3, CD180, BLNK, and CXCL10, among others (Fig. 5B).

In vitro culture of normal and CML progenitor cells, with or without IM, induced changes in their gene expression profiles

In order to determine whether the in vitro culture of both normal and CML progenitor cells (CD34⁺ CD38⁺ Lin⁻ cells) would result in any changes in their gene expression profiles, a fraction of them (200,000 cells/mL) was cultured,

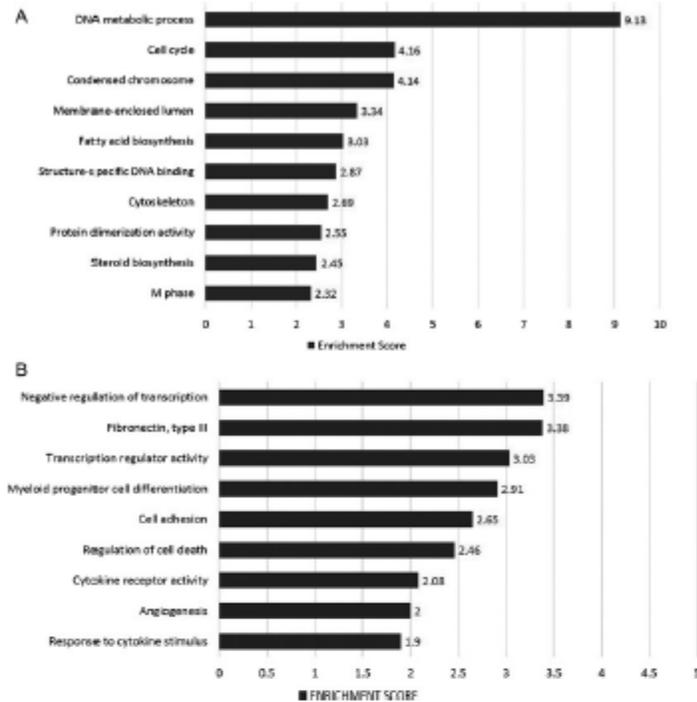


Figure 3. Most highly represented biologic processes/pathways that were upregulated (A) and downregulated (B) in CML HSCs as compared to their normal counterparts. Functional annotation in Gene Ontology categories was performed using the Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID) tool (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) and were classified in Gene Ontology categories.

right after they were obtained by cell sorting. Cells were cultured for 48 h in serum-free medium supplemented with 8 cytokines, with or without 2.5 $\mu\text{mol/L}$ IM. Cell numbers were also assessed to determine the effect of the drug on cell proliferation. As expected, cell proliferation was significantly inhibited by IM in cultures of CML progenitors (total cell numbers in the presence of IM were 52% of those at culture onset, before IM treatment); in contrast, in cultures of normal marrow-derived cells, IM had no effect on the total cell number after 2 days of culture (Figure S2).

Evaluation of gene expression profiles was performed before and after the culture period. When normal marrow-derived progenitors were cultured in the absence of IM, we found 1216 genes differentially expressed (489 upregulated and 727 downregulated) as compared to cells before culture. GO analysis based on upregulated genes showed that cell cycle, steroid biosynthesis and chromosome segregation were the most represented pathways (Fig. 6A), and genes such as MMP12, DHCR24, IL7R, CYP1B1, and GYP A were the most differentially expressed (Table S3). When considering downregulated genes, transcription regulation and apoptosis were the most represented

biologic processes (Fig. 6B), and JUN, FOSB, AREG, FOS, and DUSP1 were the top genes downregulated (Table S3). When cells were cultured in the presence of IM, 928 genes were differentially expressed at the end of the culture period; 441 were upregulated and 487 downregulated. It is noteworthy that several of the pathways and genes most represented in cells cultured in the absence of IM were also represented in cells cultured in the presence of the drug (Fig. 6C,D; Table S4).

When CML-derived progenitors were cultured without IM, 498 genes were found to be upregulated and 375 were downregulated, for a total of 873 genes differentially expressed. Interestingly, biologic processes that were significantly represented in the GO analysis for normal cells were also observed in CML cells. That is to say, in terms of upregulated genes, such processes included cell cycle, chromosome condensation, steroid biosynthesis and ATP binding (Fig. 7A), whereas transcription regulation and apoptosis were among the most represented in terms of downregulated genes (Fig. 7B). Some of the most upregulated genes included GYP A, HBA2, CYP1B1, PLK1, and PSAT1. On the other hand, JUN, FOSB, FOS, NR4A2, and DUSP1 were among the most downregulated genes (Table S5). When CML cells

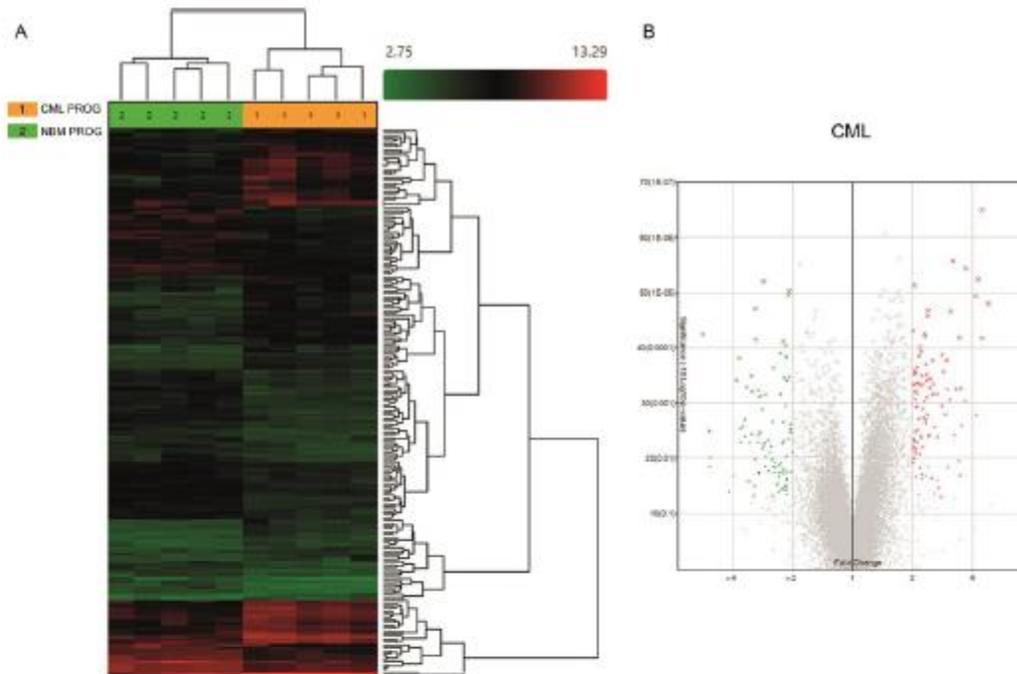


Figure 4. Differentially expressed genes between HPCs from CML and normal marrow. (A) Hierarchical clustering analysis using 198 differentially expressed genes between NBM and CML HSCs. Samples are in columns, genes are in rows. The analysis was made using TAC Affymetrix software, considering a fold change in 2.0 and $P < 0.05$. (B) Volcano plots of the 198 differentially expressed genes; 101 genes were upregulated (red) and 97 were downregulated (green) in CML cells. The analysis was made using TAC Affymetrix software considering 2.0 as a fold change and a $P < 0.05$.

were cultured with IM, 752 genes were differentially expressed; 455 genes were upregulated and 297 were downregulated. As for normal cells, several of the pathways and genes most represented in CML cells cultured in the absence of IM were also represented in cells cultured in its presence (Fig. 7C,D; Table S6).

PIEZO2, RXFP1, and MAMDC2 are preferentially expressed in CML HSCs

Based on the profile of individual genes that showed high expression levels in CML LSCs, as compared to their levels in normal HSCs (see list in Table S1), we focused on three particular genes: PIEZO2, RXFP1, and MAMDC2; so, their expression was determined by quantitative real-time PCR. Confirming the results shown in Table S1, we found that all three genes were markedly expressed in leukemic LSCs (Fig. 8). Interestingly, whereas PIEZO2 (Fig. 8A) and RXFP1 (Fig. 8B) were also expressed in leukemic HPCs at significant levels, MAMDC2 was practically absent in the progenitor population (Fig. 8C). When leukemic progenitors were cultured in the absence or in

the presence of IM, PIEZO2 and, to a lesser extent RXFP1, were still expressed; in contrast, MAMDC2 expression was not detected. In terms of genes that were downregulated in CML cells, we focused on ABI3BP and CDH2 (Fig. 8D and E). Expression levels of the former were very low in both CML LSCs and HPCs. Interestingly such levels were significantly increased in both cell types after the culture period, both in the absence or in the presence of IM (Fig. 8D). CDH2 expression levels, in contrast, were undetectable in CML progenitors at any condition (Fig. 8E).

Discussion

Among all human malignancies known to date, CML is arguably the best known in terms of its biology. Evidence presented by different groups indicate that this hematologic disorder arises at the level of a HSC that is transformed by means of a chromosomal translocation, resulting in the generation of a chimeric gene (*bcr-abl*), which encodes for an abnormally active tyrosine kinase. Such a cytogenetic and molecular alteration has been recognized as the hallmark of the disease, and in vivo animal models have

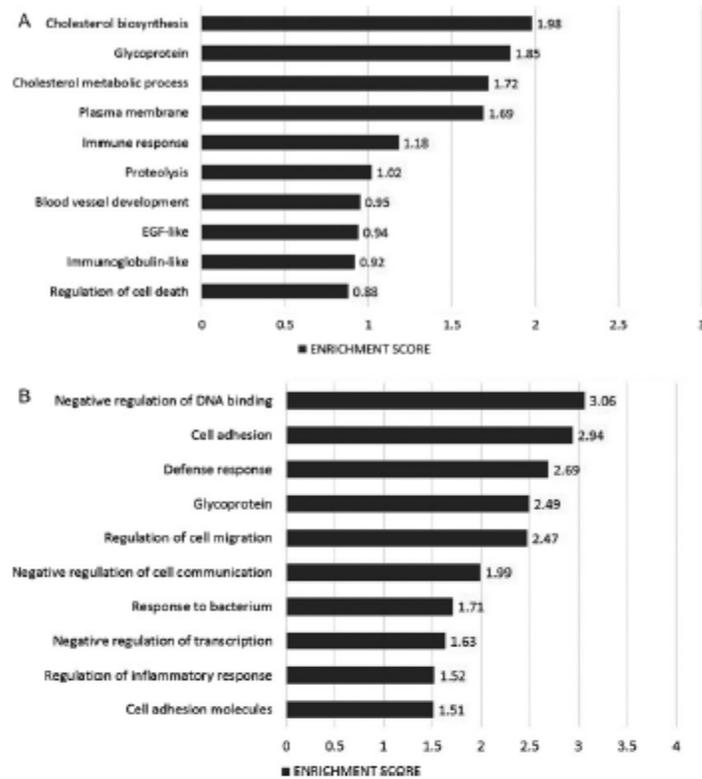


Figure 5. Most highly represented biologic processes/pathways that were upregulated (A) and downregulated (B) in CML HPCs as compared to their normal counterparts. Functional annotation in Gene Ontology categories was performed using the Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID) tool (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>) and were classified in Gene Ontology categories.

shown that *bcr-abl* is the sole molecular change responsible for CML induction [26]. Selective elimination of CML LSCs by targeted therapies has become a major goal in current hematology. Many efforts are being made in trying to develop novel and more effective ways, including both *bcr-abl*-dependent and independent mechanisms [27, 28], to kill CML LSCs without affecting their normal counterparts. Evidently, such an objective requires the full identification and physiological characterization of these primitive cells.

Normal and CML-derived HSCs share several biological features, including their immunophenotype ($CD34^+ CD38^- Lin^-$), their quiescence, their capacity to self-renew, and their ability to differentiate into myeloid, erythroid and lymphoid lineages. Indeed, in contrast to acute myeloid leukemia, in which there is a maturation arrest in the myeloid lineage, in CML the maturation program of the neoplastic cells does not seem to be altered, so that morphologically normal cells are being generated throughout the chronic phase of the disease [29]. In functional terms,

however, significant differences have been observed between normal HSCs and CML LSCs, both in vitro and in vivo [13, 30]. Such differences result from alterations in the molecular biology of leukemic LSCs that impact on their physiology. Hematopoietic progenitors from CML also show an altered biology, as compared to their normal counterparts, both in vivo and in vitro [30].

During the last few years, there has been great interest in assessing global gene expression profiles of HSCs and LSCs in order to identify particular genes that are differentially expressed in each cell type [23–25]. Genomic approaches have shown molecular signatures that distinguish chronic phase from accelerated phase and blast crisis at the MNC level [23], and at the level of $CD34^+$ cells [31]. In trying to contribute to our understanding of the molecular biology of CML stem and progenitor cells at the genomic level, in this study, we have performed a comparative analysis of the global gene expression profiles of CML and normal hematopoietic stem and progenitor cells. Using this approach, we have identified some of

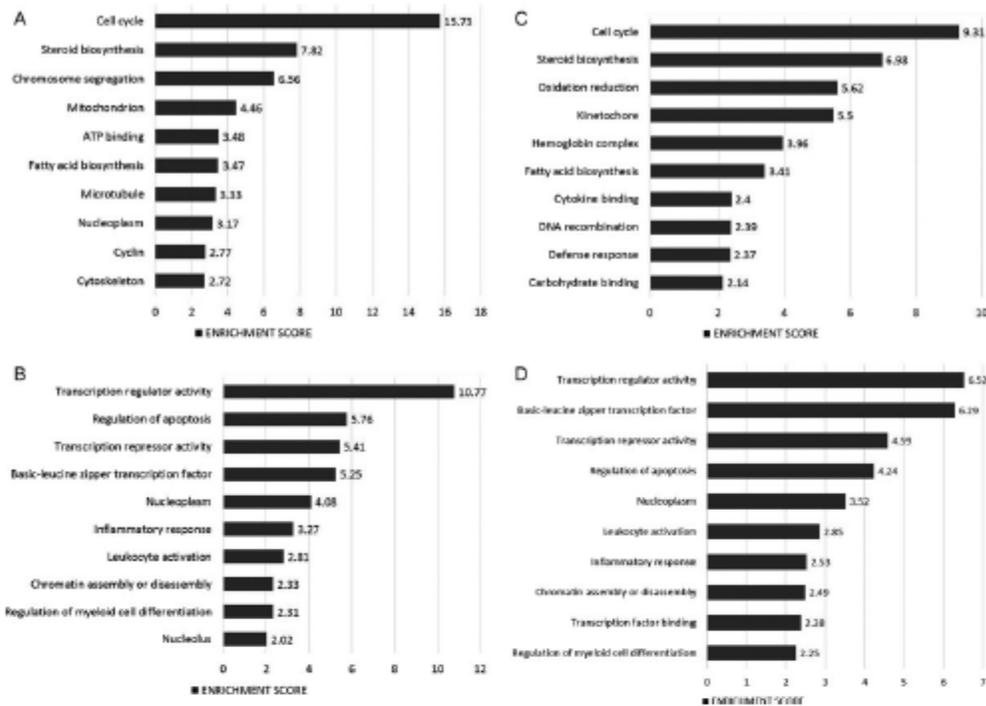


Figure 6. Most highly represented biologic processes/pathways in normal HPCs after *in vitro* culture. Figure shows the most upregulated (A) and downregulated (B) pathways after cells were cultured for 48 hours in the absence of IM, and the most upregulated (C) and downregulated (D) pathways when cells were cultured in the presence of the drug. Functional annotation in Gene Ontology categories was performed using the Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID) tool (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) and were classified in Gene Ontology categories.

the major pathways and specific genes that are differentially expressed in CML cells, as compared to their normal counterparts. We have further analyzed the expression profiles of these cells after they have been cultured *in vitro*, with or without IM.

Except for the work by Gerber and colleagues [25], most studies reported to date on the gene expression profiles of CML cells have used whole MNC or CD34⁺ cells as the target population. Thus, one of our initial goals was to perform such studies in specific CD34⁺ cell subpopulations, so we could assess differences between HSCs and HPCs from both normal subjects and CML patients. By using a cell sorting approach, we were able to obtain practically pure cell populations in terms of their immunophenotype (CD34⁺ CD38⁻ Lin⁻ cells, enriched for HSCs, and CD34⁺ CD38⁺ Lin⁻ cells, enriched for HPCs). However, in the case of CML-derived cells, such populations most likely consisted of a mixture of both Ph⁺ and Ph⁻ cells, since it is well known that in CML marrow, both leukemic and normal cells coexist within the same population. Although at this time we

cannot rule out the possibility that the presence of residual normal cells within the CML cell fractions could have influenced the results obtained, it was clear that each one of the four cell populations analyzed showed a particular gene expression profile. This suggests that the profiles observed for the leukemic cells are true reflections of the gene expression patterns of CML LSCs and HPCs.

When we compared the gene expression profiles of the four cell populations obtained, we found that the profiles of CML stem and progenitor cells were closer to the one of normal progenitors, whereas normal HSCs showed the most different expression profile of all. We also found that the expression profiles of LSCs and HPCs from CML marrow were closer to each other than the ones of HSCs and HPCs from normal marrow. Although it has been clearly shown that the LSC pool in CML is heterogeneous—consisting of several cell stages that differ in their capacity to initiate and sustain the leukemic population [21]—the exact cell of origin of leukemia and the mechanisms resulting in malignant transformation are still poorly understood. In this regard, our results seem to suggest

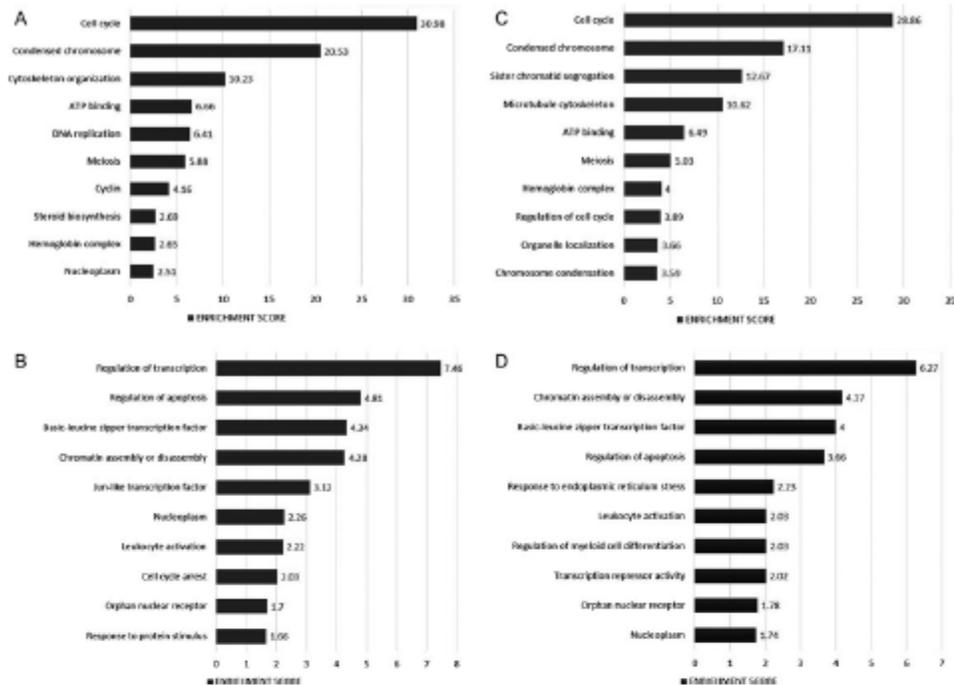


Figure 7. Most highly represented biologic processes/pathways in CML HPCs after in vitro culture. Figure shows the most upregulated (A) and downregulated (B) pathways after cells were cultured for 48 h in the absence of IM, and the most upregulated (C) and downregulated (D) pathways when cells were cultured in the presence of the drug. Functional annotation in Gene Ontology categories was performed using the Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID) tool (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) and were classified in Gene Ontology categories.

that, in CML, malignant transformation occurs within the HSC pool in a cell stage that is closer to the progenitor cell compartment than to the long-term HSC stage. Thus, the genomic profiles of LSCs are more similar to those of normal—and leukemic-HPCs than to those of normal HSCs. Interestingly, and supporting this idea, Jamieson and colleagues have presented evidence indicating that in blast crisis CML, granulocyte-macrophage progenitors may be the actual LSCs [32]. It is noteworthy, however, that our observations are in contrast to those of Gerber et al. These authors used a similar approach to ours and found that global gene expression patterns between normal HSCs and CML LSC-enriched fractions were closer to each other than normal HSCs were to their matched HPC-enriched cell fraction [25]. They also found that only 97 genes were differentially expressed between normal and CML CD34⁺ CD38⁻ Lin⁻ cells, which clearly differs from our study, in which 584 genes were differentially expressed. The reason(s) for such discrepancies are not clear; however, one possible explanation is that the cell populations analyzed in both studies were not exactly the same. That is to say, in their study, Gerber

and colleagues included ALDH expression levels as part of their cell purification strategy. We did not include such a molecule; thus, it is possible that the different results observed could be due, at least in part, to the differences in the cell sorting strategies that, in turn, resulted in cell fractions that are not absolutely comparable.

In spite of these differences, it is noteworthy that in the study by Gerber et al. as well as in our own study, analysis of the expression profiles of CML LSCs showed overexpression of genes involved in DNA repair, cell cycle and chromosome condensation, whereas genes involved in myeloid cell differentiation were downregulated. At the individual gene level, both studies, Gerber's and ours, showed that GAS2 and DPP4 were among the most overexpressed genes in CML HSCs. The protein encoded by GAS2 is a Caspase-3 substrate that plays important roles in cell shape, apoptosis, cell cycle, and calpain activities [33, 34]. GAS2 expression is altered in different types of cancer, such as colorectal cancer [35], and it is important to note that this gene has been found to be overexpressed in CD34⁺ cells from CML patients [36]. Similarly, DPP4

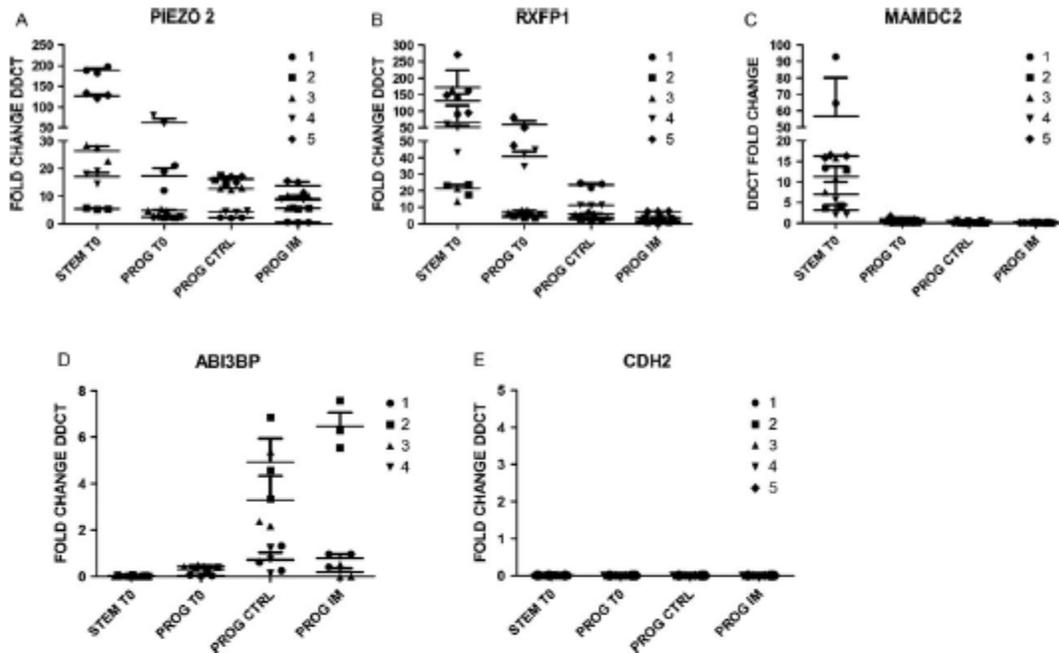


Figure 8. Quantification of five representative genes by real time qRT-PCR. Among all the genes that were differentially expressed between CML and NBM cells, based on microarray data, PIEZO2, RXFP1, MAMDC1, CDH2, and ABI3BP were selected to be assessed by qRT-PCR. Cell fractions analyzed corresponded to HSCs (STEM T0), HPCs before culture (PROG T0), HPCs after 48 hours of culture in the absence (PROG CTRL) or presence (PROG IM) of IM. The relative amount of each gene was determined using the $\Delta\Delta C_t$ method, normalized to GAPDH and NBM. For each gene quantification, five cell samples were used (1–5), that were different from those used for microarray analysis.

(CD26), a cell membrane enzyme that specifically disrupts the SDF1-CXCR4 axis, has been found to be highly expressed in CML CD34⁺ CD38⁻ Lin⁻ cells, whereas its expression in normal HSCs is low/absent [19]. This has led to the proposal that CD26 could be used as a biomarker for CML LSCs. Our results are clearly in keeping with those previous studies.

Among all the genes that were overexpressed in CML LSCs, we focused on three of them: PIEZO2, RXFP1 and MAMDC2. The reason to focus on those particular genes was a threefold. First, all of them showed a > 13-fold-change expression value, as compared to their expression levels in normal HSCs. Second, these three genes encode for cell membrane proteins, which indicates that such proteins could be used as potential biomarkers for CML LSCs. Third, although their function in some other cell types has been determined, their function in CML LSCs is not known. Indeed, it has been shown that PIEZO2 encodes for a transmembrane protein that has a role in mechanosensation, including rapidly adapting mechanically activated currents in somatosensory neurons [37, 38]. It has been reported that the majority of the myelinated sensory neurons projecting to the bone marrow express

PIEZO2 [39], and that this gene plays an important role as a critical regulator of tumor angiogenesis and vascular permeability [40]. Regarding the function of RXFP1, also known as LGR7, it is known that this gene encodes for a G protein-coupled cell membrane protein that is the receptor for relaxin [41]. Relaxin can exert a wide range of effects, including vasodilatation, anti-fibrotic effects, angiogenic, anti-apoptotic and anti-inflammatory effects [42]. Recent reports indicate that RXFP1 participates in the development of several types of cancer, including prostate cancer [43, 44]. In contrast to these two proteins, the role of MAMDC2 is still not clear. Its paralog MDGA2/MAMDC1 binds to CAMs, participating in cell adhesion; thus, it is possible that MAMDC2 is also involved in cell adhesion mechanisms. MDGA2/MAMDC1 acts as an anti-tumor molecule in gastric cancer [45]; however, the role of MAMDC2 in cancer, if any, has yet to be elucidated. Interestingly, MAMDC2 gene is mutated in patients with Kabuki syndrome, a multiple congenital anomaly/mental retardation syndrome characterized by a distinct facial appearance [46]. To date, the actual function of these three proteins in LSCs are still not understood, and further studies are needed to determine their particular roles in

the physiology of CML stem cells. Nonetheless, as mentioned above, these proteins could be used as biomarkers, with potential biological and clinical relevance, upon confirmation—in larger series of patients—of their high (selective) expression in LSCs from CML patients.

Regarding the expression profiles observed in hematopoietic progenitors, we found that gene pathways involved in cholesterol metabolism were among the most represented pathways. The significance of this observation is still not clear, however, it is noteworthy that a high incidence of low cholesterol values has been observed in CML patients [47], and some groups have found that such hypocholesterolemia can have prognostic significance [48]. In terms of downregulated pathways, cell adhesion was one of the most highly represented. This is in keeping with the fact that cell adhesion mechanisms are disrupted in CML, leading to the mobilization of immature cells into circulation. Indeed, it has been clearly shown, both *in vitro* and *in vivo*, that cell adhesion is one of the major biological processes that are affected in CML cells [1, 2, 49].

Recent work by John Dick's group in AML patients has shown that rather than immunophenotype, gene expression signatures define LSC function [50]. That is to say, it seems that stem cell expression programs are not exclusive of the CD34⁺ CD38⁻ Lin⁻ cell population, but persist in the progenitor (CD34⁺ CD38⁺ Lin⁻ cells) and blast (CD34⁻ CD38^{+/+} cells) populations, although at significantly lower levels. These and other observations point to the need for the development and validation of new LSC biomarkers. This is also true for stem cells in solid tumors. In keeping with this notion, this study contributes to the best of our knowledge on the global gene expression signatures of distinct primitive normal and leukemic hematopoietic cell populations, and identifies three new potential biomarkers (PIEZO2, RXFP1, and MAMDC2) for LSC.

Trying to understand, at the genomic level, the effects of IM and other tyrosine kinase inhibitors on CML patients, and the molecular nature of TKI resistance, based on gene expression profiles, has been an important goal for several groups. In this regard, significant progress has been made over the last few years [23, 24, 51–53]. To date, however, and to the best of our knowledge, the genomic changes induced by *in vitro* administration of IM to pure populations of HPCs have not been reported. In trying to determine whether the *in vitro* culture of both normal and CML progenitor cells would affect their gene expression profiles, such cell populations were cultured for a two-day period under standard conditions, without or with IM. It is important to point out that this type of experiments were not conducted in cultures of HSCs or LSCs due to the extremely low number of cells obtained.

In vitro culture of HPCs resulted in significant changes in their gene expression profiles. For normal cells, over 1200 genes were differentially expressed; cell cycle, steroid biosynthesis and chromosome segregation were among the most upregulated pathways, whereas transcription regulation and apoptosis were among the most downregulated biologic processes. When IM was added to the cultures we observed that the expression of almost one thousand genes was altered and several of the pathways and genes most represented in cells cultured in the absence of IM were also represented in cells cultured in the presence of the drug. Culture of CML progenitors also caused changes in the expression of several hundred genes (over 850 genes in cultures without IM and over 750 genes in the presence of the drug). As for normal cells, cell cycle, chromosome condensation, steroid biosynthesis and ATP binding were among the most represented biologic processes that were upregulated, whereas transcription regulation and apoptosis were among the most represented pathways in terms of downregulated genes. These findings indicate that the simple fact of culturing cells in serum-free liquid medium in the presence of an eight-cytokine combination induced important changes in the expression patterns of a significant number of genes. It seems very likely that such changes were induced by the stimulatory cytokines added to the culture medium; however, further studies should be performed to determine the actual factor(s) causing such changes. Interestingly, the changes observed were similar regardless of the absence or the presence of IM. The reason for this is not completely clear, however, it seems very likely that the eight-cytokine cocktail exerted such a strong effect, "forcing" the cells to display a particular gene expression profile, and the presence of IM changed such a profile only in a slight manner. In CML cells, the reduced proliferation observed in cultures supplemented with IM could be due to changes in the expression of a particular gene (including one or more of those listed in Table S6). However, it is also possible that such an effect is not due to significant changes, but rather subtle changes in the level of expression of specific genes.

In summary, in this study we have determined the gene expression profiles of bone marrow-derived cell fractions, obtained from normal subjects and CML patients, that were highly enriched for hematopoietic stem (HSCs) and progenitor (HPCs) cells. Our results indicate that the profiles of CML stem and progenitor cells were closer to the one of normal progenitors, whereas normal HSCs showed the most different expression profile of all. We found that the expression profiles of LSCs and HPCs from CML marrow were closer to each other than the ones of HSCs and HPCs from normal marrow. The major biologic processes dysregulated in CML cells

included DNA repair, cell cycle, chromosome condensation, cell adhesion, and the immune response. We have also determined the genomic changes in both normal and CML progenitor cells under culture conditions, and found that several genes involved in cell cycle, steroid biosynthesis and chromosome segregation were upregulated, whereas genes involved in transcription regulation and apoptosis were downregulated. Interestingly, these changes were basically the same, regardless of the addition of IM to the culture. Finally, we have identified three genes—PIEZO2, RXFP1, and MAMDC2— that are preferentially expressed by CML primitive cells and that encode for cell membrane proteins; thus, they are potential biomarkers for CML stem cells.

Acknowledgments

This study was supported by grant no. SALUD 2007-C01-69664 from the Mexican Council of Science and Technology (CONACYT) to HM. Sócrates Avilés-Vázquez was a doctoral student from *Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)* and he received fellowships from CONACYT (fellowship no. 202849) and the Mexican Institute of Social Security (IMSS; fellowship no. 2011082).

Conflict of Interest

None declared.

References

- Goldman, J. M., and J. V. Melo. 2003. Chronic myeloid leukemia – advances in biology and new approaches to treatment. *N. Engl. J. Med.* 349:1449–1462.
- Sawyers, C. L. 1999. Chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 340:1330–1340.
- Maru, Y. 2012. Molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Cancer Sci.* 103:1601–1610.
- Quintas-Cardama, A., and J. Cortés. 2009. Molecular biology of bcr-abl-positive chronic myeloid leukemia. *Blood* 113:1619–1630.
- Jabbour, E. J., J. E. Cortes, and H. M. Kantarjian. 2013. Tyrosine kinase inhibition: a therapeutic target for the management of chronic phase-chronic myeloid leukemia. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 13:1433–1452.
- Druker, B. J. 2009. Perspectives on the development of imatinib and the future of cancer research. *Nat. Med.* 15:1149–1152.
- Druker, B. J., M. Talpaz, D. J. Resta, B. Peng, E. Buchdunger, J. M. Ford, et al. 2001. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *New Engl. J. Med.* 344:1031–1037.
- Kantarjian, H., C. Sawyers, A. Hochhaus, F. Guilhot, C. Schiffer, C. Gambacorti-Passerini, et al. 2002. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *New Engl. J. Med.* 346:645–652.
- Branford, S., Z. Rudzki, S. Walsh, I. Parkinson, A. Grigg, J. Szer, et al. 2003. Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate binding loop (P loop) are associated with a poor prognosis. *Blood* 102:276–283.
- Valent, P. 2008. Emerging stem cell concepts for imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia: implications for the biology, management, and therapy of the disease. *Br. J. Haematol.* 142:361–378.
- Diamond, J., and J. Melo. 2011. Mechanisms of resistance to BCR-ABL kinase inhibitors. *Leuk. Lymph.* 52(S1):12–22.
- Ichim, C. V. 2014. Kinase-independent mechanisms of resistance of leukemia stem cells to tyrosine kinase inhibitors. *Stem Cells Transl. Med.* 3:405–415.
- Holyoake, T., X. Jiang, M. W. Drummond, A. C. Eaves, and C. J. Eaves. 2002. Elucidating critical mechanisms of deregulated stem cell turnover in the chronic phase of chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 16:549–558.
- Marley, S. B., and M. Y. Gordon. 2005. Chronic myeloid leukemia: stem cell derived but progenitor cell driven. *Clin. Sci.* 109:13–25.
- Moreno-Lorenzana, D., S. Avilés-Vázquez, M. A. Sandoval-Esquivel, A. Alvarado Moreno, V. Ortiz-Navarrete, H. Torres-Martínez, et al. 2016. CDK1s p18(INK4c) and p57(Kip2) are involved in quiescence of CML leukemic stem cells after treatment with TKI. *Cell Cycle* 15:1276–1287.
- Morrison, S. J., and D. T. Scadden. 2014. The bone marrow niche for hematopoietic stem cells. *Nature* 505:327–334.
- Zhang, B., Y. W. Ho, Q. Huang, T. Maeda, A. Lin, S. Lee, et al. 2012. Altered microenvironmental regulation of leukemic and normal stem cells in chronic myelogenous leukemia. *Cancer Cell* 21:577–592.
- Sadovnik, I., A. Hoelbl-Kovacic, H. Herrmann, G. Eisenwort, S. Cerny-Reiterer, W. Warsch, et al. 2016. Identification of CD25 as STAT5-Dependent Growth Regulator of Leukemic Stem Cells in Ph+ CML. *Clin. Cancer Res.* 22:2051–2061.
- Herrmann, H., I. Sadovnik, S. Cerny-Reiterer, T. Rulicke, G. Stefanzi, M. Willmann, et al. 2014. Dipeptidylpeptidase IV (CD26) defines leukemic stem cells (LSC) in chronic myeloid leukemia. *Blood* 123:3851–3962.
- Jaras, M., P. Johnels, N. Hansen, H. Agerstam, P. Tsapogas, M. Rissler, et al. 2010. Isolation and killing of candidate chronic myeloid leukemia stem cells by

- antibody targeting of IL-1 receptor accessory protein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 107:16280–16285.
21. Zhang, B., L. Li, Y. Ho, M. Li, G. Marcucci, W. Tong, et al. 2016. Heterogeneity of leukemia-initiating capacity of chronic myelogenous leukemia stem cells. *J. Clin. Invest.* 126:975–991.
 22. Li, L., L. Wang, L. Li, Z. Wang, Y. Ho, T. McDonald, et al. 2012. Activation of p53 by SIRT1 inhibition enhances elimination of CML leukemia stem cells in combination with Imatinib. *Cancer Cell* 21:266–281.
 23. Radich, J. P., H. Dai, M. Mao, V. Oehler, J. Schelter, B. Druker, et al. 2006. Gene expression changes associated with progression and response in chronic myeloid leukemia. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 103:2794–2799.
 24. McWeeney, S. K., L. C. Pemberton, M. M. Poriaux, K. Vartanian, S. G. Willis, G. Yochum, et al. 2010. A gene expression signature of CD34⁺ cells to predict major cytogenetic response in chronic-phase chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib. *Blood* 115:315–325.
 25. Gerber, J. M., J. L. Gucwa, D. Esopi, M. Gurel, M. C. Haffner, M. Vala, et al. 2013. Genome-wide comparison of the transcriptomes of highly enriched normal and chronic myeloid leukemia stem and progenitor cell populations. *Oncotarget* 4:715–728.
 26. Kovacic, B., A. Hoelbl, G. Litos, M. Alacaptan, C. Schuster, K. M. Fischhuber, et al. 2012. Diverging fates of cells of origin in acute and chronic leukaemia. *EMBO Mol. Med.* 4:1–15.
 27. Van Etten, R. A., M. Mauro, J. P. Radich, J. M. Goldman, G. Saglio, C. Jamieson, et al. 2013. Advances in the biology and therapy of chronic myeloid leukemia (CML): Proceedings of the 6th post-ASH CML and myeloproliferative neoplasms workshop. *Leuk. Lymphoma* 54:1151–1158.
 28. Chavez-Gonzalez, A., S. Centeno-Llanos, D. Moreno-Lorenzana, M. A. Sandoval-Esquivel, S. Aviles-Vazquez, M. E. Bravo-Gomez, et al. 2017. Casiopeina III-Ea, a copper-containing small molecule, inhibits the in vitro growth of primitive hematopoietic cells from chronic myeloid leukemia. *Leuk. Res.* 52:8–19.
 29. Petzer, A. L., and E. Gunsilius. 2003. Hematopoietic stem cells in chronic myeloid leukemia. *Arch. Med. Res.* 34:496–506.
 30. Mayani, H., E. Flores-Figueroa, and A. Chavez-Gonzalez. 2009. In vitro biology of human myeloid leukemia. *Leuk. Res.* 33:624–637.
 31. Zheng, C., L. Li, M. Haak, B. Brors, O. Frank, M. Giehl, et al. 2006. Gene expression profiling of CD34⁺ cells identifies a molecular signature of chronic myeloid leukemia blast crisis. *Leukemia* 20:1028–1034.
 32. Jamieson, C. H. M., L. E. Ailles, S. J. Dylla, M. Muijtjens, C. Jones, J. L. Zehnder, et al. 2004. Granulocyte-Macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. *N. Engl. J. Med.* 351:657–667.
 33. Schneider, C., R. M. King, and L. Philipson. 1988. Genes specifically expressed at growth arrest in mammalian cells. *Cell* 54:787–793.
 34. Benetti, R., G. Del Sal, M. Monte, G. Paroni, C. Brancolini, and C. Schneider. 2001. The death substrate Gas2 binds m-calpain and increases susceptibility to p53-dependent apoptosis. *EMBO J.* 20:2702–2714.
 35. Chang, C. C., C. C. Huang, S. H. Yang, C. C. Chien, C. L. Lee, and C. J. Huang. 2016. Data on clinical significance of GAS2 in colorectal cancer cells. *Data Brief.* 8:82–86.
 36. Zhou, H., Y. Ge, L. Sun, W. Ma, J. Wu, X. Zhang, et al. 2014. Growth Arrest Specific 2 is up-regulated in chronic myeloid leukemia cells and required for their growth. *PLoS ONE* 9:e86195.
 37. Coste, B., J. Mathur, J. Schmidt, T. J. Earley, S. Ranade, M. J. Petrus, et al. 2010. Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science* 330:55–60.
 38. Chesler, A. T., M. Szczot, D. Bharucha-Goebel, M. Ceko, S. Donkervoort, C. Laubacher, et al. 2016. The role of piezo2 in human mechanosensation. *N. Engl. J. Med.* 375:1355–1364.
 39. Nencini, S., and J. Ivanusic. 2017. Mechanically sensitive Aδ nociceptors that innervate bone marrow respond to changes in intra-osseous pressure. *J. Physiol.* 595:4399–4415. <https://doi.org/10.1111/jp273877>.
 40. Yang, H., C. Liu, R. M. Zhou, J. Yao, X. M. Li, Y. Shen, et al. 2016. Piezo2 protein: a novel regulator of tumor angiogenesis and hyperpermeability. *Oncotarget* 7:44630–44643.
 41. Kern, A., and G. D. Bryant-Greenwood. 2009. Mechanisms of relaxin receptor (LGR7/RXFP1) expression and function. *Ann. NY Acad. Sci.* 1160:60–66.
 42. Sarwar, M., X. J. Du, T. B. Dschietziq, and R. J. Summers. 2017. The actions of relaxin in the cardiovascular system. *Br. J. Pharmacol.* 174:933–949. <https://doi.org/10.1111/bph.13523>.
 43. Feng, S., I. Agoulnik, A. Truong, Z. Li, C. Creighton, E. Kaftanovskaya, et al. 2010. Suppression of relaxin receptor RXFP1 decreases prostate cancer growth and metastasis. *Endocr. Relat. Cancer* 17:1021–1033.
 44. Klonisch, T., A. Glogowska, T. Thanusupawat, M. Burg, J. Krcek, M. Pitz, et al. 2017. Structural commonality of C1q TNF-related proteins and their potential to activate relaxin/insulin-like family peptide receptor 1 signalling pathways in cancer cells. *Br. J. Pharmacol.* 174:1025–1033. <https://doi.org/10.1111/bph.13559>.
 45. Wang, K., Q. Liang, X. Li, H. Tsoi, J. Zhang, H. Wang, et al. 2016. MDGA2 is a novel tumour suppressor

- cooperating with DMAP1 in gastric cancer and is associated with disease outcome. *Gut* 65:1619–1631.
46. Kuniba, H., K. Yoshiura, T. Kondoh, H. Ohashi, K. Kuroswa, H. Tonoki, et al. 2009. Molecular karyotyping in 17 patients and mutation screening in 41 patients with Kabuki syndrome. *J. Hum. Genet.* 54:304–309.
 47. Marini, A., G. Carulli, A. Azarà, B. Grassi, and F. Ambrogi. 1989. Serum cholesterol and triglycerides in hematological malignancies. *Acta Haematol.* 81:75–79.
 48. Muller, C. P., A. U. Wagner, C. Maucher, and B. Steinke. 1989. Hypocholesterolemia, an unfavorable feature of prognostic value in chronic myeloid leukemia. *Eur. J. Haematol.* 43:235–239.
 49. Wertheim, J. A., J. P. Miller, L. Xu, Y. He, and W. S. Pear. 2002. The biology of chronic myelogenous leukemia: mouse models and cell adhesion. *Oncogene* 21:8612–8628.
 50. Eppert, K., K. Takenaka, E. R. Lechman, L. Waldron, B. Nilsson, P. van Galen, et al. 2011. Stem cell gene expression programs influence clinical outcome in human leukemia. *Nat. Med.* 17:1086–1093.
 51. De Lavallade, H., P. Finetti, N. Carbuccia, J. N. Khorashad, A. Charbonnier, L. Foroni, et al. 2010. A gene expression signature of primary resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Leuk. Res.* 34:254–257.
 52. Long, M. D., P. R. van den Berg, J. L. Russell, P. K. Singh, S. Battaglia, and M. J. Campbell. 2015. Integrative genomic analysis in K562 chronic myelogenous leukemia cells reveals that proximal NCOR1 binding positively regulates genes that govern erythroid differentiation and imatinib sensitivity. *Nucleic Acids Res.* 43:7330–7348.
 53. Cha, K., Y. Li, and G. S. Yi. 2016. Discovering gene expression signatures responding to tyrosine kinase inhibitor treatment in chronic myeloid leukemia. *BMC Med. Genomics* 9(Suppl 1):29.

Supporting Information

Additional supporting information may be found in the online version of this article:

Table S1. Top ten genes differentially expressed between normal and CML HSCs.

Table S2. Top ten genes differentially expressed between normal and CML HPCs.

Table S3: Top ten genes differentially expressed between normal HPCs before and after in vitro culture without IM.

Table S4. Top ten genes differentially expressed between normal HPCs before and after in vitro culture with IM.

Table S5. Top ten genes differentially expressed between CML HPCs before and after in vitro culture without IM.

Table S6. Top ten genes differentially expressed between CML HPCs before and after in vitro culture with IM.

Figure S1. Purification of HSCs and HPCs.

Figure S2. Effect of IM on the proliferation of HPCs derived from normal (NBM) and CML bone marrow.