



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

EFFECTO DE LA PARTENOLIDA Y DMAPT EN LA PERMANENCIA IN VITRO DE CÉLULAS  
TRONCALES DE LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA

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

PRESENTA:  
ANA GABRIELA FLORES LÓPEZ

DIRECTOR DE TESIS  
DR. HÉCTOR MAYANI VIVEROS  
FACULTAD DE MEDICINA  
COMITÉ TUTOR  
DRA. DIANA MARÍA ESCALANTE ALCALDE  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR  
DR. JORGE MELENDEZ ZAJGLA  
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

CIUDAD DE MÉXICO SEPTIEMBRE DE 2019



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.



## AGRADECIMIENTOS

Agradezco el apoyo brindado para la realización de este proyecto a:

Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas

Universidad Nacional Autónoma de México

Consejo Nacional de ciencia y Tecnología

(CONACYT) Número de becario: 290131

Instituto Mexicano del Seguro Social

(IMSS) Número de becario: 99096794

A su vez agradezco al comité tutorial por su apoyo y sus valiosas aportaciones en la realización de este proyecto:

Dr. Héctor Mayani Viveros

Dra. Diana María Escalante Alcalde

Dr. Jorge Melendez Zagjla

Quiero agradecer de manera especial a la Dra. Antonieta Chávez por su tiempo, generosidad y paciencia al guiarme en la realización de este proyecto.

Además, agradezco a la Dra. Monica Guzmán del Weill Cornell Medical College por su visión, paciencia y apoyo en recursos, ya que este proyecto no existiría sin su línea de investigación en nuevas terapias para Leucemias Mieloides.

Por último, agradezco al Dr. Vignir Helgason del Wolfson Wohl Cancer Research Institute, por sus comentarios y por recibirme en su laboratorio para completar parte de los experimentos que componen el presente trabajo.

## Tabla de contenido

<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>1</b>
<b>I. RESUMEN .....</b>	<b>4</b>
<b>II. ABSTRACT .....</b>	<b>6</b>
<b>III. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>8</b>
<b>1. 1.HEMATOPOYESIS .....</b>	<b>8</b>
1.1 La concepción de las Células troncales .....	8
1.1.1 Las Células Troncales Hematopoyéticas .....	9
1.1.2 El descubrimiento de las CTH .....	10
1.1.3 El inmunofenotipo de las CTH.....	13
1.1.4 El microambiente hematopoyético .....	16
1.1.4.1 Nicho endosteal.....	19
1.1.4.2 Nicho vascular.....	21
<b>2. 2. CANCER.....</b>	<b>23</b>
2.1 El modelo de las Células Troncales Cancerosas .....	24
2.2 La leucemia .....	26
2.2.1 Las neoplasias mieloides.....	26
2.2.2 La Leucemia Mieloide Crónica .....	26
2.2.2.1 Descubrimiento .....	26
2.2.2.2 El cromosoma Philadelphia y sus variantes .....	28
2.2.2.3 Función nativa de los genes ABL y BCR.....	29
2.2.2.4 La oncoproteína Bcr-Abl .....	30
2.2.2.5 Transactivación de Bcr-Abl .....	32
2.2.2.6 Evolución de la Leucemia Mieloide Crónica .....	32
2.2.2.6 Las CTL de LMC .....	33
2.2.2.6 Algunos tratamientos en leucemia .....	36
Primeros tratamientos.....	36
Quimioterapias .....	36
Trasplante .....	37
Interferon alfa.....	37
Inhibidores de tirosinas cinasas (ITC).....	38
Primera generación .....	38
Segunda generación .....	39
Tercera generación .....	40
2.2.2.7 Otros blancos terapéuticos en CT de LMC.....	40
El Factor de transcripción NF-κB.....	40
Especies Reactivas de Oxígeno .....	42
2.2.2.8 Partenolida y DMAPT.....	44
<b>IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>47</b>
<b>V. OBJETIVOS.....</b>	<b>49</b>
<b>1. OBJETIVOS GENERALES .....</b>	<b>49</b>
<b>2. OBJETIVOS PARTICULARES .....</b>	<b>49</b>
<b>VI. HIPÓTESIS.....</b>	<b>50</b>
<b>VII. MATERIALES Y METODOS .....</b>	<b>51</b>
<b>1. PACIENTES Y OBTENCION DE MUESTRAS.....</b>	<b>51</b>

2.	SEPARACION Y ENRIQUECIMIENTO DE CELULAS HEMATOPOYETICAS.....	51
3.	COMPUESTOS E INHIBIDORES .....	52
4.	LINEAS CELULARES Y CONDICIONES DE CULTIVO .....	53
5.	DETERMINACION DE IC50.....	53
6.	CULTIVO DE CELULAS FORMADORAS DE COLONIAS .....	54
7.	ENSAYO DE MUERTE CELULAR .....	54
8.	ENSAYO DE PROLIFERACION CELULAR.....	55
9.	DETECCION DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS) .....	55
10.	DETERMINACION DE ESTADO EN CICLO CELULAR Y REGULADORES DE CICLO .....	56
11.	LOCALIZACION INTRACELULAR DE PROTEÍNAS POR INMUNOFLUORESCENCIA .....	56
12.	INMUNOBLOT.....	57
12.1	Lisis celular.....	57
12.2	Electroforesis en gel.....	58
12.3	Transferencia de proteína.....	58
12.4	Bloqueo y detección .....	58
13.	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL (qPCR) .....	59
14.	CITOMETRÍA DE FLUJO .....	60
15.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	60
<b>VIII.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>61</b>
16.	<b>1. CITOTOXICIDAD DE PTL Y DMAPT.....</b>	<b>61</b>
16.1	Efecto sobre la viabilidad en líneas celulares y análisis probit .....	61
16.2	Efecto de PTL y DMAPT en muestras primarias.....	63
16.3	Capacidad formadora de colonias (CFU).....	64
17.	<b>2. EFECTO SOBRE LA MUERTE CELULAR .....</b>	<b>66</b>
18.	<b>3. EL PAPEL DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS) EN EL TRATAMIENTO CON PTL Y DMAPT .....</b>	<b>72</b>
18.1	Efecto del tratamiento sobre los niveles de ROS.....	72
18.2	Cinética del estrés oxidativo inducido por PTL y DMAPT.....	72
18.3	Activación del sistema NrF2.....	74
18.4	Dependencia en ROS en la inducción de muerte celular .....	75
19.	<b>4. FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NF-κB.....</b>	<b>77</b>
19.1	Localización de NF-κB .....	79
19.2	Fosforilación de NF-κB .....	79
19.3	Actividad transcripcional de NF-κB.....	80
20.	<b>5. PROLIFERACION Y CICLO CELULAR .....</b>	<b>82</b>
20.1	Retraso en la proliferación celular .....	82
20.2	Estado en el ciclo celular y dependencia en ROS.....	84
20.3	Efecto en los niveles de reguladores de ciclo. ....	85
<b>IX.</b>	<b>DISCUSION.....</b>	<b>89</b>
1.	<b>PÉRDIDA DE VIABILIDAD EN CÉLULAS EXPUESTAS A PTL Y DMAPT .....</b>	<b>89</b>
2.	<b>PTL Y DMAPT INDUCEN MUERTE CELULAR EN LMC .....</b>	<b>91</b>
3.	<b>PTL Y DMAPT INDUCEN MUERTE CELULAR INDEPENDIENTE DE CASPASAS .....</b>	<b>92</b>
4.	<b>PTL Y DMAPT INDUCEN NIVELES DE ROS EN CÉLULAS DE LMC .....</b>	<b>93</b>
5.	<b>PTL Y DMAPT INHIBEN LA ACTIVACION DE NF-κB .....</b>	<b>97</b>
6.	<b>PTL Y DMAPT INHIBEN LA PROLIFERACION EN CELULAS DE LMC .....</b>	<b>99</b>
7.	<b>LA INHIBICION DE LA PROLIFERACION VIENE ACOMPAÑADA DE UN ARRESTO EN EL CICLO CELULAR.....</b>	<b>100</b>
<b>X.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>101</b>
<b>XI.</b>	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>103</b>

<b>XII. ANEXO.....</b>	<b>105</b>
<b>XIII. LITERATURA CITADA .....</b>	<b>107</b>

### Índice de figuras

<b>Figura 1. Diagrama que esquematiza las firmas del Cáncer y los blancos terapéuticos que representan, por Hanahan y Weinberg .....</b>	<b>23</b>
<b>Figura 2. Representación de las variantes de Bcr-Abl .....</b>	<b>28</b>
<b>Figura 3. Representación de la estructura de las cinasas SCR, ABL1b y Bcr-Abl1.....</b>	<b>30</b>
<b>Figura 4. Representación de mecanismos de señalización activados constitutivamente por BCR-ABL .....</b>	<b>31</b>
<b>Figura 5. Representación de blancos terapéuticos en CTL .....</b>	<b>43</b>
<b>Figura 6. Viabilidad en células expuestas a PTL o DMAPT. ....</b>	<b>62</b>
<b>Figura 7. PTL y DMAPT inhiben células primitivas y blastos de LMC .....</b>	<b>65</b>
<b>Figura 8. Ensayo de formación de colonias (CFU) .....</b>	<b>67</b>
<b>Figura 9. Muerte celular en líneas celulares .....</b>	<b>69</b>
<b>Figura 10. Muerte celular en células mononucleares .....</b>	<b>70</b>
<b>Figura 11. Mecanismo de muerte celular en células expuestas a PTL y DMAPT .....</b>	<b>71</b>
<b>Figura 12. PTL y DMAPT inducen Especies Reactivas de Oxígeno en células de LMC .....</b>	<b>73</b>
<b>Figura 13. PTL y DMAPT inducen la activación del sistema keap1 en células de LMC .....</b>	<b>75</b>
<b>Figura 14. La inducción de ROS por PTL y DMAPT es reversible por tratamiento con NAC ....</b>	<b>77</b>
<b>Figura 15. La inducción a muerte celular por PTL y DMAPT es dependiente del aumento en ROS .....</b>	<b>78</b>
<b>Figura 16. PTL y DMAPT inhiben la localización nuclear de NF-kB en células de LMC .....</b>	<b>81</b>
<b>Figura 17. El tratamiento con PTL y DMAPT se ve acompañado de inhibición de NF-kB en células de LMC .....</b>	<b>83</b>
<b>Figura 18. El tratamiento con PTL y DMAPT retrasa la proliferaci[on celular .....</b>	<b>86</b>
<b>Figura 19. El PTL y DMAPT inducen arresto en fase G0 en células de LMC en un mecanismo independiente de Especies Reactivas de Oxígeno .....</b>	<b>87</b>
<b>Figura 20. Efecto de PTL y DMAPT en los niveles de reguladores del ciclo celular .....</b>	<b>88</b>

<b>Figura Anexo 1. Analisis Probit en células Meg-01..</b> .....	<b>105</b>
<b>Figura Anexo 2. Análisis Probit en células HL60 .....</b>	<b>105</b>
<b>Figura Anexo 3. Análisis Probit en células Kcl22 .....</b>	<b>106</b>
<b>Figura Anexo 4. Análisis Probit en células k562 .....</b>	<b>106</b>

### **Índice de tablas**

<b>Tabla 1. Criterios clínicos para el diagnóstico de Fase Acelerada y Crisis Blástica según la OMS</b> .....	<b>33</b>
<b>Tabla 2. Criterios de respuesta al tratamiento .....</b>	<b>34</b>
<b>Tabla 3. Valores de CI50 .....</b>	<b>63</b>



## ABREVIATURAS

7AAD: 7-actinomicina D

ABL: Tirosina de Abelson

ADN: Acido Desoxiribonucleico

ATP: Adenosin Trifosfato

ARN: Ácido Ribonucleico

BCR: Región de rompimiento

BCR-ABL: Gen de fusión Región de rompimiento- Tirosina de Abelson

°C: Grados Celsius

CB: Crisis Blástica

CCyR: Respuesta Citogenética Completa

CDNA: ADN complementario

CFSE: Succidinil Ester Diacetato de Carboxifluoresceina

c-kit/SCF: Factor de crecimiento de células troncales

CMN: Células Mononucleares

CPH: Células Progenitoras Hematopoyéticas

CTH: Células Troncales Hematopoyéticas

CTL: Células Troncales Leucémicas

CTRL: Control

DCFDA: 2'-7' Diacetato de diclorofluoresceina

DMAPT: Dimetil amino de Partenolida

DMSO: Dimetil Sulfóxido

FC: Fase Crónica de LMC

Fig: Figura

FSC: Dispersión Frontal

GAPDH: Gliceraldehido Fosfato Deshidrogenasa

G-CSF: Factor de crecimiento de colonias granulocíticas

G-MCSF: Factor de crecimiento de colonias macrófago-granulocíticas

GVHD: Enfermedad injerto contra hospedero

h: horas

IC50: Concentración Inhibitoria del 50 por ciento de la población

IFN-a: Interferon alfa

IL3: Interleucina 3

IL6: Interleucina 6IMDM: Medio de cultivo *Iscove's Modified Dulbecco's*

IMF: Intensidad Media de Fluorescencia

IMT: Imatinib (Gleevec o Glivec)

ITC: Inhibidores de Tirosina Cinasa

KDa: Kilodaltones

Lin: Linaje hematopoyético

LLA: Leucemia Linfoblástica Aguda

LMC: Leucemia Mieloide Crónica

LMA: Leucemia Mieloide Aguda

min: minutos

MON: Médula Ósea Normal

mRNA: Ácido Ribonucleico mensajero

NF- $\kappa$ B: Factor nuclear de la cadena kappa de linfocitos B

PBS: Solución amortiguadora de fosfatos

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

Ph: Philadelphia

q-PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa

PTL: Partenolida

RHC: Respuesta Hematológica Completa

RHP: Respuesta Hematológica Parcial

RcgC: Respuesta Citogenética Completa

RcgP: Respuesta Citogenética Parcial

RcgM: Respuesta Citogenética Mayor

Rcgm: Respuesta Citogenética menor

RMC: Respuesta Molecular Completa

RMML Respuesta Molecular Mayor

ROS: Especies Reactivas de Oxígeno

RPMI: Medio de cultivo *Roswell Park Memorial Institute*

RT-PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real

SDS-PAGE: Electroforésis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

SFB: Suero Fetal Bovino

SP: Sangre Periférica

SSC: Dispersión lateral

UFC: Unidad Formadora de Colonia

VCAM: Molécula vascular de adhesión celular

YOPRO-1

YP: Yoduro de Propidio

## I. RESUMEN

La hematopoyesis se origina en una población celular denominada Células Troncales Hematopoyéticas (CTH), dicha población se caracteriza por una capacidad de diferenciación a los distintos linajes celulares de la sangre, la capacidad de autorenovación, la capacidad de mantenerse en quiescencia y el presentar un inmunofenotipo CD34+ CD38- linaje negativo. Mientras que diversos tejidos adultos cuentan con poblaciones de células troncales y progenitoras, se ha descrito que ciertas neoplasias tienen un origen en poblaciones troncales malignas, dando origen a tumores. Este tipo de células se denominan Células Troncales Cancerosas. La Leucemia Mieloide Crónica (LMC) es una neoplasia mieloproliferativa de origen clonal que suele presentarse en 3 fases a lo largo de 5 años. Las tres etapas de la enfermedad se han relacionado directamente a la presencia de una traslocación entre el cromosoma 9 y 22 dando lugar al cromosoma Philadelphia, que a su vez da lugar a la cinasa de tirosina oncogénica Bcr-Abl1. Dicha tirosina cinasa presenta actividad constitutiva y causa la desregulación de una serie de vías de señalización que convergen en un fenotipo leucémico, caracterizado por un aumento en la proliferación, pérdida de apoptosis, y una adherencia alterada al estroma. Al igual que la hematopoyesis normal, la LMC mantiene un orden jerárquico, en donde las CTH tienen el papel más primitivo.

El conocimiento del origen molecular de la LMC ha permitido el diseño de fármacos que se unen de manera preferencial a la oncoproteína Bcr-Abl, e inhiben su actividad. Por lo tanto, estos fármacos son llamados Inhibidores Cinasa de Tirosina y son capaces de llevar a remisión a la mayoría de los pacientes con LMC, sin embargo, no son capaces de eliminar a una población de Células Troncales Leucémicas.

El estado actual de los tratamientos disponibles hace necesaria la búsqueda de alternativas terapéuticas que sean capaces de eliminar a esta población troncal leucémica. La Partenolida es una lactona sesquiterpénica proveniente de la planta *Tanacetum parthenium*. La Partenolida ha sido reportada por Guzman y colaboradores como capaz de inducir muerte celular programada en células troncales leucémicas de Leucemia Mieloide Aguda, a través de la inhibición del factor de transcripción NF- $\kappa$ B y la inducción de Especies Reactivas de Oxígeno. A su vez Guzman

y colaboradores han desarrollado un análogo de Partenolida, dimetil amino partenolida (DMAPT), con una mayor biodisponibilidad oral.

En el presente trabajo se analizó el efecto de Partenolida y DMAPT en células de LMC, con un enfoque mayoritario en células primitivas leucémicas y su contraparte normal en biopsias provenientes de donadores sanos. Se encontró una inducción preferencial a muerte celular en células mononucleares de LMC y células primitivas de LMC en fase crónica, comparadas con su contraparte normal. A su vez, se observó que la inducción de muerte celular es acompañada de la activación de caspasa 3 en células expuestas a PTL o DMAPT, sin embargo, la inducción a muerte celular no disminuye al pretratar las células con el inhibidor general de caspasas Z-vad, sugiriendo que la activación de caspasas no es el único mecanismo involucrado en la inducción de muerte celular.

Por otro lado, se observó la inducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en células leucémicas expuestas a ambos compuestos, dicha inducción se vio directamente relacionada a la inducción de muerte celular, ya que el pretratamiento de las células con N-acetil cisteína, un precursor de glutatión, es capaz de revertir la inducción de muerte celular causado por el tratamiento con PTL o DMAPT, dicho efecto se vio acompañado con ausencia de la inducción de ROS. Se observó a su vez que las células leucémicas son capaces de activar sistemas de compensación redox como es el sistema Nrf2, activando la transcripción de Hemoxigenasa 1, cuando son expuestas a PTL o DMAPT.

## II. ABSTRACT

Hematopoiesis originates in a cellular population designated as the Hematopoietic Stem Cell (HSC). This group of cells share certain features like the capacity to differentiate to the different blood lineages, the ability to self-renewal, and the capacity to remain quiescent, it also presents the immunophenotype CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> lineage negative. While different adult tissues have their own stem and progenitor populations, certain malignancies have been described as originating in a population with stem cell like features, giving rise to tumors. These populations have been named Cancer Stem Cells. Chronic Myeloid Leukemia (CML) is a myeloproliferative disorder with a clonal origin that presents with a natural course of three phases that usually last 5 years. These three disease stages have been directly linked to the presence of a reciprocal translocation between chromosomes 9 and 22, giving rise to the Philadelphia chromosome, which by itself gives rise to the oncogenic tyrosine kinase Bcr-Abl-1. This kinase is activated constitutively and causes deregulation of multiple pathways, which converge in a leukemic phenotype, characterized by an increase in proliferation, loss of apoptosis, and an altered stromal adherence. As in normal hematopoiesis where Hematopoietic Stem Cells give rise to progressively differentiated cells, this model is replicated in CML disorder, where a primitive leukemic population named Leukemic Stem Cell bearing the Philadelphia Chromosome gives rise to the leukemic clone.

The molecular biology of CML has made it possible to design molecules that are able to target Bcr-Abl oncoprotein, and inhibit its downstream molecular pathway, these molecules are named Tyrosine Kinase Inhibitors (TKIs). Although TKI's are able to achieve remission in the majority of CML patients, they are not successful at eliminating Leukemic Stem Cells.

The current state of available treatments for CML patients makes it imperative to look for therapeutical alternatives that are capable of eliminating this leukemic stem population. Parthenolide is a sesquiterpene lactone from *Tanacetum partheium*. Recently Parthenolide has been reported by Guzman and collaborators as capable of inducing programmed cell death in leukemic stem cells in Acute Myeloid Leukemia, by inhibiting the transcription factor NF- $\kappa$ B and the induction of Reactive Oxygen

Species. Guzman and collaborators have also developed a Parthenolide analogue, which has oral bioavailability.

In this work the effect of Parthenolide and DMAPT's on CML cells was studied. Special effort was made to observe specifically the effect on primitive leukemic cells and primitive normal cells from normal biopsies of healthy donors. It was found a preferential cell death induction in CML mononuclear and primitive cells from Chronic Phase patients, compared to their normal counterpart. Also, PTL and DMAPT cell death induction was accompanied with Caspase-3 activation, however, cell death was not avoided by pre-treatment of cells with the pan-caspase inhibitor Z-vad, suggesting that caspase activation is not the only mechanism involved in cell death induction.

On the other hand, a strong Reactive Oxygen Species (ROS) induction was observed in leukemic cells exposed to both compounds, ROS induction was accompanied by cell death and effect was inhibited by pretreatment of cells with the glutathion precursor N-acetyl cysteine (NAC), the involvement of ROS in cell death was confirmed by lack of ROS induction in NAC pretreated cells. It was also observed that leukemic cells can activate a redox compensation system as NrF2, which activates Hemoxigenase -1 transcription, when cells are treated with PTL or DMAPT.

### III. INTRODUCCIÓN

#### 1. 1. HEMATOPOYESIS

La hematopoyesis es el proceso biológico que da lugar a los distintos componentes celulares de la sangre, conformado por dos linajes principales, el linfoide y mieloide. Dicho proceso se da durante el desarrollo prenatal en diversos sitios que incluyen el hígado fetal y el bazo fetal. En la etapa adulta se da en sitios específicos de la médula ósea. Debido a la corta vida de las células hematopoyéticas maduras, la producción de estas se mantiene de manera continua y se calcula que cada segundo se producen  $1.5 \times 10^6$  de células maduras (Bryder et al, 2006). Este alto recambio celular requiere de un proceso biológico altamente regulado y dinámico, que tiene su origen en una población de células únicas denominadas Células Troncales Hematopoyéticas (CTH). A través de un modelo jerárquico formado por cuatro compartimentos principales, las CTH conforman el compartimento más primitivo y dan lugar a las células progenitoras, estas a su vez originando a células precursoras, que posteriormente darán lugar a las células maduras del sistema hematopoyético.

##### **1.1 La concepción de las Células troncales**

A mediados del siglo XIX el naturalista Ernst Haeckel, un ávido Darwinista, se interesó en estudiar la ontogenia de organismos multicelulares e identificar patrones que recapitularan la naturaleza de procesos evolutivos. Los árboles filogenéticos plasmados por Charles Darwin partían de un organismo ancestral y primitivo, dando lugar progresivamente a organismos adaptados y especializados, dichos esquemas en conjunto con observaciones de Haeckel sobre las similitudes que presentan los embriones de vertebrados, provocaron que ideara una hipótesis resumida en la frase “La ontogenia recapitula la filogenia” con la que buscaba explicar que era posible observar el desarrollo evolutivo de un organismo, observando su desarrollo embrionario. Utilizando este mismo proceso de pensamiento, Haeckel acuñó el término *Stamzelle* (Célula troncal) en 1877 al referirse al óvulo fertilizado, aquella célula capaz de dar lugar a todos los tejidos de un organismo (Maehle, 2011).

El término de célula troncal fue mayormente establecido en el contexto de embriología gracias al evolucionista alemán August Weissman que lo logró mediante



su teoría del plasma germinal. Weissman estableció que únicamente los gametos o células germinales de un organismo eran capaces de transmitir la información genética (Maehle, 2011) y por ende eran las únicas células que contenían el plasma germinal completo e intacto, que era la sustancia que Weissmann adjudicaba como contenedora de la información hereditaria, mientras que las células somáticas que conformaban todas aquellas células no germinales carecían del plasma germinal, o presentaban una menor cantidad de este. Fue un asistente de Weissman, Valentin Heacker, que en 1892 al estudiar el desarrollo embriológico del crustáceo *Cyclops* designó a la célula que da lugar a las células germinales y somáticas en el embrión, “la célula troncal” (Maehle, 2011). El mismo año en que Haecker publicó su reporte sobre *Cyclops*, Theodor Boveri realizó observaciones similares en embriones del nemátodo *Ascaris*, donde describió que la Célula Troncal al dividirse daba lugar a una hija que mantenía las características de la CT y otra hija que se diferenciaba a una precursora de célula somática (Marín-Llera and Chimal-Monroy, 2016). Con esta sencilla idea, Boveri estableció el concepto de autorrenovación y diferenciación, conceptos definitorios que se mantienen hoy en día para definir a las Células Troncales.

### **1.1.1 Las Células Troncales Hematopoyéticas**

Aunque hasta ahora, el concepto de células troncales se había establecido como células pluripotentes presentes en etapas tempranas de embriones animales, la idea se fue propagando a otras áreas, estableciéndose la posible existencia de células troncales que daban origen a tejidos específicos. El médico Paul Ehrlich desarrollo técnicas de tinción que permitieron observar y diferenciar el desarrollo de los distintos linajes hematopoyéticos (Ramalho-Santos y Willebring, 2007).

La existencia de una población celular capaz de dar lugar a los distintos linajes hematopoyéticos fue un tema de discusión a principios del siglo XX. Siendo la teoría unitaria la que respaldaba la existencia de las CTH, desarrollada por Arthur Pappenheim, Alexander Maximow y Ernst Neumann quienes, al estudiar el sistema hematopoyético, establecieron un origen común para los eritrocitos y los leucocitos. Fue Arthur Pappenheim el primero en acuñar el término de *Célula Troncal Hematopoyética* en 1896, para referirse a una célula capaz de dar lugar a los distintos

linajes hematopoyéticos (Maehle, 2011). Por otro lado, los dualistas, opositores a la teoría unitaria y cuya figura más importante era el médico Paul Ehrlich, apoyaban la idea de un origen dual para los distintos linajes, por lo que los granulocitos y eritrocitos se desarrollarían en la médula ósea, mientras que los linfocitos lo harían en los nódulos linfáticos y el bazo (Ramalho-Santos y Willebring, 2007). Sin embargo, las limitaciones técnicas de su tiempo impidieron que se resolviera el debate por varias décadas.

### **1.1.2 El descubrimiento de las CTH**

La detonación de las bombas nucleares en Hiroshima y Nagasaki en 1945 trajo consigo una gran pérdida humana que sucumbió al instante, mientras que la población sobreviviente expuesta a altos niveles de radiación ionizante desarrolló Síndrome de Irradiación Aguda (SIA), caracterizado por una anemia aplásica causada por la pérdida de células hematopoyéticas. Los pacientes con SIA se caracterizan por presentar hemorragias (trombocitopenia), infecciones bacterianas (neutropenia) y anemia (eritropenia). Con el tiempo las consecuencias de estos sucesos ayudaron a describir una sensibilidad especial de las subpoblaciones de CTH, críticas para la repoblación hematopoyética, ante la radiación, causando en los pacientes con SIA una pérdida de la hematopoyesis a los pocos días de la exposición.

El desarrollo y uso de armas nucleares a finales de la Segunda Guerra Mundial y el advenimiento de la guerra fría provocó nuevas prioridades en el área de medicina, impulsando un interés especial en tratamientos para víctimas de un posible ataque nuclear. En 1942 el joven médico Leon Jacobson fue reclutado para participar en el desarrollo de la bomba atómica, su trabajo consistió en monitorear la salud del personal trabajando en el "Proyecto Manhattan" y hacer estudios del efecto de la radiación en animales. Tras su participación, Jacobson continuó su investigación sobre los efectos de la radiación en ratones en la Universidad de Chicago. Como fruto de su investigación Jacobson desarrolló un método que le permitía reproducir el síndrome de SIA en un modelo animal. Jacobson exponía ratones a dosis letales de Rayos X y al igual que en pacientes con SIA, la médula ósea de los ratones era destruida, tras esto los ratones manifestaban una pérdida de la capacidad hematopoyética y morían, a este tipo de irradiación se le llamo irradiación letal

(Donnall E. Thomas, 1994). En 1949 Jacobson descubrió que, si al irradiar a los ratones se les protegía el bazo con una cubierta de plomo, estos lograban sobrevivir la irradiación letal, a través de hematopoyesis extramedular en el bazo (Jacobson et al., 1949). Posteriormente Jacobson observó que podía rescatar a los ratones irradiados al inyectarles bazo sano en el abdomen. Un colega de Jacobson, el Dr. Egon Lorenz y sus colaboradores, reportaron poco después (1951) que era posible reproducir el efecto de rescate al inyectarles intravenosamente médula ósea proveniente de ratones sanos singénicos, (Lorenz, 1951), de modo que Lorenz de manera inadvertida había realizado el primer trasplante de médula ósea. En la época en que se realizaban estos experimentos, el efecto de rescate era adjudicado a un factor humoral, y no por una repoblación celular del donador, se hipotetizaba que la radiación inducía una toxina responsable de los síntomas de SIA y que la protección de ciertos tejidos evitaba los efectos de esta toxina, ya que en esa época no se consideraba factible un trasplante alogénico, debido al rechazo del propio sistema inmune observado en pacientes (Donnall E. Thomas, 1994).

La hipótesis del factor humoral fue rechazada pocos años después, en 1952 Main y Prehn inyectaron a ratones irradiados médula ósea proveniente de ratones sanos, no singénicos, posterior a la recuperación de los ratones trasplantados, realizaron un injerto de piel proveniente de los donadores, en los ratones trasplantados, contrario a lo esperado, los ratones no rechazaron el injerto. Este experimento comprobó que la inyección de médula ósea causaba un genuino trasplante (Gale y Goldman, 2013). Los trabajos con ratones irradiados interesaron al hematólogo Donnall Thomas que deseaba lograr trasplantes de médula en humanos. El Dr. Thomas, se había interesado en utilizar el trasplante de médula en pacientes con leucemia, trabajó en conjunto con el oncólogo pionero de la quimioterapia, el Dr. Dana Farber con el objetivo de superar las complicaciones ocasionadas por la Enfermedad de Injerto Contra Hospedero (GVHD). Uno de sus primeros acercamientos fue lograr trasplante autólogo en perros irradiados, los perros al igual que los ratones fueron irradiados con dosis letal y posteriormente se les inyectó médula ósea previamente obtenida de ellos mismos, los perros sobrevivieron al tratamiento y lograron una expectativa de vida normal típica de su raza. Posteriormente Donnall Thomas desarrolló con su equipo, técnicas de detección de compatibilidad de tejido, que le permitía llevar a

cabo trasplantes de médula alogénicos en perros, tecnología que eventualmente lograría traspasar a pacientes. A lo largo de su carrera Donnall Thomas se volvió pionero en la investigación tanto clínica como de laboratorio en trasplante de médula ósea, y en 1957 reportó los primeros intentos de realizar trasplantes alogénicos de médula ósea, la mayoría realizados en pacientes con cáncer terminal. En 1959 realizó el primer trasplante de médula en un paciente pediátrico con Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA). El paciente, tras recibir una dosis letal de irradiación, se le trasplantó médula ósea de su hermano gemelo, logrando injertar, el paciente sobrevivió el trasplante sin embargo tiempo después recayó con leucemia, el Dr. Thomas recibió el premio nobel en fisiología en 1990, por sus investigaciones y avances en el conocimiento del trasplante de médula (Gale y Goldman, 2013).

Años después de los experimentos de Jacobson y Lorenz con ratones, Till, McCulloch y Becker del *Ontario Cancer Institute*, utilizando las técnicas de irradiación y trasplante, observaron que al inyectar a ratones irradiados, células provenientes de la médula ósea de ratones sanos, los ratones desarrollaban colonias macroscópicas en el bazo tras 10 días del trasplante, las colonias correspondían a células hematopoyéticas mieloeritroides (compuestas por granulocitos, eritrocitos, macrófagos, megacariocitos). El número de colonias en el bazo correlacionaba con el número de células trasplantadas. Posteriormente los investigadores tomaron células de estas colonias y las inyectaron en otros ratones irradiados, los ratones receptores desarrollaron a su vez las colonias en el bazo, a estas células trasplantadas capaces de producir colonias los autores nombraron CFU-S del inglés *Colony Forming Unit-Spleen*. En otro experimento que resultó ser el más definitorio, se trataron previamente las células a trasplantar con radiación lo cual causó que algunas murieran y que las células sobrevivientes desarrollaran mutaciones, al trasplantar las células mutantes en los ratones receptores y observar la mutación en las colonias, lograron probar el origen clonal de sus colonias, las CFU-S representaban células troncales hematopoyéticas. Los experimentos publicados a lo largo de los años 60s (Becker et al., 1963) demostraron la existencia de las CTH, comprobando dos características de la población, la capacidad de diferenciación, ya que las colonias estaban formadas por distintos tipos celulares maduros, y la capacidad de autorenovación, ya que el segundo trasplante dio lugar a más colonias.

A partir de los trabajos de Till y McCulloch se establecieron las bases de la investigación con CTH y se contribuyó a la teoría de la organización jerárquica en la hematopoyesis propuesta por Pappehneim, a partir de una población que representa el 0.01 % de las células hematopoyéticas en la médula ósea adulta. Las CTH han sido descritas por numerosos autores por tres características que las definen: la capacidad de autorrenovación; el potencial de diferenciación a los distintos linajes hematopoyéticos (mieloide y linfoide), ambas cualidades son mejor enmarcadas en el modelo de la división asimétrica, donde una CTH da origen a dos células, una idéntica a la célula troncal y la otra con características de diferenciación, rasgos que evitan la depleción de las CTH a lo largo de la vida; y finalmente la capacidad de mantener una fracción de la población en estado de quiescencia, lo que permite el mantenimiento de la homeostasis y el resguardo de CTH para un evento crítico.

### ***1.1.3 El inmunofenotipo de las CTH***

Mientras que se desarrollaban metodologías de trasplante y cultivo *ex-vivo* que permitían apreciar la existencia de CTH, restaba encontrar una forma de identificar y separar a estas células de manera que fuera posible estudiar sus funciones y capacidades de mejor manera.

Fue el grupo de Irving Weissman que en 1988 (Spangrude et al., 1988) utilizando la recién desarrollada técnica de citometría de flujo, lograron identificar en ratones una población celular enriquecida en CTH a través de tres marcadores de membrana, se separaron células de médula ósea bajas en expresión de Thy1.1 (CD90), con ausencia de marcadores de linaje (linaje B, T, macrófagos, granulocítico y eritroide) y altos en expresión de Sca-1. Dicha población enriquecida era capaz de rescatar a 50% de ratones irradiados, con tan solo 30 células, la población trasplantada lograba reconstituir la hematopoyesis de largo plazo, la cual en la época de la publicación era definida como tres meses. Posteriormente se han logrado identificar marcadores adicionales que logran purificar aún más a esta población, se ha encontrado que, dentro de la población previamente enriquecida, las que presentan baja y nula expresión de CD34 y alta expresión del receptor c-kit (CD117), muestran capacidad de reconstitución mielolinfoide de largo plazo (Seita y Weissman, 2010).

Aunque la identificación de marcadores específicos para poblaciones de CTH humanas representaba un importante paso en la investigación de CTH, la única forma de identificar a células primitivas del sistema hematopoyético para ese entonces era el ensayo clonogénico de capacidad formadora de colonias en medio semisólido como metilcelulosa, y la falta de un modelo *in-vivo* para identificar la capacidad funcional de estas células dificultaba el estudio en estas poblaciones. En 1984, el grupo del Dr. Curt Civin en Baltimore, desarrolló el anticuerpo My-10, tras inyectar a ratones con la línea celular de leucemia mieloide KG-1, el anticuerpo identificaba a un antígeno expresado en células con morfología de blastos de médula ósea humana tanto de donadores sanos como de pacientes con leucemia, mientras que las células hematopoyéticas no seleccionadas por el anticuerpo contaban con una morfología madura. El anticuerpo My-10 detectaba una glicoproteína membranal de 115 kilodaltones (KDa) y seleccionaba a una subpoblación enriquecida en células formadoras de colonias, del 1 al 4% en aspirados de médula ósea y solamente 0.5% en sangre periférica (Krause et al., 1996). Eventualmente se identificó que el antígeno identificado por el anticuerpo My-10, correspondía a la glicoproteína CD34, un ligando de L-selectina, con funciones en adherencia célula-célula o adherencia a matriz extracelular.

En 1988 Berenson y colaboradores reportaron haber realizado trasplantes autólogos en babuinos. Cinco primates fueron irradiados letalmente y posteriormente se les inyectaron alrededor de  $20 \times 10^6$  células hematopoyéticas enriquecidas en fenotipo CD34+. Todos los primates sobrevivieron exitosamente al procedimiento, demostrando que dentro del inmunofenotipo CD34+ se encuentra una población capaz de reconstituir el sistema hematopoyético, es decir una población de CTH. Tres años después (1991) el Dr. Donnall Thomas realizó trasplantes de células enriquecidas en CD34, en pacientes con cáncer de mama y neuroblastoma, ya que no se detectaban células CD34+ en tumores sólidos, el Dr. Thomas hipotetizó que la selección por FACS de células de médula ósea CD34+ sería una buena estrategia para seleccionar una población no tumoral y capaz de reconstituir la hematopoyesis en estos pacientes, tras una terapia mieloablativa (quimioterapia o radiación). Como resultado 6 de los 9 pacientes injertaron el trasplante a corto plazo (>2 meses) y 5 mostraron injerto a largo plazo (>3 meses), aunque eventualmente todos los sujetos

murieron de complicaciones de 3 a 12 meses después (infecciones oportunistas o recaídas a la neoplasia), no obstante, el estudio clínico demostró la capacidad reconstitutiva presente en el compartimento CD34+ en humanos (Donnal Thomas, 1994).

Debido a que los avances médicos en trasplantes humanos no se encontraban lo suficientemente desarrollados, la identificación de una población de CTH con mayor pureza no resultaba práctica. Fue el desarrollo de ratones inmunodeficientes que permite la realización de xenotrasplantes de células humanas a su médula ósea y que hizo posible la identificación de un inmunofenotipo troncal humano que fuera capaz de diferenciación a los distintos linajes hematopoyéticos, incluidos los linfocitos T que presentaban dificultad para su diferenciación *in vitro*. Dichos experimentos son denominados xenotrasplantes, ya que involucra el injerto de órganos entre especies. El primer modelo murino que permitió estos trasplantes fue el ratón *SCID* del inglés Inmunodeficiencia Severa Combinada, que cuenta con una mutación en el cromosoma 16 que impide la recombinación de los genes del receptor de antígenos. Dicha mutación impide la maduración de linfocitos T y B, por lo que carecen de inmunidad adaptativa. La mutación se identificó por primera vez en 1980 en ratones CB.17 (Bosma y Carroll, 1991).

Fue nuevamente el grupo de Irving Weissmann (1988) que utilizando al modelo SCID y cultivos *in vitro* a largo plazo utilizando una capa de estroma murino, logró identificar a una población rara (0.05-0.1%) y altamente enriquecida en células troncales en médula ósea fetal, con el inmunofenotipo CD34+ CD90+ lin- (negativos para marcadores de linaje T, B, NK, y mieloeritroides). Dicha población era capaz de diferenciar a los distintos linajes hematopoyéticos (mieloide y linfoide), tanto en ratones SCID como en el ensayo de formación de colonias a largo plazo (LT-CIC), mientras que la contraparte CD34+ CD90- lin- no lograba desarrollar dichas colonias. Posteriormente Huang y colaboradores lograron enriquecer mayormente la población troncal, al describir que dentro del inmunofenotipo CD34+ CD90+ lin-, la ausencia del marcador CD38, una glicoproteína transmembranal ausente en células troncales y gradualmente presente en células progenitoras y precursoras. El grupo reportó que dicho inmunofenotipo seleccionaba a la población capaz de diferenciación multilínea altamente quiescente. Hoy en día dicho inmunofenotipo

sigue vigente y en uso, siendo el inmunofenotipo más aceptado para CTH: CD34+ CD38- CD90+ CD45RA- lin-.

#### **1.1.4 El microambiente hematopoyético**

El alto rendimiento que se requiere de la población de células troncales hematopoyéticas para mantener la homeostasis del tejido sanguíneo es inimaginable cuando se piensa que la población origen es tan ínfima. En el cuerpo humano adulto se calcula que existen alrededor de 11,000 células troncales hematopoyéticas de las cuales la mayoría se encuentra en estado quiescente como estrategia protectora contra insultos genotóxicos (Boulais y Frenette, 2015), mientras que la producción de células nuevas es alrededor de 100,000 millones cada día (Hoggatt et al., 2016). La regulación de esta alta proliferación a lo largo de los compartimentos hematopoyéticos se ha logrado explicar gracias al entendimiento del microambiente hematopoyético.

Tras los reportes de Till y McCulloch que demostraron la existencia de las CTH, los investigadores se enfocaron en estudiar un modelo de anemia, el ratón Steel-Dickie o  $Sl/Sl^d$  que se caracteriza por una anemia congénita, el sistema hematopoyético en estos ratones es incapaz de proveer la producción de células maduras a largo plazo. Till y McCulloch hipotetizaron que las CTH de estos ratones presentaban un defecto intrínseco que alteraba su capacidad de diferenciación y/o autorrenovación, sin embargo, cuando realizaron trasplantes de médula ósea de ratones  $Sl/Sl^d$  o  $Sl/Sl^d$  en ratones silvestres a la mutación, observaron que la capacidad de formar colonias en bazo (CFU-S) era similar a la de células hematopoyéticas de ratones normales. Años después se descubrió que estos ratones anémicos presentaban una mutación en el Factor SCF unido a membrana, que altera la comunicación de las CTH con el estroma, causando una pérdida del mantenimiento de la población troncal en estos organismos. Till y McCulloch habían investigado un proceso biológico que involucraba el microambiente hematopoyético.

Por otro lado, aunque los primeros experimentos de Till y McCulloch (Seita y Weissman, 2010), representaron trabajos seminales que sentaron las bases y características definitorias de las CTH, el ensayo utilizado para la identificación de CTH (el trasplante serial de CFU-S provenientes de bazo) planteaba un problema, y



era que mientras en animales intactos, la capacidad renovativa de una CTH se mantenía a lo largo de la vida del animal, las poblaciones trasplantadas por los autores iban perdiendo su capacidad de autorenovación conforme eran trasplantadas serialmente en ratones irradiados. Este hecho planteaba una paradoja dentro de la teoría de las CTH, el Dr. Ray Schofield hizo esta observación en 1978 (Purton et al., 2008), y postuló que las CFU-S utilizadas por Till y McCulloch no eran una verdadera CTH sino una población más avanzada y comprometida en la jerarquía hematopoyética, hoy en día se sabe que el ensayo realizado por Till y McCulloch permite cuantificar células progenitoras hematopoyéticas multipotentes y no troncales (Morrison y Scadden 2014).

Por su lado Schofield (1978) propuso que las verdaderas CTH se encontrarían en sitios específicos de la médula ósea, donde estarían aisladas de señales inductoras de proliferación o diferenciación, por lo que las CTH no serían células autónomas, como se creía, sino que su mera existencia dependía de señales de su medio ambiente, a este sitio de residencia, Schofield acuñó como nicho de células troncales (Morrison y Scadden, 2014). Al proponer el concepto de nicho, Schofield definió las características principales de un nicho: sitio anatómico, que permite la permanencia y el mantenimiento de las células troncales, un espacio limitado que inhibe una alta proliferación, maduración y un conjunto de señalizaciones que permitirían revertir el estado troncal en una célula en un punto más avanzado de la jerarquía hematopoyética, como un progenitor.

Al establecer Schofield el concepto de nicho, gran parte de la investigación en la biología de la hematopoyesis se dirigió a entender como influían los distintos componentes celulares de la médula ósea en las CTH, sin embargo esta relación entre componentes celulares no pudo ser comprobada experimentalmente hasta el año 2000, cuando Xie y Spradling estudiando el ovario de la mosca *Drosophila melanogaster*, demostraron que unas células denominadas *cap* tenían una función crítica en mantener la autorrenovación de las células germinales, al despegarse las troncales de las células *cap*, éstas comenzaban el proceso de diferenciación. En este trabajo seminal Xie y Spradling demostraron las 4 características previstas por Schofield: un sitio anatómico, un espacio donde las células troncales se pueden mantener y desarrollar, inhibición de la diferenciación, un espacio limitado que

impide el sobre crecimiento y un conjunto de condiciones dentro de este espacio que es capaz de revertir la maduración celular en células con cierto compromiso (Papayannopoulou y Scadden, 2008).

Identificar los componentes del nicho hematopoyético ha representado una tarea difícil de elucidar. Por un lado, el desarrollo de la citometría permitió encontrar y aislar a las CTH por medio de marcadores de superficie, sin embargo, los paneles que permitían identificar al inmunofenotipo troncal se componían de numerosos anticuerpos acoplados a fluorocromos. Al investigar la ubicación espacial en la médula ósea de estas células por tinción de cortes histológicos, las dificultades técnicas no solo se reducen a mantener la arquitectura de la médula intacta sino también los numerosos colores que se requerirían para identificar CTHs en el corte. (Crane et al., 2017).

En 1975 Brian Lord y colaboradores al investigar la localización de las células con capacidad formadora de colonias, reportaron que estas no presentaban una distribución aleatoria en el fémur del ratón sino que se encontraban preferentemente cercanas al endósteo y alejadas de la arteriola central, mientras que otra población con un mayor compromiso a linaje granulocítico, definidos por los autores como CFU<sub>c</sub> (por su capacidad de formar colonias en agar) se encontraban más cercanas a la arteriola central. Durante el mismo periodo, Michael Dexter un colega de Schofield en la Universidad de Manchester buscaba desarrollar técnicas de cultivo capaces de mantener a las células formadoras de colonias, ya que las técnicas *in vitro* en ese entonces solo permitían mantener a estas poblaciones por un máximo de 2 semanas. Dexter y colaboradores idearon alimentar a las células hematopoyéticas con una capa adherente de células estromales extraídas de médula ósea de ratón. La capa adherente era capaz de mantener a las células progenitoras (CP) hasta 3 meses en cultivo, una vez que observaron el efecto de la capa adherente, hipotetizaron que el efecto se debía a un Estímulo de Actividad de Colonias (CSA), es decir un factor soluble que podría estar produciendo las células adherentes y causando el mantenimiento de las células hematopoyéticas. Sin embargo, al tratar células hematopoyéticas con medio condicionado no observaron el efecto del mantenimiento. Puede ser que el fenómeno observado por Dexter y colaboradores se debiera a que los investigadores no estaban tomando en cuenta factores no

solubles como moléculas de adhesión (N-Cadherina) y proteínas de membrana (Notch/Jagged, VL4/VCAM, c-kit/SCF), que posteriormente se encontró presentan un papel muy importante en el nicho hematopoyético.

Actualmente se ha descrito que tanto el proceso de mantenimiento como el de proliferación y diferenciación a los distintos compartimentos hematopoyéticos no es un proceso autónomo de las CTH, sino que depende de distintos componentes celulares del microambiente hematopoyético, los cuales en la vida adulta se encuentran en espacios entre el hueso trabecular esponjoso de los huesos largos y planos. La médula ósea en estos sitios se encuentra organizada en 3 zonas: la endosteal formada por osteocitos formando el hueso y osteoblastos en la superficie interna del hueso, la vascular conformada por células endoteliales que forman sinusoides y arteriolas, y la zona del parénquima que está compuesta de los componentes hematopoyéticos (Flores-Figueroa, 2016). Actualmente se reconocen 2 nichos hematopoyéticos: el nicho endosteal y el nicho vascular, ambos están conformados por distintos componentes celulares y por numerosas moléculas tanto solubles como de adhesión que conforman la arquitectura de la médula ósea de manera que no existe un solo nicho hematopoyético, sino que la misma heterogeneidad de la población troncal /progenitora ocupa estos distintos nichos específicos para estas distintas subpoblaciones del compartimento primitivo (Morrison y Scadden, 2014). Sin embargo, durante los últimos 30 años se ha mantenido en debate cuál nicho es el más importante para la población hematopoyética troncal.

#### **1.1.4.1 Nicho endosteal**

El endósteo fue el primer nicho propuesto y el primer cultivo alimentador que logró mantener CTH *ex vivo* (Dexter *et al.*, 1977), idea que se vio influenciada por los trabajos de Tavassoli y Crosby (1968), quienes trasplantaron osículas de médula a sitios extramedulares en ratones y observaron la producción de células hematopoyéticas en estos sitios, éste trabajo cementó la idea del endósteo como el componente principal del nicho, sin embargo muchas de las suposiciones iniciales han sido puestas en duda por falta de evidencia experimental.

Los principales trabajos que apoyan al nicho endosteal han sido los de Brian Lord y colaboradores (1975), donde se observó la distribución espacial de células formadoras de colonia en el endósteo y se asumió que éste conformaba el nicho principal o el único donde se encontraban localizadas las poblaciones troncales. Por otro lado, el trabajo de Taichman y colaboradores (1994), donde detectaron que osteoblastos diferenciados *ex-vivo* a partir de estroma humano expresaban de manera constitutiva al factor de crecimiento G-CSF, el cual se había reportado como esencial para la proliferación de células hematopoyéticas primitivas.

Por otro lado, cuando se ha querido observar el papel del osteoblasto *in-vivo*, el efecto no ha sido el esperado, como ha sido el caso en ratones mermados de osteoblastos en médula ósea, que no muestran disminución de CTH hasta semanas después de la depleción, cuando ya se observa pancitopenia (Crane et al., 2017). Además, el descubrimiento de receptores SLAM (la combinación CD150+ CD244-CD48+), que logra detectar a una población CTH quiescente, por el grupo de Sean Morrison, permitió observar en cortes histológicos de médula ósea de ratones, que la mayoría de las CTH se encuentran alojadas junto a sinusoides y no junto al endósteo. Además al trasplantar ratones irradiados con CTH, se observa que estas poblaciones hacen *homing* en zonas cercanas al endósteo, sin embargo posteriormente se ha descrito que la irradiación destruye a los sinusoides de la médula ósea, por lo que se propuso que tras esta disrupción, el endotelio remanente son las arteriolas que se encuentran próximas al endósteo, por lo que la aparente localización peri-endosteal estaría reflejando la destrucción de un nicho vascular por la irradiación (Morrison y Scadden).

Hoy en día (2019), el papel del nicho endosteal sigue en debate. Algunos autores consideran que el endósteo alberga un bajo porcentaje de CTH en quiescencia, y que ciertas moléculas de adhesión como n-cadherinas y uniones Tie2/angiopoyetina mantienen a poblaciones de CTH ancladas al endósteo y en quiescencia, sin embargo el trabajo del grupo de Sean Morrison y colaboradores (2007) no logró observar a moléculas de N-caderina en CTH, otros autores (Stier et al., 2005, Nilsson et al., 2005) proponen la osteopontina y la concentración de Calcio como factores clave en el mantenimiento y la quimiotaxis de esta subpoblación a estos espacios. Actualmente se considera que la contribución del endósteo al mantenimiento de las CTH es de

carácter indirecto más que directo, aunque ciertos autores siguen manteniendo la idea de su permanencia en un nicho endosteal (Morrison y Scadden 2014)

#### **1.1.4.2 Nicho vascular**

Basados en los reportes de Lord donde se estableció que las células formadoras de colonias se encontraban mayormente cercanas al endósteo (Lord et al., 1975) y las suposiciones de Schofield, que el nicho estaba compuesto mayormente por el endósteo (1978), el componente vascular no fue visto como un componente clave del nicho, fuera de la importancia como comunicador sistémico e irrigador. Sin embargo, en el ratón que cuenta con hematopoyesis extramedular en el bazo, se había observado que la ausencia de endósteo no parecía afectar a las poblaciones troncales. Sin embargo, fue el trabajo seminal de Morrison y colaboradores (2005), al identificar al fenotipo de receptores SLAM (CD150+ CD244- CD48+), que cambió el paradigma, al reportar que el 80% de células troncales hematopoyéticas quiescentes se encontraban a una distancia de 5 células de una sinusoides, tanto en médula ósea como en bazo de ratón (Kiel et al., 2005), la localización de las CTH era 5 veces más probable encontrarse adyacente a un sinusoides. Esta localización sugería que esta población primitiva pudiera ser mantenida por un nicho perivascular compuesto por células endoteliales y perivasculares.

La localización cercana a estas sinusoides además de sugerir un nicho perivascular, pudiese estar sugiriendo que estas CTH se encuentran en transición para entrar a circulación (Morrison y Scadden 2014), por lo que ha resultado necesario el desarrollo de metodologías que permitan seguir la localización de las CTH en tiempo real. Estudios en ratones han demostrado que las células CTH se mantienen en zonas perivasculares de la médula ósea donde la concentración de CXCL12 y e-selectina son altas, permanecen en estos sitios por semanas, dando origen a más CTH. (Morrison y Scadden, 2014).

La descripción por Morrison de la localización de las CTH alrededor de sinusoides, llevo a la identificación de las células mesenquimales que se encontraban adyacentes a las sinusoides. Aunque las células mesenquimales componen una población heterogénea, se prestó especial atención a una célula estromal VCAM-1+, CD44+, CD31- Leptina+ con alta expresión y secreción de CXCL12, nombrada Célula Reticular

Abundante en CXCL12 (*CAR*). Estas células al ser disminuidas en ratón han mostrado una afectación en la proliferación de progenitores linfoides y CTH (Greenbaum et al., 2013). Otra población de células mesenquimales que ha resultado tener un papel importante en la hematopoyesis, son las perivasculares Nestina+, LepR+ (receptor de leptina), de las que se ha demostrado una alta expresión del factor SCF (Ding et al., 2012). Un actor inesperado en el nicho perivascular han sido los nervios sinápticos que regulan de manera indirecta los niveles de CXCL12 a través de pulsos circadianos de noradrenalina (Mendez-Ferrer et al., 2008).

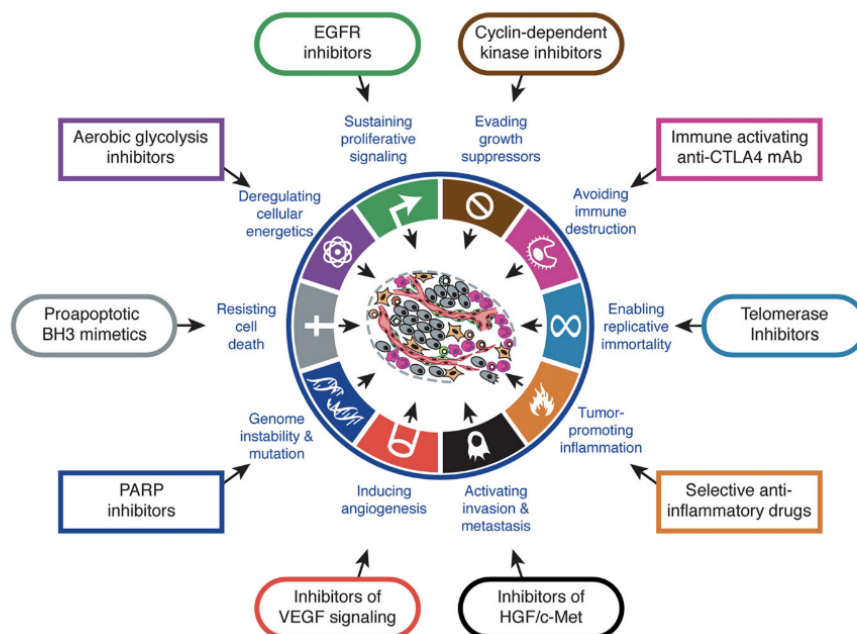
El efecto de las células endoteliales también se ha descrito por medio de distintos ensayos. La delección del gen codificante de la citosina gp130 en células endoteliales llevó a hiper celularidad en la médula ósea y una disminución en la población de CTH (Yao et al., 2005). Además, se ha demostrado que la expresión de E-selectina en la médula ósea es exclusiva de las células endoteliales, (Eugene Butcher, 1991). Por otro lado, en el estudio realizado por Blutler y colaboradores (2010) se demostró que la comunicación de células endoteliales con LT-CTH a través de ligandos Notch es esencial para la repoblación y autorenovación de esta población troncal.

Aunque la médula ósea adulta representa el microambiente hematopoyético mejor descrito, no es el único sitio que conforma nichos hematopoyéticos, ya que, durante el desarrollo embrionario, la hematopoyesis toma lugar en el saco vitelino y posteriormente en la región AGM (aorta gónada-mesonefros), en etapas más avanzadas en el hígado fetal y postnatalmente en sitios específicos de la médula ósea. Estas etapas de transición hematopoyética se dan gracias a la capacidad de migración y *homing* de las CTH, y para ello es crítico la presencia de algunas moléculas como los receptores de Calcio CaR, la quimiocina CXCL12 o su receptor CXCR4 (Scadden 2006). Esta naturaleza migratoria propia de las CTH ha hecho posible el desarrollo de técnicas de movilización de una fracción de estas poblaciones a sangre periférica, al proporcionar la citosina GM-CSF de manera intravenosa a donadores sanos, se puede inducir la movilización de células CD34+ de la médula ósea a sangre periférica, haciendo posible la introducción de esta sangre periférica movilizad a pacientes que requieran un trasplante de médula ósea. Se ha descrito, además que las células hematopoyéticas con mayor capacidad de generar injerto en

un trasplante, corresponde a una subpoblación dentro de las CTH que se encuentra en estado quiescente del ciclo celular (Brunet de la Grange et al., 2013).

## 2. 2. CANCER

El cáncer se define como un conjunto de neoplasias que se originan en un tejido específico, caracterizadas por un aumento en la proliferación celular y una pérdida de muerte celular programada, confiriéndole a dicha población en etapas avanzadas la capacidad de migrar y colonizar otros tejidos del organismo, llevando a la pérdida de función en distintos órganos y de no ser tratada, a la muerte.



**Figura 1. Diagrama que esquematiza las firmas del Cáncer y los blancos terapéuticos que representan, por Hanahan y Weinberg.**

Los distintos modelos neoplásicos comparten características fenotípicas que esquematizaron Douglas Hanahan y Robert Weinberg en su revisión seminal: "The Hallmarks of Cancer: The Next Generation" (Obtenido de Hanahan y Weinberg, 2011).

La primera concepción de las neoplasias como enfermedades complejas se dio a finales del siglo diecinueve, cuando patólogos alemanes observaron anomalías mitóticas en cortes histológicos de distintas malignidades humanas. Posteriormente el biólogo Theodor Boveri postuló (1914) una serie de hipótesis que proponían que los tumores surgían de anomalías mitóticas que daban lugar a aneuploidías y que los tumores se originaban de una sola célula somática con estas anomalías,

hipótesis que posteriormente fue nombrada “evolución clonal” y surgieron a partir de extrapolaciones hechas en el erizo de mar por Boveri (Peter Nowell, 2007).

Ya que las técnicas para la observación de cromosomas en mamíferos a principios del siglo XX no eran las adecuadas, Painter reportó en 1921 que las células humanas contaban con 48 cromosomas, observación que no fue corregida hasta 30 años después. A mediados del siglo XX, la adopción de la colchicina y soluciones hipotónicas permitió mejorar los métodos citogenéticos para la observación de cromosomas y permitió que Joe Tijo y Albert Levan determinaran en 1956 el número normal de cromosomas en humanos como 46 (Peter Nowell, 2007) y no 48, como había sido reportado anteriormente.

En el año 2000, Douglas Hanahan y Robert Weinberg publicaron una revisión titulada “*The Hallmarks of cancer*” donde intentaron juntar las distintas características y complejidades que a lo largo de los años distintos autores habían descrito en distintos modelos neoplásicos con el fin de romper con el paradigma del cáncer como una masa de células proliferantes. Hanahan y Weinberg propusieron un modelo de los tumores como un tejido complejo, compuesto de distintas poblaciones celulares caracterizadas por la ganancia de 6 capacidades biológicas que las células malignas adquieren y que, en conjunto, les confiere su capacidad tumoral. Los autores argumentaban que estas disrupciones biológicas son compartidas por las distintas neoplasias y que corresponden a: autosuficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad a señales inhibitorias, evasión de apoptosis, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida y metástasis (Fig. 1) (Hanahan y Weinberg, 2011).

### **2.1 El modelo de las Células Troncales Cancerosas**

Mientras que finales del siglo XIX y a principios del siglo XX se hipotetizaba la existencia de las Células Troncales, el patólogo Jules Conheim, estudiante de Rudolph Virchow, desarrollaba una idea que tendría gran impacto en el conocimiento del cáncer, tras observar los teratocarcinomas, un tipo de tumor que origina en células germinales y que se caracteriza por presentar tejido de las 3 capas germinales, Conheim hipotetizó que los tumores tenían un origen en células troncales embrionarias remanentes en el cuerpo adulto, y que un desbalance en el tejido que rodeaba a estas células podía causar un descontrol en la proliferación y el



consecuente tumor (Stewart Sell, 2010). La teoría atrajo poca atención en su tiempo, y de igual manera que la teoría de las CTH, esta no pudo ser comprobada hasta décadas después, cuando los avances en los cultivos celulares permitieron la investigación de estas teorías.

En 1967 Leroy Stevens trabajando con ratones en el laboratorio Jackson logró que desarrollaran teratocarcinomas (Andreas-Holger Maehle, 2011), al trasplantar células de embriones de ratón en testículos de ratones adultos. Stevens concluyó que los teratomas tenían un origen en una célula totipotencial. Ocho años después Beatrice Mintz y colaboradores reportaron la formación de quimeras al inyectar células de teratomas en blastocistos de ratones. Contrario a lo esperado, las células malignas eran capaces de incorporarse al blastocisto y formar tejido diferenciado (Andreas-Holger Maehle, 2011). Estos trabajos contribuyeron a que más adelante, el concepto de célula troncal y célula embrionaria cancerosa se volvieron intercambiables. Barry Pierce que había dedicado gran parte de su carrera a estudiar teratocarcinomas, al observar los resultados de Mintz y Stevens, propuso al cáncer como una enfermedad inherente al desarrollo ontogénico, el cáncer se originaría de manera jerárquica en células troncales cancerosas, dando origen a células con mayor diferenciación, pero arrestadas (Mel Greaves 2016). Por ende, un tumor con origen en una célula primitiva presentará tejido con poca diferenciación. A partir de este modelo jerárquico fue que se ideó el tratamiento de los teratomas con ácido retinoico. Con su modelo Pierce fue el investigador que planteó las bases de la teoría de la célula troncal cancerosa, sin embargo, su generalización hacia tumores que no fueran los teratocarcinomas requirió de mayores estudios.

Con el tiempo la teoría de Pierce se ha querido modelar en las distintas neoplasias. En el campo de la cancerología se ha planteado que dentro de tumores sólidos y sobre todo en malignidades hematológicas, existe una jerarquía celular que le concede una capacidad de proliferación, colonización y migración distinta a las poblaciones y por ende a la enfermedad. Las células que sostienen la jerarquía pueden ser identificadas por antígenos o características metabólicas específicas, dando la posibilidad de utilizar estos fenotipos como blancos moleculares y transformarlos en posibles terapias. De manera general estas poblaciones son llamadas Células Troncales Cancerosas.

## **2.2 La leucemia**

La Leucemia ha jugado un papel importante en el entendimiento del cáncer y en el desarrollo de tratamientos. Además, su alta incidencia en la población infantil (según la OMS en niños comprende la neoplasia más común) le ha conferido un papel con una gran carga emotiva en nuestra sociedad, que sin duda ha contribuido al impulso de las investigaciones oncológicas, la búsqueda de mejores tratamientos y a la fundación de institutos especializados en el cuidado de pacientes con neoplasias.

La primera descripción detallada de una leucemia se le atribuye al Dr. Velpeau que en 1827 reportó el caso de un paciente mayor, el señor Vermis que fue atendido por una fiebre severa y tratado con un antiinflamatorio. El paciente se recuperó y 4 años después recayó, presentando 2 tumores en el lado izquierdo del abdomen, muriendo a los pocos días. El Dr. Velpeau al realizar una autopsia, observó un bazo atípicamente grande y una sangre viscosa y blanquecina, aunque se desconocía la causa y naturaleza de la enfermedad, se considera el reporte del Dr. Velpeau como la primera descripción de los síntomas relacionados con una leucemia (Kim R. Kampen, 2012).

### **2.2.1 Las neoplasias mieloides**

Las neoplasias mieloides son padecimientos hematológicos clonales que originan en la médula ósea y que se caracterizan por la sobreproducción de una o varios de los linajes mieloides maduros. Dentro de esta agrupación se encuentra la Leucemia Mieloide Aguda y Crónica (LMA, LMC), policitemia vera, trombocitopenia y mielofibrosis (Arber *et al.*, 2016).

### **2.2.2 La Leucemia Mieloide Crónica**

La LMC fue el primer padecimiento oncológico en ser ligado a una firma molecular (Koretzky, 2007), comprende la neoplasia mieloides cuya biología se ha descrito más a profundidad, su diagnóstico requiere la detección del cromosoma Philadelphia o del gen fusión Bcr-Abl.

#### **2.2.2.1 Descubrimiento**

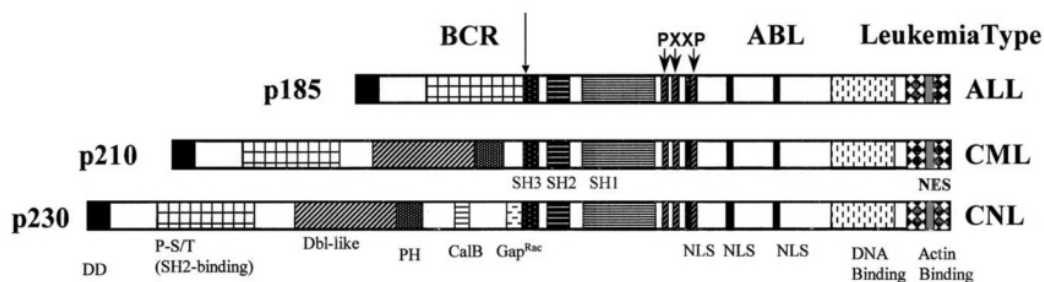
La LMC, descrita por primera vez en 1845 por los médicos patólogos John Hughes Bennet y Rudolf Virchow, un joven patólogo alemán que sería profesor de Haeckel y Conheim. De manera independiente, los médicos observaron en 2 pacientes una hipertrofia de bazo e hígado, y la invasión de la sangre por células blancas, lo cual le daba un color blanquecino, estas observaciones se lograron hacer por autopsias cuando ambos pacientes sucumbieron al padecimiento. Bennet dedujo de las observaciones, que su paciente había padecido de una infección que lo había llevado a una “supuración” de la sangre, mientras que Virchow reportó que la gran cantidad de células blancas en la sangre se debían a un aumento en el crecimiento propio del cuerpo, el médico alemán nombró al padecimiento Leukamie (del alemán: sangre blanca) (Hector Mayani, 2016).

La observación de Tijo y Levan en 1956 del número normal de cromosomas en humanos desató la búsqueda de anomalías cromosómicas en distintos padecimientos. La primera anomalía cromosómica en tipificarse fue la del cromosoma 21 en pacientes con síndrome de Down en 1959 (Mughal et al., 2016). Por otro lado se buscaron aberraciones en distintas neoplasias, frecuentemente en leucemias, sin embargo no se encontraron anomalías consistentes, por lo que en 1960, Bayreuther concluyó que la mayoría de los tumores contaban con un número normal de cromosomas (Klaus Bayreuther, 1960), el mismo año Peter Nowell y David Hungerford reportan haber observado una aberración cromosómica en 7 pacientes con LMC, un cromosoma pequeño que no se observaba en sangre de individuos sanos, ésta anomalía fue nombrada cromosoma Philadelphia (Ph), en honor a la ciudad de EU donde fue descubierto. No obstante, y a pesar del hallazgo, durante la década de 1960 no se había identificado otra anomalía cromosómica consistente en ninguna otra neoplasia, por lo que el cromosoma Ph se adjudicaba a un resultado del tratamiento de radiación a la que eran sujetos los pacientes, y no como la causa de la leucemia (Peter Nowell, 2007). Aunque los métodos citogenéticos para la observación de cromosomas habían mejorado radicalmente, la identificación de cromosomas individuales aun no era posible.

Fueron otros padecimientos de carácter congénito que predisponen a contraer leucemia como anemia de Fanconi, ataxia telangiectasia y síndrome de Bloom que fortalecieron la idea de una aberración cromosómica como causal o marcador de

leucemias, al observar que linfocitos aislados de pacientes con estos padecimientos sufrían rompimientos cromosómicos (Peter Nowell, 2007).

La LMC sería la primer neoplasia en ser relacionada directamente con una alteración genética; 1973 cuando se habían desarrollado las técnicas de bandeado cromosómico que Janet Rowley en Chicago identificó el origen de la aberración, se trataba de una translocación recíproca a partir del rompimiento de un fragmento del cromosoma 9 y 22, dando lugar a un cromosoma 22 anormalmente corto: t(9;22) (q34;q11) (Mughal et al., 2016). El trabajo de Rowley permitió que se indagara en la naturaleza molecular del cromosoma Philadelphia. En 1982 Nora Heisterkamp en Holanda observó que el gen Abelson homólogo del virus v-Abelson de leucemia murina, se encontraba en el cromosoma 9 en humanos, lo cual significó un gran avance ya que implicaba la importancia de cromosoma Philadelphia en una leucemia, que no se había logrado de manera experimental (Mughal *et al.*, 2016).



**Figura 2. Representación de las variantes de Bcr-Abl.** La oncoproteína Bcr-Abl se puede presentar en tres distintas variantes dependiendo del sitio de rompimiento en el gen BCR, dando lugar a variantes de Bcr-Abl que se encuentran asociadas a tres tipos leucémicos distintos. (Tomado de: Advani y Pendergast 2002).

Posteriormente se logró identificar que la translocación estaba formada por un fragmento 5' del gen BCR y 3' del gen ABL causando su yuxtaposición y dando lugar al oncogén de fusión *BCR-ABL*, cuyo producto es la tirosina cinasa Bcr-Abl p210. Variantes de Bcr-Abl son observados en otros tipos de leucemia, dependiendo del sitio de rompimiento del gen BCR, la variante p185 es observado en 30% de casos de Leucemia Linfoblástica Aguda, y la variante p230 en una fracción de pacientes con Leucemia Neutrofílica Crónica (Chavez-González *et al.*, 2013)

### 2.2.2.2 El cromosoma Philadelphia y sus variantes

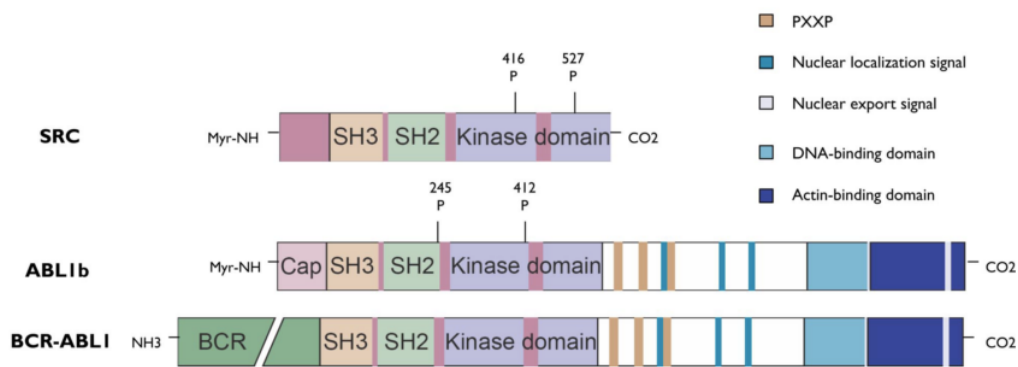
El cromosoma Philadelphia consiste en la yuxtaposición de fragmentos del gen *Bcr* del inglés *Breakpoint cluster región* (región de rompimiento), en la banda q11 del cromosoma 22, con el proto-oncogen *Abl* (homólogo del gen Abelson de leucemia murina) en la banda q34 del cromosoma 9, dando lugar al oncogen *Bcr-Abl* (Advani y Pendergast, 2002).

El sitio de rompimiento en el gen *Bcr* se da principalmente en 1 de 3 sitios: el menor (m), el mayor (M) o el micro ( $\mu$ ), que da lugar a 3 variantes del oncogen *Bcr-Abl*: p185 (m:e1a2), p210 (M:b2a2 o b3a2) y p230 ( $\mu$ : e19a2) asociadas a distintos tipos de leucemia. La forma P185 se observa en 20% de los casos de Leucemia Linfoblástica Aguda de bajo pronóstico con un promedio de 8 meses de remisión, p210 con el 90% de Leucemia Mieloide Crónica y p230 con un subtipo de Leucemia Neutrófila Crónica caracterizada por un curso benigno, donde la evolución a crisis blástica es poco común (Fig. 2) (Advani y Pendergast, 2002). Por otro lado, dentro de la variante presente en LMC encontramos 2 isoformas producidas por *splicing* alternativo: *b2a2* y *b3a2*, la última codifica un transcrito de mayor tamaño. Algunos datos clínicos indican que pacientes con el subtipo *b3a2* presentan mejor pronóstico que el subtipo *b2a2*, que se traduce en una fase crónica de mayor duración y una mejor respuesta a interferón- $\alpha$ , (Fig. 3) (Advani y Pendergast, 2002). Sin embargo, esta diferencia en pronóstico es disputada entre autores.

### **2.2.2.3 Función nativa de los genes *ABL* y *BCR***

El gen *ABL* es el homólogo humano del oncogén v-abl presente en el virus de leucemia murina Abelson (A-MuLV), y codifica a una tirosina cinasa no receptor de 145 KDa con 2 isoformas producto de *splicing* alternativo del primer exón (Michael Deininger et al., 2000).

La proteína presenta tres dominios de homología SRC (SH1-SH3) cercanos a la zona amino terminal, mientras que la función tirosina cinasa se encuentra en el dominio SH1. Los dominios



**Figura 3. Representación de la estructura de las cinasas SCR, ABL1b y Bcr-Abl1.**

Se muestran los distintos dominios que comparten las cinasas SCR y ABL en su forma nativa como en su forma oncogénica (Bcr-Abl1). Scr y Abl comparten tres dominios principalmente: el dominio tirosina cinasa, y el dominio homólogo Sarc 2 (SH2) y el Sarc 3 (SH3). Por *splicing* alternativo del primer exón de *ABL1* se producen 2 isoformas de Bcr-Abl, la 1a y la 1b. (Tomado de Quintas-Cardama y Cortes, 2009).

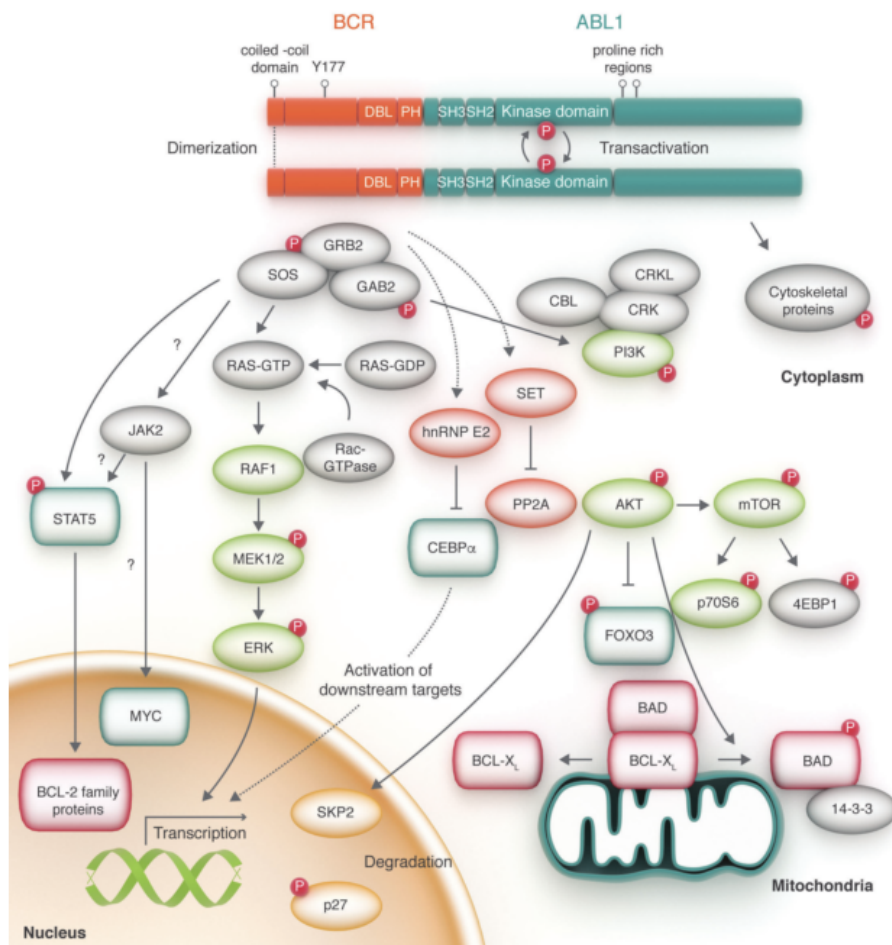
SH2 y SH3 le confieren a la enzima interacción con otras proteínas, mientras que cercanos al carboxilo terminal se encuentran motivos de unión a actina y DNA.

Las funciones normales de la tirosina ABL son diversas, involucrando control de ciclo celular y respuesta a estrés genotóxico, así como comunicación de la célula con el entorno a través de integrinas (Deininger *et al.*, 2000).

Mientras que la proteína Bcr al igual que Abl es de expresión ubicua, se le han descrito varios motivos estructurales. Un dominio serina treonina cinasa, un dominio de listones enrollados (del inglés *coiled-coil*) en el extremo amino que permite la dimerización o tetramerización de las unidades. De importancia en el centro de la molécula se encuentra una región tipo *del* y homóloga a plecsitrina que estimula el intercambio de guanidina trifosfato (GTP) a difosfato (GDP) en factores de intercambio de guanidina Rho, que podrían activar a factores de transcripción como NF-κB (Deininger *et al.*, 2000).

#### **2.2.2.4 La oncoproteína Bcr-Abl**

La oncoproteína Bcr-Abl es el producto de la unión de dos genes donde el sitio de rompimiento del gen BCR se encuentra entre el intrón 13 y 14 mientras que el sitio de rompimiento del gen ABL se da en una región de 140 kb alrededor del exón 1b y 2.



**Figura 4. Representación de mecanismos de señalización activados constitutivamente por BCR-ABL.** Se muestran algunos de los mecanismos moleculares activados en LMC. El dominio de listones enrollados (*coiled-coil domain*) de BCR, facilitan la dimerización de la oncoproteína en citoplasma y su activación constitutiva, facilitando la interacción con proteínas adaptadoras como GRB2, CRKL, CBL, estas a su vez, conducen a la activación de numerosas vías que dan lugar a un aumento en la sobrevivencia, inhibición de la apoptosis, adhesión alterada al estroma y migración (obtenido de Mughal *et al.*, 2016)

La proteína nativa ABL consiste en una tirosina cinasa capaz de translocarse entre núcleo y citoplasma, sin embargo, al presentarse como Bcr-Abl, pierde esta capacidad, lo cual se ha adjudicado principalmente a la pérdida de un fragmento en el extremo amino terminal en Abl (Michael Deininger *et al.*, 2000). La habilidad oncogénica de Bcr-Abl requiere de la desregulación de la actividad tirosina cinasa de abl, que conlleva al reclutamiento y fosforilación de moléculas adaptadoras, así como la activación de eventos de señalización río abajo (Advani y Pendergast, 2002)

### **2.2.2.5 Transactivación de Bcr-Abl**

La activación constitutiva de esta oncoproteína trae consigo la activación río abajo de una serie de cascadas de señalización entre las que destacan: PI3K/AKT/mTOR, RAS/RAF/MEK/ERK, y JAK/STAT (Holyoake y Helgason, 2015), en conjunto, la desregulación de estas vías causan en la célula Ph+: evasión de la apoptosis, aumento en la proliferación celular (aun en ausencia de la estimulación con citocinas), inhibición de la adhesión al estroma medular, producción de anomalías en el citoesqueleto y falta de respuesta a inhibidores hematopoyéticos (Advani y Pendergast, 2002).

### **2.2.2.6 Evolución de la Leucemia Mieloide Crónica**

La edad promedio a la que se presenta la LMC oscila entre los 60-65 años en países desarrollados, mientras que en países de África y América Latina se presenta alrededor de 15 años antes (Chereda y Melo, 2015). Aunque no se ha establecido una causa a la enfermedad, se ha observado un factor de riesgo a desarrollar LMC en poblaciones expuestas a altas dosis de radiación ionizante, como ha sido el caso en poblaciones expuestas a ataques bélicos (Hiroshima, Japón, 1945) o desastres nucleares (Chernobyl, Bielorusia, 1986), para el resto de la población representa una enfermedad rara, teniendo una incidencia mundial de 2 casos por cada 100,000 habitantes, siendo los hombres más propensos a desarrollar la enfermedad con un índice de 1:3 a 1:5 (Chereda y Melo, 2015). No obstante, y a pesar de tratarse de una enfermedad de baja incidencia, la LMC representa un elegante modelo biológico que ha permitido elucidar conocimiento tanto en el campo de la hematología como en el cáncer.

La evolución clínica de la LMC se ha identificado que es de naturaleza trifásica y que de no ser tratada tiene una duración promedio de 5 años. La primera etapa es la Fase crónica (FC) donde se diagnostica a la mayoría de los pacientes. Los síntomas principales de esta etapa son esplenomegalia, fatiga, anorexia y un aumento de granulocitos maduros circulantes, en médula ósea y en bazo (neutrófilos y granulocitos) aunque una fracción de los pacientes son asintomáticos. De no ser tratados en esta primera fase, los pacientes progresan a una fase acelerada (FA)



transitoria, donde se comienzan a detectar blastos en sangre periférica y que progresa

durante 3-18 meses a una fase aguda, llamada crisis blástica (CB), que asemeja a una Leucemia Mieloide Aguda. Los criterios para el diagnóstico de FA o CB de la Organización Mundial de la Salud (OMS) se encuentran en la Tabla 1.

**Tabla 1. Criterios clínicos para el diagnóstico de Fase Acelerada y Crisis Blástica según la OMS.**  
Se enlistan los criterios considerados para la estratificación de pacientes con LMC que progresan de Fase Crónica a Fase Acelerada y Crisis Blástica. (Obtenido de Tesis de Doctorado de Peixun Zhou, 2011).

Fase Acelerada LMC (se diagnostica en la presencia de uno o más síntomas) 10-19% de blastos en células mononucleares de sangre periférica o médula ósea. Basófilos en sangre periférica superan el 20% Trombocitopenia ( $100 \times 10^9/L$ ) no relacionada a terapia Esplenomegalia Evolución clonal evidenciada por citogenética.
Crisis Blástica de LMC (se diagnostica en la presencia de uno o más síntomas) Mas del 20% de blastos en mononucleares de sangre periférica o médula ósea. Proliferación blástica extramedular <i>Clusters</i> de blastos en biopsia de medula ósea.

Durante la progresión a CB de LMC, la mayoría de los pacientes adquieren anomalías citogenéticas, mientras que la transformación a CB puede dividirse en dos tipos dependiendo de las características de los blastos. El 30% de estos casos corresponde a una CB linfóide y el restante 70% da lugar a una CB mielóide. Esta fase es invariablemente fatal siendo la media de supervivencia de 4 a 5 meses, sin embargo, la fracción de pacientes que desarrollan una crisis blástica linfóide responden de manera transitoria (9-12 meses) a un régimen terapéutico de Leucemia Linfóide (Advani y Pendergast, 2002).

#### **2.2.2.6 Las CTL de LMC**

Fueron Bonnet y Dick (1997) los primeros en proporcionar evidencia de la existencia de Células Troncales Leucémicas (CTL), ya que describieron una población con inmunofenotipo CD34+CD38-linaje- proveniente de pacientes con LMA capaz de

iniciar una Leucemia Mieloide Aguda en ratones inmunodeficientes. Ellos postularon que esta población maligna se originaba de una población primitiva normal debido a las mutaciones que presentaba en inmunofenotipo, si estableciendo un modelo jerárquico en esta leucemia mieloide.

**Tabla 2. Criterios de respuesta a tratamiento.**

Se enlistan los criterios clínicos utilizados para estratificar el nivel de respuesta a tratamientos en pacientes con LMC. (Obtenido de Tesis de Doctorado de Peixun Zhou, 2011).

Respuesta a tratamiento	Criterios
Respuesta hematológica completa (RHC)	Normalización completa de cuentas en sangre periférica: Cuenta leucocitaria: $<10 \times 10^9$ células /L Cuenta plaquetaria: $< 450 \times 10^9$ células/ L Ausencia de células inmaduras en SP Ausencia de síntomas incluyendo esplenomegalia
Respuesta Hematológica Parcial (RHP)	Los mismos criterios que RHC excepto: Persistencia de células inmaduras en SP, o Cuenta plaquetaria al $<50\%$ que el número detectado al diagnóstico, pero $>450 \times 10^9$ células/L, o Esplenomegalia persistente, pero a un $50\%$ del observado al diagnóstico.
Respuesta Citogenética Completa (RCgC)	No hay células Ph+ detectables en médula ósea
Respuesta Citogenética Parcial (RCgP)	1-34% de células Ph+ detectables en médula ósea
Respuesta Citogenética Mayor (RCgM)	$<35\%$ de células Ph+ detectables en médula ósea
Respuesta Citogenética Menor (RCgm)	35-90% de células Ph+ detectables en médula ósea
Respuesta Molecular Completa (CMR)	Transcritos de Bcr-Abl indetectables por q-PCR, o una reducción de $>4.5$ log comparado al diagnóstico.
Respuesta Molecular Mayor (RMM)	Una reducción de $>3$ log del transcrito de Bcr-Abl, o $<0.1\%$ de transcrito de Bcr-Abl por q-PCR.

La naturaleza multilínea de la LMC sugiere que esta neoplasia tiene un origen en una población primitiva, denominada Célula Troncal Leucémica (CTL), que coexiste en médula ósea con la hematopoyesis residual normal, misma que en las fases activas de la enfermedad es enmascarada por la alta proliferación leucémica (Coulombel et al., 1983). Se estipula que la población de CTL reside en conjunto con la población troncal hematopoyética del paciente, teoría que lograron demostrar Holyoake y colaboradores (1999). Por otro lado, se ha demostrado que transcritos de Bcr-Abl se encuentran presentes en células hematopoyéticas de hasta 10% de la población normal (Ismail et al., 2014), ésta inesperada prevalencia podría indicar que el cromosoma Philadelphia tiende a ocurrir en el sistema hematopoyético, donde su ocurrencia en una célula troncal hematopoyética podría desencadenar los primeros pasos de una patología leucémica (Bose et al., 1998).

De manera similar a como sucede en la hematopoyesis normal, se ha demostrado que la población de CTL en LMC es capaz de autorrenovarse, de diferenciarse a los distintos linajes hematopoyéticos (durante la fase crónica), de permanecer en estado de quiescencia y de presentar el inmunofenotipo CD34+ CD38-.

Aunado a lo anterior y a diferencia de lo que sucede en LMA donde se han descrito una serie de marcadores de superficie específicos asociados con la población troncal leucémica (CD25, CD32, CD44, CD47, CD90, CD117, Tim-3, CLL1, entre otros), en la LMC únicamente se han descrito a las moléculas CD26 e IL-RAP como marcadores asociados a dichas poblaciones (Chavez-González et al., 2016).

Otra característica importante en las CTL de LMC, es que tienen una elevada capacidad de eliminar agentes quimioterapéuticos. Este comportamiento lo logran a través de transportadores de membrana como los transportadores dependientes de ATP de la familia ABC (del inglés *ATP-binding cassette transporter*), los cuales se han reportado sobre-expresados en CTL de LMC, por lo que su presencia se ha implicado en la permanencia de dicha población en pacientes. Aunado a este punto también se ha descrito que proteínas de membrana que modulan el transporte de moléculas al interior de la célula como el transportador de cationes orgánicos 1 (OCT1, del inglés *organic cationic transporter-1*) se encuentran sub-expresadas en CTL de LMC y esta

reducción se ha asociado con el ingreso de diferentes fármacos al interior celular (Chávez-González *et al.*, 2016).

Un aspecto de gran relevancia en la población troncal de LMC es su capacidad para mantenerse en estado de quiescencia del ciclo celular, estado del cual pueden escapar para reentrar al ciclo celular en respuesta a un estímulo fisiológico (Chen *et al.*, 2016). Dentro de la LMC se ha descrito una población con el inmunofenotipo troncal CD34+ CD38- lin- que presenta el cromosoma Philadelphia y que es capaz de mantenerse en quiescencia. Dicha población es capaz de reconstituir una leucemia cuando es transplantada en ratones inmunodeficientes y en consecuencia mantiene a la población insensible a diversos tratamientos, ya que estos últimos son dirigidos a células metabólicamente activas (Tessa Holyoake, 1999).

#### **2.2.2.6 Algunos tratamientos en leucemia**

##### ***Primeros tratamientos***

La necesidad de mejorar los tratamientos existentes para LMC comenzó poco después de su descubrimiento y el primer agente en utilizarse fue arsénico, empleado por el Dr. Thomas Fowler, quien en 1865 desarrolló un tratamiento que consistía en una solución al 1% de trióxido de arsénico y cuyo uso continuó hasta la primera mitad del siglo XX (Mughal *et al.*, 2016). Dicha solución, lograba controlar la fiebre, reducir las cuentas leucocitarias, y en cierto grado la anemia, sin embargo, no detenía la progresión de la enfermedad (Aviles-Vázquez, 2013). La solución de Fowler se usó de manera complementaria con rayos X (descubiertos por Willhem Roentgen en 1895), y ambos agentes reducían también los síntomas relacionados a la esplenomegalia.

##### ***Quimioterapias***

Tras la segunda guerra mundial, y gracias al rápido desarrollo de los agentes citotóxicos, el uso de la radiación como tratamiento fue remplazado y en 1953 David Galton realizó las primeras pruebas en humanos utilizando Busulfán como agente quimioterapéutico. Galton realizó en Londres, el primer ensayo aleatorizado en LMC comparando la administración de Busulfán con radiación a bazo y encontró mejorías en la supervivencia, a la vez que describió la efectividad del agente para revertir la

esplenomegalia y disminuir las cuentas leucocitarias (Mughal et al., 2016). Sin embargo, su efectividad se encontraba relacionada a la sospecha de sus características mutagénicas y se creía que podría generar otras neoplasias, por lo que, a mediados de la década de los sesentas, el Busulfán se reemplazó con la hidroxycarbamida (hidroxiurea), ya que su actividad antineoplásica se basaba en la inhibición de la ribonucleotido reductasa. Sin embargo, ninguno de los tratamientos lograba reducir la proporción de las células Philadelphia positivas (Mughal et al., 2016)

### ***Trasplante***

El desarrollo de la tecnología de trasplante permitió su uso y aplicación en LMC, en Francia en 1975 se reporta el primer trasplante alogénico realizado posterior a todas las pruebas relacionadas con el acondicionamiento, las cuales fueron mayoritariamente desarrolladas en Seattle, USA y que consistían en un pretratamiento con ciclofosfamida, seguido por irradiación de cuerpo completo y transfusión de médula ósea de hermanos con HLA compatible. Aunque los primeros trasplantes fueron fallidos, en 1979 se reportó la ausencia del cromosoma Ph tras 31 meses de la intervención en 4 pacientes que recibieron el trasplante de gemelos idénticos (Goldman, 2010).

### ***Interferon alfa***

A principios de la década de los ochentas, con el desarrollo de la tecnología recombinante y el descubrimiento de los interferones, el Dr. Moshe Talpaz introdujo el uso del Interferón-alfa al tratamiento de pacientes con LMC. Este agente lograba prolongar la duración de la fase crónica con 2 a 3 años y aunque se desconoce con exactitud el mecanismo de acción del Interferón en pacientes, su efecto se cree que es de carácter inmuno-modulatorio (Mughal *et al.*, 2016). Desafortunadamente los fuertes efectos secundarios, causaban en los pacientes una pobre adherencia al tratamiento, ya que se debían administrar dosis diarias por tiempo indefinido. Posteriormente, un estudio en 1997 confirmó que la combinación de Interferón con Citarabina aumentaba la fracción de pacientes que lograban una respuesta citogenética comparado con el tratamiento de Interferón solo (Mughal et al., 2016).

### ***Inhibidores de tirosinas cinasas (ITC)***

El conocimiento del origen molecular de la LMC permitió el diseño de moléculas denominadas Inhibidores de tirosinas cinasas (ITC), las cuales se unen preferencialmente al sitio de unión ATP de la oncoproteína Bcr-Abl, y son capaces de abrogar las vías que se encuentran activadas en las células Ph+. El primero de estos ITC en ser desarrollado y aprobado por la FDA (del inglés: Administración Federal de Medicamentos), fue Mesilato de Imatinib (IMT) (STI571, IMT; Glivec® o Gleevec®, Novartis, Basel, Suiza) una molécula capaz de inhibir la actividad cinasa de Abl, c-kit, y el receptor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-R). La actividad de IMT consiste en competir con adenosina trifosfato en la unión del sitio alostérico en abl, bloqueando en consecuencia su actividad tirosina cinasa.

#### ***Primera generación***

En 1998 se introdujo IMT en un estudio de fase clínica I, con pacientes de LMC en fase crónica refractarios para tratamiento con IFN- $\alpha$ ; 98% de estos pacientes alcanzaron respuesta hematológica completa a las 4 semanas con el uso de 300 mg diarios, esta respuesta contaba con pocos precedentes en el campo de la oncología. Posteriormente se recomendó una dosis de 400 mg de IMT diarios, obteniéndose una concentración constante en plasma de 4.6  $\mu\text{M}$  (Peixun Zhou, 2011). En junio del año 2000 se inició el estudio de fase 3 aleatorio de Interferon y STI571 (IRIS del inglés: International Randomized Study of Interferon and STI571), el cual involucró por primera vez pacientes de recién diagnóstico con LMC y comparó tratamiento con IMT con Interferón- $\alpha$  y citarabina. A los 18 meses de comenzar el ensayo clínico, el 75% de los pacientes con IMT lograban una Respuesta Citogenética Completa (CCyR) cuando eran tratados con IMT, mientras que sólo el 15% lograba esta respuesta posterior al uso con Interferón- $\alpha$  y citarabina (Hughes *et al.*, 2010).

Actualmente (2018) el IMT es el tratamiento de primera línea en LMC en fase crónica, sin embargo, una fracción de los pacientes desarrolla resistencia a este fármaco y se ha reportado que a los 60 meses posteriores al tratamiento el 17 % de los pacientes recaen en la enfermedad. Una fracción de los pacientes que desarrollan resistencia muestran una expansión de clonas Bcr-Abl positiva resistentes a IMT debido a

mutaciones puntuales en el dominio cinasa de la oncoproteína. A la fecha se han descrito alrededor de 100 mutaciones puntuales en Bcr-Abl que confieren distintos grados de resistencia a los ITC, de las cuales la mutación T315I resulta ser la que confiere mayor resistencia, razón por la cual se ha nombrado mutación Guardián (del inglés *Gatekeeper*) (Mughal et al., 2016). Por otro lado, se ha descrito que el 60% de los pacientes en tratamiento con IMT mantiene las dosificaciones originales después de 6 años, sugiriendo que el 40% de los pacientes restantes requieren tratamientos alternativos o incremento en la dosis (Mughal et al., 2016).

### ***Segunda generación***

En conjunto, el éxito inicial de IMT y los mecanismos de resistencia emergentes en pacientes impulsaron el desarrollo de la segunda generación de ITC, impulsos que dieron origen a dos fármacos: Nilotinib y Dasatinib (Mughal et al., 2016).

Nilotinib (AMN107, Tassigna; Novartis, Basel, Switzerland) se desarrolló como una modificación de IMT que presentara mayor selectividad. Se calcula que la potencia de Nilotinib es de 30 a 50 veces mayor a IMT sin embargo no es capaz de inhibir a Bcr-Abl cuando cuenta con la mutación T315I, mientras que presenta menor actividad a otras cinasas como c-Kit y PDGFR (Mughal et al., 2016).

Al contrario de Nilotinib, la concepción de Dasatinib (BMS-354825; Sprycel, Bristol-Myers Squibb) fue estructuralmente independiente de IMT, ya que se trata de una Carboxiamida de Tiazol, que se une al dominio Abl, tanto en su conformación abierta como cerrada, lo que provoca inhibición de algunas de las cinasas de la familia Src. Diversos estudios han mostrado que la actividad de Dasatinib, es unas 300 veces mayor a la de IMT, sin embargo, esta molécula al igual que Nilotinib, no es capaz de inhibir a Bcr-Abl con la mutación T315I (Mughal et al., 2016).

El último de los ITC en ser desarrollado fue Bosutinib (SKI-606, Wyeth), un inhibidor dual de las cinasas Src y Abl, que logra superar el mayor número de resistencia asociada a mutaciones y aunque genera una serie de efectos secundarios (como diarrea y efectos en el hígado) que son manejables con reajustes de dosis y medicamentos concomitantes, en 2012 fue aprobada como tratamiento de primera línea en pacientes con LMC resistentes a IMT. Esta molécula al igual que los otros

ITC, tampoco es capaz de inhibir a Bcr-Abl con la mutación T315I (Mughal et al., 2016).

### ***Tercera generación***

El agente de más reciente desarrollo, Ponatinib (Ariad Pharmaceuticals, Cambridge, MA), presenta una estructura similar a IMT con una modificación de una purina y un enlace triple carbon-carbon, e inhibe una serie de cinasas como ABL, SRC y con menor afinidad a KIT, PDGFR, FGFR y FLT3. Es interesante notar que los resultados iniciales lo mostraban como el único ITC capaz de inhibir a Bcr-Abl con la mutación T315I. En diciembre del año 2012 fue aprobada para pacientes con LMC en fase crónica o fases avanzadas resistentes o intolerantes a otros ITC. Sin embargo, el fármaco fue retirado del mercado debido a una creciente preocupación debido al alto índice de efectos secundarios relacionados con alteraciones cardio vasculares (Mughal et al., 2016).

Entre las diversas estrategias que se han utilizado para el tratamiento de la LMC, cabe mencionar que ninguna es capaz de eliminar a la subpoblación troncal leucémica que cuenta con la translocación Bcr-Abl y se encuentran quiescente en el ciclo celular. El único tratamiento que ha presentado capacidad curativa ha sido el trasplante alogénico, sin embargo, la baja supervivencia al tratamiento y poca disponibilidad de donadores histocompatibles vuelve a esta opción poco viable, y solo se considera como opción en pacientes jóvenes.

#### ***2.2.2.7 Otros blancos terapéuticos en CT de LMC***

##### ***El Factor de transcripción NF- $\kappa$ B***

Desde el descubrimiento por David Baltimore y Ranjan Sen en 1986, del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de células B activadas: NF- $\kappa$ B (del inglés *Nuclear Factor kappa light chain enhancer of activated B cells*), se tuvieron indicios de su implicación en malignidades, ya que su presencia se encontró principalmente en líneas celulares provenientes de linfomas. Sin embargo, el primer indicio definitivo de la liga entre NF- $\kappa$ B y las neoplasias se dio cuando se clonó el componente de la vía, p65 y se encontró extensiva homología con el oncogén v-rel, del virus de reticuloendoteliosis aviar T. Este virus es responsable de inducir tumores



linfoides en aves y el oncogén v-rel por sí solo es capaz de transformar linfocitos (Walker et al., 1992).

La vía NF- $\kappa$ B comprende un sistema de señalización que es activado por distintas vías, sin embargo la vía canónica es la más descrita y asociada a cáncer, donde en condiciones normales, la célula presenta al heterodímero (la subunidad p50 asociada a la subunidad p65), de manera inactiva en el citoplasma, ambas subunidades unidas a su inhibidor I $\kappa$ B (inhibidor de kappa B, del inglés: *Inhibitor of Kappa B*), que bloquea directamente la secuencia de localización nuclear en p65, inhibiendo de esta manera su traslocación (Bradford y Baldwin, 2014). Cuando la célula recibe un estímulo proinflamatorio a través de un receptor de membrana, dicha señal activa al complejo IKK (cinasa I $\kappa$ B del inglés *I $\kappa$ B Kinase*) por fosforilación que lleva a la fosforilación del inhibidor I $\kappa$ B unido al heterodímero, dando pie a su ubiquitinización y degradación por el proteosoma, liberando al dímero, lo cual activa su translocación al núcleo donde se une a promotores de cientos de genes, activando la transcripción de componentes que controlan la inhibición de apoptosis, estimulan proliferación celular, regulan diferenciación y promueven un fenotipo asociado con progresión tumoral (Grivennikov y Karin, 2010).

Es debido a los componentes de proliferación, sobrevivencia y metástasis que media la vía NF- $\kappa$ B, que representa un papel tan importante en la patogénesis del cáncer. Aunque mutaciones en los componentes del sistema NF- $\kappa$ B son poco comunes y éstas se limitan a linfomas como linfoma de células difusas B y linfoma de Hodgkin, la activación constitutiva de NF- $\kappa$ B se ha reportado en la mayoría de los tumores. Esto debido muy probablemente a estímulos proinflamatorios en el microambiente tumoral o a la activación por mutaciones en componentes río arriba del factor de transcripción (Karin, 2009).

En el caso específico de LMC, se ha descrito en numerosos modelos que Bcr-Abl es capaz de inducir la transcripción de p65, y a su vez inducir su activación. En líneas celulares se ha observado que la expresión de Bcr-Abl lleva a una independencia de IL-3 como factor de crecimiento, en estas mismas células, la inhibición de NF- $\kappa$ B lleva a la reversión de este efecto. Las vías por las que Bcr-Abl activa de manera constitutiva la vía NF- $\kappa$ B son numerosas, siendo las principales PKD2, PI3K, JNK y MEKK1, los tres últimos por mecanismos dependientes de Ras. Por otro lado, se ha

reportado en muestras primarias que la activación de la vía va en incremento en concordancia con la progresión de la enfermedad, siendo su actividad más alta en células Ph<sup>+</sup> de crisis blástica, comparado con células Ph<sup>+</sup> de fase crónica, sin embargo, independientemente de la fase de la enfermedad, las células de LMC presentan una mayor activación de NF-κB que su contraparte normal (Carrà et al., 2016).

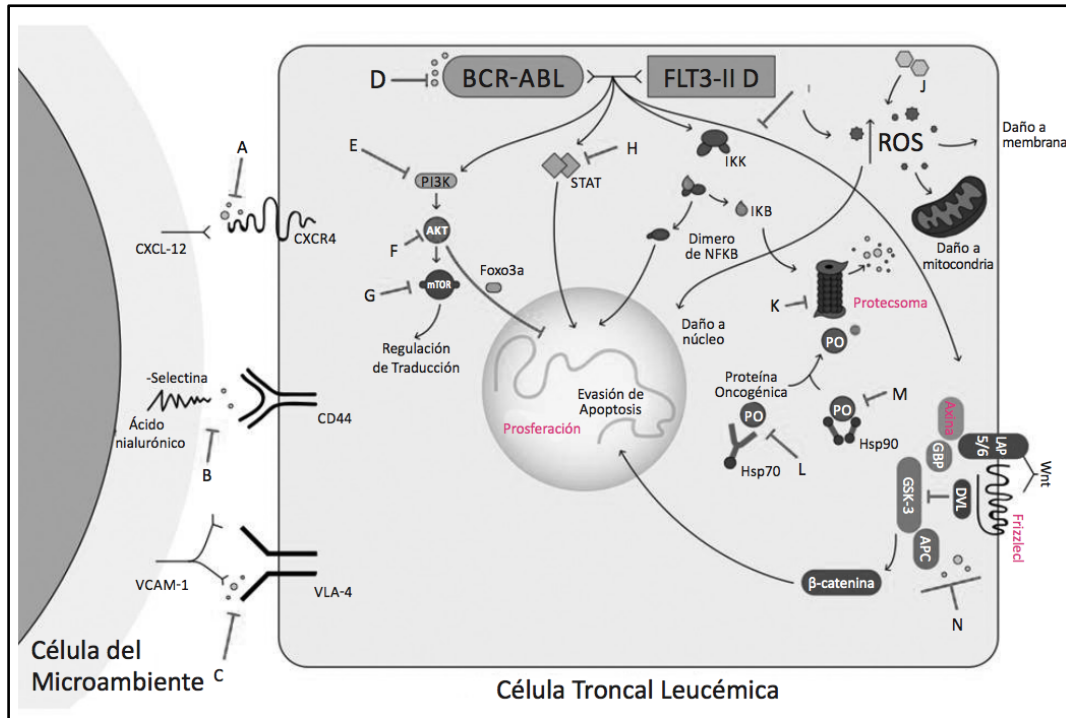
De manera interesante Van Etten y colaboradores (2014) han descrito en modelos murinos, que al abrogar el mecanismo de NF-κB en CTL, estas pierden viabilidad, resaltando la contribución a la leucemogénesis en LMC. Por otro lado, se ha reportado que las células primitivas de LMC secretan TNF-α y logran estimular la activación de NF-κB tanto de manera autócrina como exócrina a células leucémicas adyacentes (Carrà et al., 2016). A su vez, también se ha descrito la capacidad de células del estroma de secretar TNF-α, lo cual describiría una contribución del microambiente al progreso de la leucemia (Carrà et al., 2016).

La participación de NF-κB en células de LMC se ha descrito en múltiples aspectos, y su papel en procesos de la leucemogénesis tanto dependiente de Bcr-Abl como independiente de su actividad, vuelve a esta vía un buen candidato como blanco terapéutico.

Uno de los agentes inhibidores de la vía NF-κB que ha sido propuesto como terapia es Bortezomib, un inhibidor del proteosoma, el fármaco inhibe NF-κB al abrogar la degradación de IκB. Aunque su mecanismo de inhibición implica poca especificidad hacia la vía NF-κB, su aplicación podría ser prometedora, ya que el fármaco se encuentra aprobado para su uso en mieloma múltiple y en linfoma de célula de manto. el caso específico de LMC, se ha propuesto el uso de Bortezomib en combinación con IMT, ya que se ha observado sinergismo en líneas celulares de LMC expuestas a ambos compuestos, la disminución en viabilidad se ve acompañada de una inhibición de NF-κB (Gatto et al., 2003).

### ***Especies Reactivas de Oxígeno***

Las especies reactivas de oxígeno: ROS (del inglés *Reactive Oxygen Species*) comprenden un grupo de moléculas altamente reactivas debido al oxígeno con una capa de electrones de valencia no apareada. Dentro de esta agrupación de moléculas, se encuentra: peróxido de hidrógeno, anión superóxido y el radical hidroxilo.



**Figura 5. Esquema representativo de blancos terapéuticos en CTL.**  
 Diversas investigaciones en la biología de las CTL han develado numerosas vías que están siendo investigadas como posibles blancos terapéuticos para su eliminación. (Tomado de Chavez-Gonzalez et al., 2016 en: Células Troncales: Biología y Aplicaciones En Biomedicina).

Las Especies Reactivas de Oxígeno son productos naturales de un metabolismo aeróbico, siendo la mitocondria el organelo contribuyente principal, otras fuentes de ROS pueden ser estrés ambiental y radiación UV. Mientras que las Especies Reactivas de Oxígeno juegan papeles importantes en la señalización celular y el mantenimiento de la homeostasis, niveles altos de estas moléculas pueden llevar a un fenómeno denominado estrés oxidativo. El estrés oxidativo se define como un desequilibrio entre la producción o niveles de ROS con la capacidad de un sistema biológico para contrarrestar estos niveles, lo que resulta en una acumulación de radicales libres y en daño celular, ya que niveles altos de ROS son capaces de reaccionar con proteínas, lípidos y ADN, causando alteraciones. Por otro lado, la contraparte a niveles altos de

ROS son un bajo nivel en especies reactivas de oxígeno, que a su vez afecta el balance redox, inhibiendo mecanismos de señalización que inducen proliferación celular (Tothova *et al.*, 2007).

La liga entre estrés oxidativo y cáncer es compleja y multifacética, se ha descrito en la mayoría de las neoplasias que las células malignas presentan un mayor y persistente estrés oxidativo, comparado con su contraparte normal, efecto que se ha atribuido principalmente a una disfunción mitocondrial (Nieborowska-Skorska *et al.*, 2012). El factor contribuyente más importante de este desbalance, al fenotipo maligno es la inestabilidad genómica que llevan a mutaciones en el DNA, dando lugar a pasos clave en la carcinogénesis y progresión tumoral (Bolton-Gillespie, *et al.*, 2012).

En el caso específico de LMC, se ha reportado que la oncoproteína Bcr-Abl induce directamente la sobreproducción de ROS, siendo los niveles de ROS en células Ph+ más altos que su contraparte normal, este incremento en ROS se observa incluso en CTL quiescentes, cuando se compara con su contraparte normal (Nieborowska-Skorska, *et al.*, 2012). Por su parte, las células de LMC van mostrando mayores niveles de ROS conforme la enfermedad va progresando a fase acelerada y crisis blástica, contribuyendo este creciente estrés oxidativo a la inestabilidad genómica y a la mutagénesis de BCR-ABL, lo que provoca la generación de clonas con mayor número de mutaciones que no responden a los tratamientos. La inducción de ROS en células Ph+ se demostró en células de ratones, en donde además el estímulo se pierde, al exponer las células a IMT (Antoswezka-smith *et al.*, 2017).

#### **2.2.2.8 Partenolida y DMAPT**

A partir de los primeros reportes que describían a las células troncales leucémicas, donde se describía un modelo jerárquico en el desarrollo de las leucemias mieloides que evocaba la hematopoyesis normal, y donde así mismo se reportaban similitudes fenotípicas en CTL con su contraparte normal, resultó atractivo hipotetizar estrategias terapéuticas en distintos modelos malignos, que fueran capaces de erradicar a estas poblaciones y llevar a terapias curativas.

Sin embargo, el desarrollo de estrategias dirigidas a CTL requería la identificación de blancos específicos a estas poblaciones que las diferenciase de su contraparte

normal, con el fin de evitar tratamientos que abrogaran a poblaciones troncales sanas.

El uso de plantas que contienen lactonas sesquiterpénicas ha estado presente en la medicina tradicional por siglos y a lo largo de múltiples culturas. La familia Asteraceae es particular en la enorme cantidad de compuestos bioactivos con los que cuenta, entre ellos terpenoides, alcaloides, compuestos fenólicos y poliacetilenos, la vuelven una familia áltamente significativa tanto bioquímicamente como en el área de la farmacología (Chadwick et al, 2013).

Las lactonas sesquiterpénicas comprenden una subfamilia de terpenoides incoloros, amargos que tienen su origen como un grupo de metabolitos secundarios con características lipofílicas. Su presencia se limita prácticamente a la familia de las Asteraceae, donde son altamente abundantes, componiendo hasta el 1% del peso seco de la planta. La actividad biológica de las lactonas sesquiterpénicas depende mayormente de tres propiedades bioquímicas, su reactividad alquilante, sus propiedades lipofílicas y su geometría molecular (Ghantous et al., 2013). El nivel de lipoficidad de una molécula le facilita el ingreso a la célula a través de la membrana celular, incrementando consigo su citotoxicidad, este efecto es observado *in-vitro*, sin embargo, al aumentar la eficacia de una molécula *in-vitro*, a su vez disminuye su biodisponibilidad. El alto nivel de compuestos bioactivos en esta familia se puede deber a una serie de factores, uno de los cuales es la amplia distribución de la familia Asteraceae en territorios americanos y europeos. Esto ha impuesto una presión evolutiva en miembros de esta planta para desarrollar evolutivamente múltiples mecanismos en base a fitoquímicos que ayudan a evadir depredadores y competidores, volviendo a las Asteraceas plantas con un rico reservorio de compuestos bioactivos.

En 2001 Mónica Guzmán y colaboradores reportaron que células troncales leucémicas (CD34+CD38-lin-) obtenidas de pacientes con LMA presentaban una activación constitutiva del complejo NF- $\kappa$ B mientras que células troncales hematopoyéticas provenientes de cordón umbilical no presentaban activación de dicho factor. Esta característica despertó interés en investigar la inhibición de este factor como posible blanco terapéutico en el tratamiento y eliminación de CTL en LMA, producto de este trabajo fueron investigaciones realizadas con la lactona

sesquiterpénica Partenolida, proveniente de la planta *Tanacetum parthenium* que demostró efectividad en la inducción a muerte celular en células troncales de LMA *in vitro* (Guzman *et al.*, 2005), en este trabajo se encontró que parte de la capacidad de PTL para inducir muerte dependía de la inducción de ROS en esta población, sin embargo la alta lipoficidad del compuesto limitaba su aplicación a modelos *in vivo* o a una proyección terapéutica, por lo que el grupo de Guzmán desarrolló un análogo con biodisponibilidad oral, al añadir a la molécula un grupo amino, el análogo fue nombrado Dimetil-amino de Partenolida o DMAPT (Guzman *et al.*, 2007), el cual mostró al igual que PTL, la capacidad de dirigirse a la población primitiva de LMA. Fue en base a esta evidencia que se plantearon los objetivos del presente trabajo.

La oncoproteína Bcr-Abl, como ya se ha mencionado anteriormente, es una enzima de la familia tirosina cinasa no receptor que se encuentra mayormente en citoplasma, con una tendencia a la dimerización, favoreciendo así su autofosforilación de manera constitutiva, esta actividad enzimática trae consigo la activación río abajo de numerosas vías oncogénicas, de especial atención, la vía de las Stat, PI3K-AKT, NF- $\kappa$ B (Karvela *et al.*, 2016), que contribuyen a un fenotipo oncológico, caracterizado por una inhibición de la apoptosis, un aumento en la proliferación, una retroalimentación de factores de crecimiento, y una adherencia alterada al estroma, en conjunto esta serie de características dan lugar a un fenotipo leucémico y son de nuestro interés, ya que vuelven a esta población leucémica blanco a los efectos de las lactonas sesquiterpénicas.

#### IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente se sabe que la Leucemia Mieloide Crónica es una neoplasia hematológica originada en una población de Células Troncales Leucémicas, población que no es eliminada con las terapias actuales dirigidas a la inhibición de la oncoproteína Bcr-Abl. Esto debido a la capacidad que tiene esta población a permanecer en quiescencia, la insensibilidad a los tratamientos y la inestabilidad genómica que le confiere a esta población la adquisición de mutaciones puntuales, llevando al surgimiento de clonas resistentes.

Por otro lado, múltiples reportes han registrado una edad de diagnóstico en LMC menor en la población de América Latina. Este padecimiento se presenta a una edad media de 40 años comparada con países desarrollados, donde la edad media de diagnóstico es de 60 años. Por lo que el tratamiento con ITC se vuelve más prolongado en países en desarrollo, lo cual encarece el gasto gubernamental en mantener a los pacientes en países como México, volviendo necesaria la búsqueda de alternativas terapéuticas que sean capaces de eliminar a esta población troncal originaria de la enfermedad.

La incapacidad de los tratamientos actuales para eliminar a la población troncal leucémica, responsable de las recaídas en pacientes con LMC, y el fuerte interés en buscar nuevos blancos terapéuticos en la eliminación de las poblaciones troncales malignas nos llevó a investigar el efecto de otras moléculas sobre la biología de poblaciones primitivas de LMC, con el fin de aportar conocimiento al desarrollo de terapias alternativas a este padecimiento.

Guzmán y colaboradores han demostrado la activación basal del factor de transcripción NF- $\kappa$ B en Células Troncales Leucémicas de Leucemia Mieloide Aguda (Guzman et al., 2001), proteína que vuelve a los inhibidores de este factor de transcripción como posibles candidatos de terapias blanco para la eliminación de estas poblaciones leucémicas. Por otro lado, Nieborowska-Skorska y colaboradores (2012) han descrito que poblaciones primitivas de LMC presentan altos niveles de Especies Reactivas de Oxígeno debido a la actividad de la GTPasa RAC2, misma cualidad que es causal de la inestabilidad genómica en estas poblaciones que dan lugar al surgimiento de clonas resistentes a las terapias actuales.

Guzmán y colaboradores en años recientes han descrito (2005), a Partenolida y su análogo Dimetil amino de Partenolida (DMAPT) como moléculas capaces de abrogar a la población primitiva leucémica en Leucemia Mieloide Aguda, tanto a nivel in vitro como en ratones inmunodeficientes tranplantados con LMA proveniente de pacientes. Por las características biológicas de la población primitiva en LMC, vuelve a ambas moléculas candidato como una posible estrategia molecular para la eliminación de la población troncal responsable de las recaídas en pacientes con LMC.

Por lo expuesto anteriormente, el presente trabajo buscó investigar el efecto de PTL y DMAPT, así como su mecanismo de acción en las poblaciones totales y primitiva de LMC, con la intención de saber si son capaces de reducir la hematopoyesis leucémica teniendo un efecto mínimo en relación a su contraparte normal.



## V. OBJETIVOS

### 1. OBJETIVOS GENERALES

Determinar la permanencia de la población primitiva leucémica de LMC, proveniente de pacientes de recién diagnóstico en fase crónica, vírgenes de tratamiento, antes y después del tratamiento con partenolida y DMAPT.

Caracterizar el efecto biológico de partenolida y DMAPT en la población primitiva leucémica (CD34+ lin-) y en blastos de LMC comparado con su contraparte normal proveniente de médula ósea de donadores hematológicamente sanos.

### 2. OBJETIVOS PARTICULARES

Caracterizar el efecto de partenolida y DMAPT en la muerte celular, proliferación y estado en el ciclo celular de la población primitiva (CD34+lin-) y blastos de LMC, comparado con su contraparte normal.

Determinar la activación basal del factor de transcripción NF- $\kappa$ B en la población primitiva y en blastos leucémicos de LMC comparado con su contraparte normal antes y después del tratamiento con partenolida y DMAPT.

Determinar los niveles de estrés oxidativo en la población primitiva y blastos de LMC comparado con su contraparte normal, antes y después del tratamiento con partenolida y DMAPT.

Estudiar el papel del estrés oxidativo en la citotoxicidad de partenolida y DMAPT en células leucémicas de LMC.

## VI. HIPÓTESIS

Es sabido que la LMC se origina en una población troncal CD34+ CD38- lin- que contiene la translocación Bcr-Abl, y que la presencia de esta oncoproteína vuelve insensible a esta población a los tratamientos con ITC. Dando lugar a una población residual que se mantiene quiescente en los pacientes que logran remisión con estos tratamientos. Así mismo se ha demostrado anteriormente que las poblaciones leucémicas troncales en LMA son susceptibles a la inhibición con PTL y DMAPT a través de la inhibición de NF- $\kappa$ B y la inducción de ROS.

En el presente trabajo se espera encontrar que la activación basal de NF- $\kappa$ B en población progenitora troncal de LMC y sus niveles basales de ROS hagan a esta población susceptible a los efectos de PTL y DMAPT, aportando al conocimiento de un posible blanco terapéutico.

## VII. MATERIALES Y METODOS

### 1. PACIENTES Y OBTENCION DE MUESTRAS

Las muestras primarias de pacientes y donadores sanos se obtuvieron bajo consentimiento informado y siguiendo los lineamientos institucionales aprobados por la comisión de ética del Hospital de Especialidades en el Centro Médico Nacional La Raza, Centro Médico Nacional Siglo XXI, el Hospital General Regional No. 2, y en estricto apego a la declaración de Helsinki, el código de Núremberg y el reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación.

Las muestras de Médula ósea Normal (MON) (n=17) se obtuvieron de donadores hematológicamente sanos sometidos a cirugía de prótesis de cadera en el Hospital General Regional No.2 Villa Coapa del IMSS y a partir de tejido que el cirujano elimina al realizar el ajuste de prótesis a hueso.

Las muestras de pacientes con LMC (n=19) se obtuvieron de aspirados de médula ósea de sujetos con reciente diagnóstico en Fase Crónica, vírgenes de tratamiento y 1 muestra de un sujeto en Crisis Blástica, del Servicio de Hematología del Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional la Raza. Todas las muestras resultaron positivas para Bcr-ABL mediante la determinación por PCR de punto final.

### 2. SEPARACION Y ENRIQUECIMIENTO DE CELULAS HEMATOPOYETICAS

Para la obtención de células mononucleares (CMN) a partir de biopsias, las muestras fueron suspendidas en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) con Suero Fetal Bovino (SFB) (StemCell Technologies) al 3% en una proporción 1:1, las muestras fueron sometidas a *vortex* por 30 segundos (seg) y posteriormente pipeteadas por goteo sobre solución Ficoll-Paque (GE Healthcare) en una proporción 2:1. Las muestras fueron centrifugadas a 400 g por 30 minutos (min) sin freno. Posteriormente se obtuvo la fase blanca del gradiente que corresponde a células mononucleares de baja densidad y fueron contabilizadas por azul de tripano y tinción de Turk.

Para la cuantificación de células viables en muestras se utilizó tinción de exclusión con azul de tripano al 0.4% en PBS. Para la cuantificación de células mononucleares

totales en muestras separadas por gradiente de Ficoll-paque (GE Healthcare) se utilizó tinción de Turk, las células teñidas fueron contadas con el uso de una cámara Neubauer.

Una vez obtenidas las células mononucleares de pacientes y donadores sanos, 100 millones de estas células fueron incubadas con coctel enriquecedor para células humanas progenitoras troncales hematopoyéticas (StemCell Technologies) (1:10) por 15 min a temperatura (T) ambiente con resuspensión cada 5 min, enseguida se le agregó suspensión de coloide inmunomagnético (StemCell Technologies) (1:16) por 15 min a T ambiente. Una vez completada la incubación, las células fueron procesadas en una columna inmunomagnética de selección negativa (StemCell Technologies) la columna ejerce la selección al adherir las células con marcadores de linaje, obteniendo una población enriquecida en células sin marcadores de linaje, que corresponde a una población troncal progenitora. Las células fueron resuspendidas en PBS al 3% de SFB, fueron contadas utilizando tinción con azul de tripano y cultivadas en las condiciones mencionadas posteriormente.

El coctel para el enriquecimiento en población primitiva (CD34+lin-) se compuso de anticuerpos contra CD2 (marcador de linfocitos T, células NK), CD3 (marcador de linfocitos T), CD14 (marcador de monocitos y macrófagos), CD16 (marcador de células NK, neutrófilos, monocitos y macrófagos), CD19 (marcador de linfocitos B), CD56 (marcador de linfocitos T, células NK, células dendríticas y monocitos), CD66b (marcador de neutrófilos) y glicoforina A (marcador de eritrocitos) (StemCell Technologies, Vancouver, B.C.).

### 3. COMPUESTOS E INHIBIDORES

La partenolida (PTL) fue donada por el Dr. Cesar Compadre, mientras que la Dimetil amino Partenolida (DMAPT) fue sintetizada y obsequiada por el Dr. Peter Crooks del Colegio de Farmacia de la Universidad de Arkansas (University of Arkansas for Medical Sciences).

Los compuestos concentrados fueron mantenidos en Dimetil Sulfoxido a una concentración de 40 mM por una duración no mayor a 6 meses a -20 °C. El día del experimento, la alícuota del concentrado se llevó a 1 mM con PBS sin SFB. Las

concentraciones utilizadas en los distintos experimentos se encontraron en el rango de 1  $\mu$ M a 20  $\mu$ M.

El pretratamiento con N-acetil cisteína (NAC) para la inhibición de Estrés oxidativo se realizó a una concentración de 20 mM, por 1 hora (h) a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>. Previo a la adición de NAC, el pH de la solución fue ajustada a 7. Tras la incubación las células fueron lavadas 3 veces con PBS previo a la adición de PTL o DMAPT.

El tratamiento con el inhibidor de pan-caspasas Z-Vad se realizó a 100  $\mu$ M por 2 h previas al tratamiento con PTL o DMAPT.

#### 4. LINEAS CELULARES Y CONDICIONES DE CULTIVO

Los cultivos líquidos fueron mantenidos a una densidad de 300-100 mil células por mililitro, en una incubadora adaptada para cultivos celulares de mamíferos a 37 °C, en un ambiente saturado de humedad con 5% de CO<sub>2</sub>.

Como modelo biológico de crisis blástica, se utilizaron 4 líneas celulares de Leucemia Mieloide Crónica: K562, Kcl22, Meg-01, y Kasumi-4. Las líneas celulares fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (Biowest), complementado con L-glutamina, SFB al 10% y Penicilina estreptomycin al 1%. La línea celular modelo de Leucemia Mieloide Aguda HL60, previamente reportada como sensible a partenolida, fue utilizada como control positivo del tratamiento con las lactonas sesquiterpénicas. La línea celular HL60 fue cultivada en medio IMDM (Biowest) adicionado con L-glutamina, SFB al 10% y Penicilina estreptomycin al 1%.

Las células mononucleares y enriquecidas en fenotipo progenitor/troncal fueron cultivadas en medio específico para células troncales hematopoyéticas StemSpan (Stem Cell Technologies) suplementado con 10 ng/mL de: SCF (PeproTech), IL6 (PeproTech), TPO (PeproTech), Flt3-L (PeproTech), IL-3 (PeproTech), G-CSF (PeproTech) y GM-CSF (PeproTech) y Penicilina Streptomycin al 1% (Biowest).

#### 5. DETERMINACION DE IC50

La concentración inhibitoria 50 (IC50) se calculó utilizando los valores de células viables por tinción con azul de tripano proveniente de las líneas celulares (K562, Meg-01, Kcl22, HL60) expuestas a 1, 2, 5, 7.5, 10 y 20  $\mu$ M de PTL o DMAPT por 24 o 48 h en

3 experimentos independientes. Los números totales de células viables se compararon con los valores observados en el grupo control para obtener el porcentaje de células viables en cada grupo.

A partir de los porcentajes de viabilidad a 24 y 48 h, se graficaron curvas de sobrevivencia para cada línea celular. Posteriormente cada valor de viabilidad fue modelado a una curva utilizando la regresión Probit. Posteriormente, los valores obtenidos fueron utilizados para calcular la regresión lineal, a partir de la cual se obtuvo la ecuación de la línea recta:  $y = mx + b$ . Y despejando la ecuación para cada línea celular, se obtuvo el valor de la CI50, cuando  $y = 50, x = CI50$ .

## 6. CULTIVO DE CELULAS FORMADORAS DE COLONIAS

Para la cuantificación funcional de células progenitoras hematopoyéticas, se sembraron 5,000 células enriquecidas en fenotipo troncal/progenitor (CD34+ lin-) viables (por exclusión con azul de tripano) en 1 mililitro de metilcelulosa al 0.9% con 30% de SFB, 1% de albumina, de 1mM de mercaptoetanol, 2 mM de L-glutamina, 50ng/ml de SCF, 10ng/ ml de IL-3, 10 ng/ml de GM-CSF, y 3U/ml de eritropoyetina (H4434, StemCell Technologies), y se cultivaron a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> en un ambiente saturado de humedad, por 14 días tras los cuales se realizó conteo de colonias mieloides totales.

## 7. ENSAYO DE MUERTE CELULAR

La muerte celular fue determinada por tinción con anticuerpo contra Anexina V conjugada con el fluorocromo Isotiocianato de fluoresceína (FITC) (BD Biosciences) y 7AAD (BD. Biosciences), o YoPro-1 (Thermofisher) y Yoduro de Propidio (BD Biosciences).

Al término de los tratamientos con PTL o DMAPT, las células fueron lavadas con solución amortiguadora (PBS) adicionada con SFB al 3%. Para la tinción con anticuerpo contra Anexina V, las células fueron incubadas en la presencia del amortiguador de Anexina V (51-66121E, BD Biosciences) y posteriormente teñidas con 7AAD. Para la tinción con Yo-Pro1 y Yoduro de Propidio, en ambas tinciones, las células fueron incubadas por 30 min a T ambiente, lavadas con PBS al 3% de SFB y

analizadas por citometría de flujo. El número de eventos para cada análisis fue de diez mil células por condición.

Para la detección de la activación de Caspasa-3 posterior al tratamiento con PTL o DMAPT, las células fueron lavadas con PBS y fijadas con para-formaldehído al 4% por 20 min a T ambiente, lavadas con PBS a 2500 rpm por 5 min y enseguida fueron permeabilizadas y bloqueadas con SFB al 10% y Tween 20 al 0.1% en PBS por 20 min a T ambiente. Las células fijadas y permeabilizadas fueron teñidas por 12 h con el anticuerpo contra caspasa 3 activa (560627, BD Biosciences) a 4 °C en oscuridad, posteriormente fueron lavadas con PBS al 3% de SFB y se analizaron diez mil eventos por cada condición experimental, mediante citometría de flujo multiparamétrica.

## 8. ENSAYO DE PROLIFERACION CELULAR

Para detectar proliferación celular, se utilizó la técnica de tinción con Diacetato Carboxifluoresceina (CFSE). Las células a evaluar fueron previamente incubadas por 30 min con CFSE a 1mM a 37 °C, posteriormente fueron lavadas 3 veces con RPMI al 10% de SFB, e incubadas por 48 o 72 h a 37 °C 5% de CO<sub>2</sub>, previo a ser sembradas en medio nuevo, una fracción de las células teñidas fue analizada por citometría de flujo, con el fin de obtener la intensidad media de fluorescencia (IMF) al tiempo cero (T0) y poder comparar con los distintos tratamientos. El resto de las células fueron sembradas con o sin PTL o DMAPT. Al término del tratamiento, las células fueron lavadas con solución amortiguadora (PBS al 3% de SFB) y teñidas con Yoduro de Propidio (1:100) con el fin de excluir a las células muertas durante el análisis citométrico.

## 9. DETECCION DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)

Con el fin de detectar Especies Reactivas de oxígeno las células previas a ser expuestas a PTL o DMAPT fueron incubadas con Diacetado de Diclorofluoresceina DCFDA (Abcam), Cell Rox APC (ThermoFisher) o MitoSox- Deep Red (ThermoFisher), por 30 min a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>. Enseguida las células fueron lavadas 3 veces y tratadas con o sin PTL o DMAPT por 1, 3 o 6 h. Como control positivo de estrés oxidativo se utilizó Peróxido de Hidrógeno. Una vez terminado el tratamiento, las

células fueron lavadas con solución amortiguadora (PBS al 3% de SFB) y analizadas por citometría de flujo.

#### 10. DETERMINACION DE ESTADO EN CICLO CELULAR Y REGULADORES DE CICLO

Con el objetivo de evaluar el estado en las distintas fases del ciclo celular, las células fueron tratadas por 48 h en presencia o ausencia de PTL o DMAPT, al término del tratamiento, las células fueron lavadas dos veces con solución amortiguadora (PBS al 3% de SFB) a 1200 RPM por 5 min y sometidas a separación de gradiente con Ficoll-paque (GE healthcare) por 15 min a 1800 rpm sin freno con el fin de obtener las células viables, posteriormente las células fueron fijadas con Etanol a 4°C y permeabilizadas con Triton X 100 a 0.2% en solución amortiguadora por 30 min a T ambiente, enseguida fueron lavadas a 5000 rpm por 5 min y teñidas con anticuerpo contra Ki67 acoplado a FITC (BD, Biosciences) y 7AAD en PBS al 10% de SFB por 12 h a 4 °C en oscuridad. Transcurrido ese tiempo las células fueron lavadas con solución amortiguadora y leídas por citometría de flujo en adquisición lenta.

Para la determinación de los reguladores de ciclo celular y tras el tratamiento con o sin PTL o DMAPT, las células fueron lavadas con solución amortiguadora (PBS al 3% de SFB) y fijadas con para-formaldehído al 4% por 30 min a T ambiente, posteriormente fueron permeabilizadas con Triton X 100 a 0.2% en solución amortiguadora por 30 min a T ambiente, enseguida fueron lavadas a 5000 rpm por 5 min y teñidas con los anticuerpos primarios anti-p21 (Santa Cruz), anti-CDK2 (78B2, Cell Signalling Technology), anti-ciclina D1 (92G2, Cell Signaling Thechnology) , anti-ciclina A2 (BF683, Cell Signaling Technology y 7AAD (BD, Biosciences), en prescencia de PBS al 10% de Suero Fetal Bovino por 12 h a 4 °C en oscuridad. Posterior a la incubación las células fueron lavadas con solución amortiguadora (PBS al 3% de SFB) y teñidas con los anticuerpos secundarios Alexa 488 anti-ratón IgG (4408, Cell Signaling Technology), y Alexa 647 anti-conejo IgG (4414, Cell Signaling Technology) para finalmente ser analizadas mediante citometría de flujo.

#### 11. LOCALIZACION INTRACELULAR DE PROTEÍNAS POR INMUNOFLUORESCENCIA



Con el objetivo de evaluar la localización intracelular de p65 tras el tratamiento con PTL o DMAPT, las células previamente cultivadas por 6 h en presencia o ausencia de partenolida o DMAPT, fueron lavadas tres veces con PBS a una velocidad de 1200 rpm por 5 min, las células viables se determinaron por tinción con azul de tripano, posteriormente fueron resuspendidas en PBS para alcanzar una densidad de 100 mil células por microlitro. Se colocaron 2  $\mu$ L en un portaobjetos y se esparcieron para formar un círculo de 1 cm de diámetro. Las células se dejaron secar sobre los portaobjetos y se colocaron en una caja Coplin con Metanol puro por 10 min a 20 °C. Las laminillas se dejaron secar y se les dibujó un círculo alrededor de las células con un plumón hidrofóbico. Las laminillas se colocaron en una cámara húmeda y se bloquearon y permeabilizaron con PBS al 10% de SFB y 0.1% del detergente Tween 20 (Sigma-Aldrich) por 30 min a T ambiente.

Transcurrido este tiempo, se removió la solución de bloqueo y se añadió el anticuerpo primario contra la proteína p65 (Santa Cruz Biothechnology, sc372), a una concentración 1:100 en solución de bloqueo por 2 h a t ambiente. Posterior a la incubación, las laminillas fueron lavadas 3 veces con PBS en una caja coplin por 15 min para enseguida ser incubadas en cámara húmeda protegida de la luz con anticuerpo secundario contra IgG de conejo acoplado al fluorocromo Alexa-488 (Invitrogen, A-11008, Waltham, MA) por 1 h a una concentración de 1:200 en solución de bloqueo. Tras la tinción secundaria se removió el anticuerpo y las laminillas fueron lavadas 3 veces con PBS en una caja coplin por 15 min, y una vez con agua bidestilada por 10 min. Las laminillas se montaron utilizando solución de montaje Vectashield con DAPI H-1200 (Vector) y los cubreobjetos fueron fijados con barniz de uña incoloro.

Las laminillas fueron visualizadas utilizando un microscopio EVOS (Life Technologies) y analizadas utilizando el software libre Fiji ImageJ.

## 12. INMUNOBLOT

### **12.1 Lisis celular**

Con el fin de evaluar los niveles relativos de fosforilación de p65, se realizaron ensayos de electrotransferencia de proteínas. Tras el cultivo por 6 h con o sin PTL o

DMAPT, las células fueron lavadas con solución amortiguadora (PBS al 3% de SFB) a 4 °C, a 1200 rpm por 5 min, posteriormente fueron lavadas con PBS a 6000 rpm por 6 min. Se eliminó todo el sobrenadante por aspiración y se le agregó al botón solución amortiguadora de lisis, (10 mM Tris, Ph 7.5, 50mM Cloruro de Sodio, 30mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 50mM Fluoruro de Sodio, 5μM Cloruro de Zinc, 1% Triton X-100) adicionado con 1mM Fluorido de Fenilmetanesulfonil (Sigma-Aldrich), Coctel inhibidor de proteasas (Merck-Millipore) y 20 μM de ortovanadato de Sodio (Sigma-Aldrich) para obtener una densidad de 20x10<sup>6</sup> células por mililitro, enseguida las células se sometieron a vortex por 3 seg y se incubaron en hielo por 10 min. Enseguida fueron centrifugadas a 13,000 rpm por 30 min a 4 °C. Finalmente, se colectó el sobrenadante y se mantuvieron las muestras a -80 °C hasta su análisis.

### ***12.2 Electroforesis en gel***

Se tomaron 39 μL de lisado de proteína y se le agregó 15 μL de solución amortiguadora Laemli (Biorad) y 6 μL de Ditrioetilol (Sigma-Aldrich). Las muestras fueron incubadas por 5 min a 95 °C con el fin de desnaturalizarlas y enseguida fueron colocadas en hielo.

Posteriormente 26 μL (volumen correspondiente a un extracto de docientas cincuenta mil células) de cada muestra fueron cargados en un gel de poliacrilamida al 7.5% con dodecilsulfato sódico (SDS) (Sigma-Aldrich) sumergido en cámara de electroforesis vertical con solución amortiguadora de corrimiento suplementada con antioxidante (NP0005, Invitrogen) y ortovanadato de sodio (Sigma-Aldrich). Las muestras fueron corridas a 120 V por 1 h con 40 min.

### ***12.3 Transferencia de proteína***

Una vez terminada la electroforesis. La transferencia de proteínas se realizó a una membrana de polifluoruro de vinilideno (ThermoFisher Scientific), (previamente activada con metanol puro por 30 seg), en húmedo en solución amortiguadora de transferencia en presencia de ortovanadato de sodio con 20% de metanol. La transferencia se realizó por 1 h a 90 V en cuarto frío.

### ***12.4 Bloqueo y detección***

Al término de la transferencia, la membrana fue bloqueada con Albumina de Suero Bovino al 5% en solución amortiguadora de Tris con Tween-20 al 0.1% por 1 h a T ambiente y con agitación, para posteriormente incubarse toda la noche a 4 °C en agitación con anticuerpos primarios contra fosfo-p65 1:1000 (Cell Signaling Technologies) p65 total 1:1000(c20) y beta –actina 1:2000 como control de carga. Las membranas fueron posteriormente lavadas 3 veces con TBS durante 15 min en agitación.

Como anticuerpos secundarios se utilizaron anticuerpos dirigidos contra Inmunoglobulina de conejo acoplado a un fluorocromo Alexa 680, y un anticuerpo dirigido hacia inmunoglobulina de ratón acoplado al fluorocromo Alexa 800 (LiCor, Biosciences). La incubación se realizó por 30 min y posteriormente se lavó 3 veces con TBS por 10 min en agitación.

Las membranas fueron reveladas en un sistema LiCOR Odyssey (Invitrogen, Waltham), y las imágenes se analizaron con el software Image Studio Lite™.

### 13. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL (qPCR)

Para la cuantificación relativa de transcritos, tras 6 h de tratamiento con o sin PTL o DMAPT, las células de líneas celulares o de muestras primarias enriquecidas en inmunofenotipo CD34+ linaje negativo, fueron lavadas dos veces con PBS a 1200 rpm por 5 min. Enseguida, se extrajo RNA de 1 millón de células utilizando el kit RNeasy de Qiagen (Qiagen), siguiendo las instrucciones de fábrica. Una vez hecha la extracción, las muestras se mantuvieron a -80 °C hasta su posterior uso.

La conversión a cDNA se realizó utilizando el ensayo Taqman RNA to CT 1 (Applied Biosystems) y para la cuantificación relativa de transcritos se utilizaron las siguientes sondas Taqman: NFκB1 (Hs00765730\_m1, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA), HMOX-1 (Hs01110250\_m1, ThermoFisher Scientific), PLAU (Hs01547054\_m1, ThermoFisher Scientific) y GAPDH (Hs02758991\_g1, ThermoFisher Scientific).

La tasa de cambio en expresión génica se calculó como el cambio en la expresión relativa respecto al grupo sin tratamiento, utilizando el método 2-DeltaDelta CT de Livak y Schmittgen (2001).

#### 14. CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de flujo se realizó en un FACS VERSE (BD, Biosciences), FACS Canto (BD, Biosciences), FACS LSR-II (BD, Biosciences), el análisis de archivos obtenidos se realizó utilizando el software FlowJo (FlowJo LLC).

#### 15. ANALISIS ESTADÍSTICO

Para la determinación de significancia entre los tratamientos se utilizó el software de estadística Prism (GraphPad). Los análisis estadísticos para determinar significancia variaron según el diseño experimental. Para la determinación de significancia entre control y tratamiento se utilizó la prueba de T de Student pareada o un análisis de varianza ANOVA. Para la determinación de significancia entre muestras primarias normales y leucémicas, se utilizó la prueba múltiple de Tukey, de Dunnett o una T de Student no pareada. Los grados de significancia se presentan en asteriscos, siendo 1 asterisco cuando el valor de p fue menor a 0.05, dos asteriscos cuando fue menor a 0.01 tres asteriscos cuando fue menor a 0.001 y cuatro asteriscos cuando el valor fue menor a 0.0001. Los valores con barras de desviación estándar representan experimentos realizados por triplicado.

## VIII. RESULTADOS

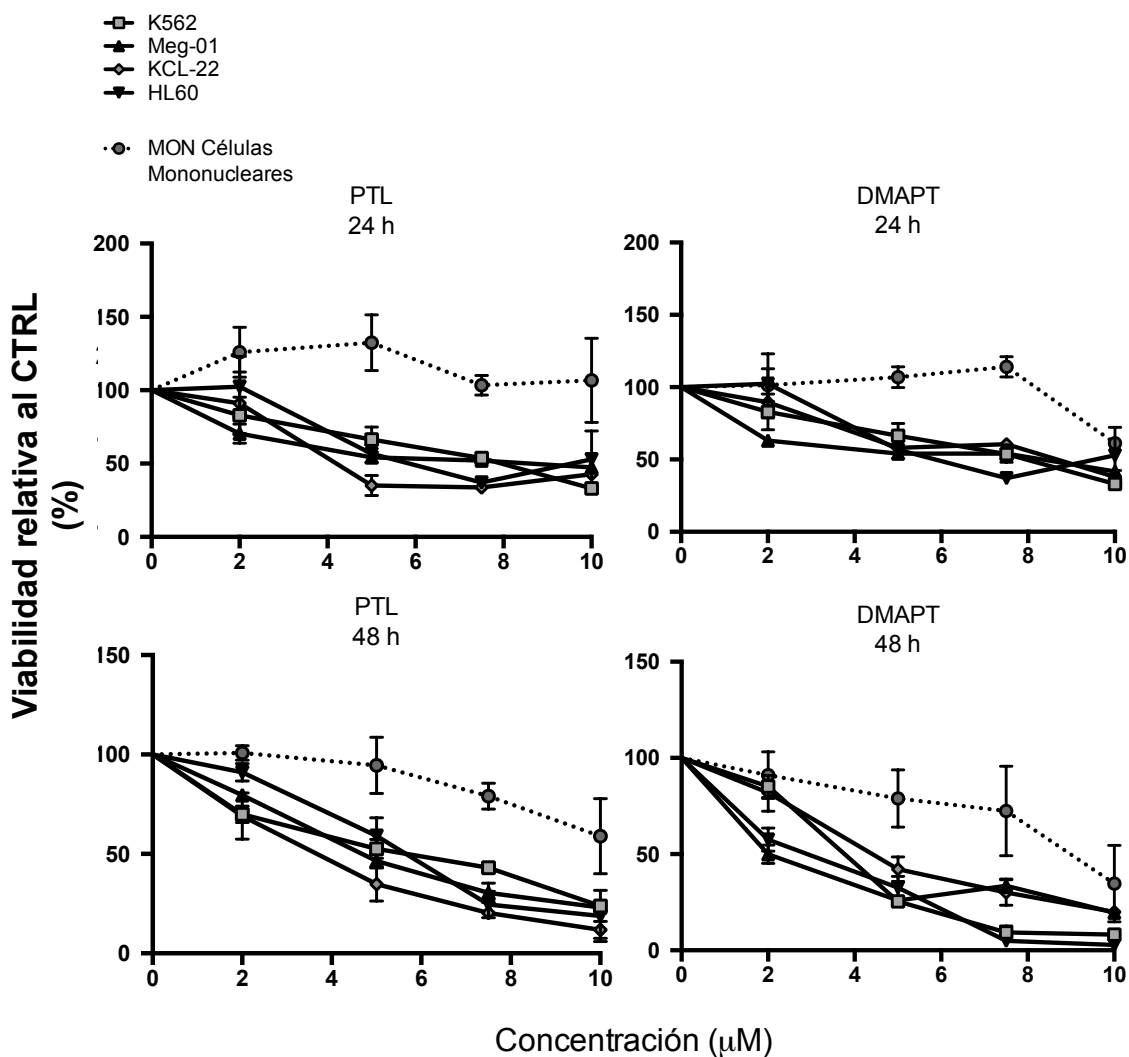
Con el fin de aportar conocimiento sobre el efecto biológico de partenolida y su análogo, Dimetil amino de partenolida (DMAPT), tanto en la población leucémica primitiva (CD34+lin-), como en blastos de LMC, se investigó el efecto de ambas moléculas sobre estas poblaciones. Así mismo se compararon los efectos biológicos sobre la contraparte normal tanto en células mononucleares de donadores hematológicamente sanos como en poblaciones primitivas enriquecidas en fenotipo primitivo.

### 16. 1. CITOTOXICIDAD DE PTL Y DMAPT

#### **1.1 Efecto sobre la viabilidad en líneas celulares y análisis probit**

Como primer acercamiento, se analizó la viabilidad celular por tinción con azul de tripano en células expuestas a PTL o DMAPT por 24 y 48 h. Los ensayos se realizaron en las líneas celulares de LMC: K562, Meg-01 y Kcl22, y la línea celular de LMA: HL60, la cual fue utilizada como control positivo del efecto de ambas moléculas tal y como se ha descrito en la literatura (Nakagawa *et al.*, 2005). Como control negativo se utilizaron células mononucleares provenientes de sujetos sanos, las cuales fueron sometidas a los mismos tratamientos.

Como lo muestra la figura 6, tanto la PTL como la DMAPT redujeron la viabilidad de todas las líneas celulares leucémicas de una forma dependiente de la concentración y del tiempo de exposición, mientras que, en el caso de su contraparte normal, dicho efecto no fue detectado a 24 h y solo se comienza a percibir después de 48 h de cultivo en presencia de ambos agentes.



**Figura 6. Viabilidad en células expuestas a PTL o DMAPT.**  
 Se determinó la viabilidad celular por tinción con azul de tripano en células de líneas celulares de leucemias mieloides y células mononucleares de MON expuestas a concentraciones crecientes de PTL o DMAPT por 24 o 48 h.

Con los valores de viabilidad obtenidos en las líneas celulares y con el objetivo de que los siguientes experimentos ser realizaran a concentraciones efectivas de PTL y DMAPT, en las cuales se observara un efecto biológico, se procedió a calcular las concentraciones inhibitorias del 50 (CI50). Para ello, se utilizó el modelo probit, un modelo estadístico de regresión lineal que nos permitió proyectar los valores CI50 a 24 y 48 h para las distintas líneas celulares (Figura Anexo 1, 2, 3 y 4).

Como se mencionó anteriormente, las líneas celulares de leucemias mieloides (K562, Meg-01, Kcl22 y HL60) mostraron una inhibición en su viabilidad concentración dependiente, con una progresiva pérdida de la viabilidad conforme la concentración aumentaba, los valores CI50 obtenidos se mantuvieron alrededor de 7  $\mu\text{M}$  para las 24 h y 5  $\mu\text{M}$  para 48 h (Figuras 7-10 y Tabla 3).

**Tabla 3. Valores de CI50.**

Los valores de concentración inhibitoria 50 (CI50) en líneas celulares expuestas a PTL o DMAPT por 24 y 48 h, obtenidos por técnica PROBIT.

Línea Celular	K562		Meg-01		Kcl22		HL60	
	PTL	DMAPT	PTL	DMAPT	PTL	DMAPT	PTL	DMAPT
24 h	7.3 $\mu\text{M}$	7 $\mu\text{M}$	7.3 $\mu\text{M}$	7.1 $\mu\text{M}$	7.2 $\mu\text{M}$	7 $\mu\text{M}$	7.4 $\mu\text{M}$	5.6 $\mu\text{M}$
48 h	5 $\mu\text{M}$	2.5 $\mu\text{M}$	4.8 $\mu\text{M}$	2 $\mu\text{M}$	3.7 $\mu\text{M}$	4.5 $\mu\text{M}$	4.6 $\mu\text{M}$	4 $\mu\text{M}$

### **1.2 Efecto de PTL y DMAPT en muestras primarias.**

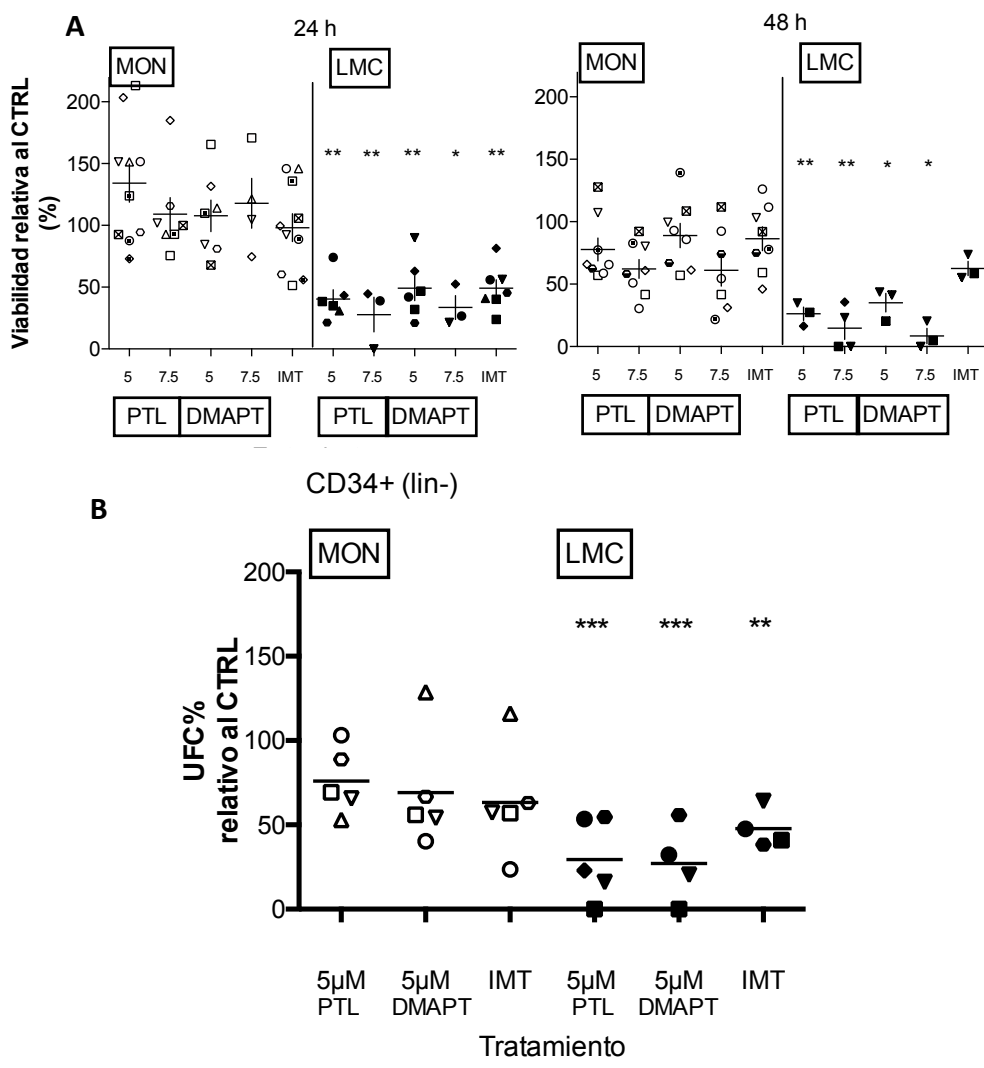
Una vez observada la concentración efectiva en la inhibición de células de LMC, se optó por exponer células mononucleares provenientes de MON y LMC (en fase crónica y vírgenes a tratamiento) por 24 y 48 h a 5 y 7.5  $\mu\text{M}$  de PTL o DMAPT. Como control positivo, se expusieron ambos tipos de muestras a 2.5 micromolar de IMT y cada exposición se realizó por triplicado (Fig. 7). La viabilidad se evaluó por tinción con azul de tripano, y se calculó obteniendo el promedio del porcentaje de células viables respecto al número observado con el control. La significancia fue determinada por una prueba de T de Student no pareada, para verificar diferencias entre las células de LMC y las células de MON en su respectivo grupo de tratamiento.

A las 24 h de exposición se observó una disminución en la viabilidad de células de LMC significativa en comparación con células de MON, la disminución presentó 2 grados de significancia en células expuestas a PTL, mientras que en células expuestas a DMAPT se observó significancia de 2 grados en el grupo expuesto a 5  $\mu$ M y de 1 grado en el grupo expuesto a 7.5  $\mu$ M. A las 48 h, las células de MON comenzaron a presentar una disminución en viabilidad, sin embargo, la disminución en las muestras de LMC se mantuvo significativa, comparada con su contraparte normal, siendo de 2 grados en el grupo expuesto a PTL, y de 1 grado las muestras expuestas a DMAPT. Las células de LMC expuestas a IMT presentaron disminución a las 24 h, efecto que no se observó a las 48 h (Fig. 7A).

### ***1.3 Capacidad formadora de colonias (CFU)***

El efecto diferencial observado entre células mononucleares de sujetos sanos y de muestras primarias llevó a investigar el efecto en poblaciones progenitoras hematopoyéticas con un ensayo funcional. La capacidad de formar colonias en medio semisólido es una característica propia de la población progenitora dentro de la estirpe hematopoyética. Para este análisis las células deben sembrarse en medio semisólido, en este caso Methocult (Stem Cell Technologies) con citocinas y después de 14 días de cultivo se evalúa la formación de colonias hematopoyéticas, en donde cada una de ellas era representativa una célula progenitora funcional. En la Figura 8A se muestran imágenes tomadas de cultivos realizados en el laboratorio, donde se observan los distintos tipos de colonias que forman estas poblaciones, cada una de ellas es producto de una célula progenitora con distinta capacidad de diferenciación, siendo la manera más sencilla de clasificarlas entre mieloides (CFU-E, CFU-M), eritroides (BFU-E) o mixtas (CFU-GEMM).





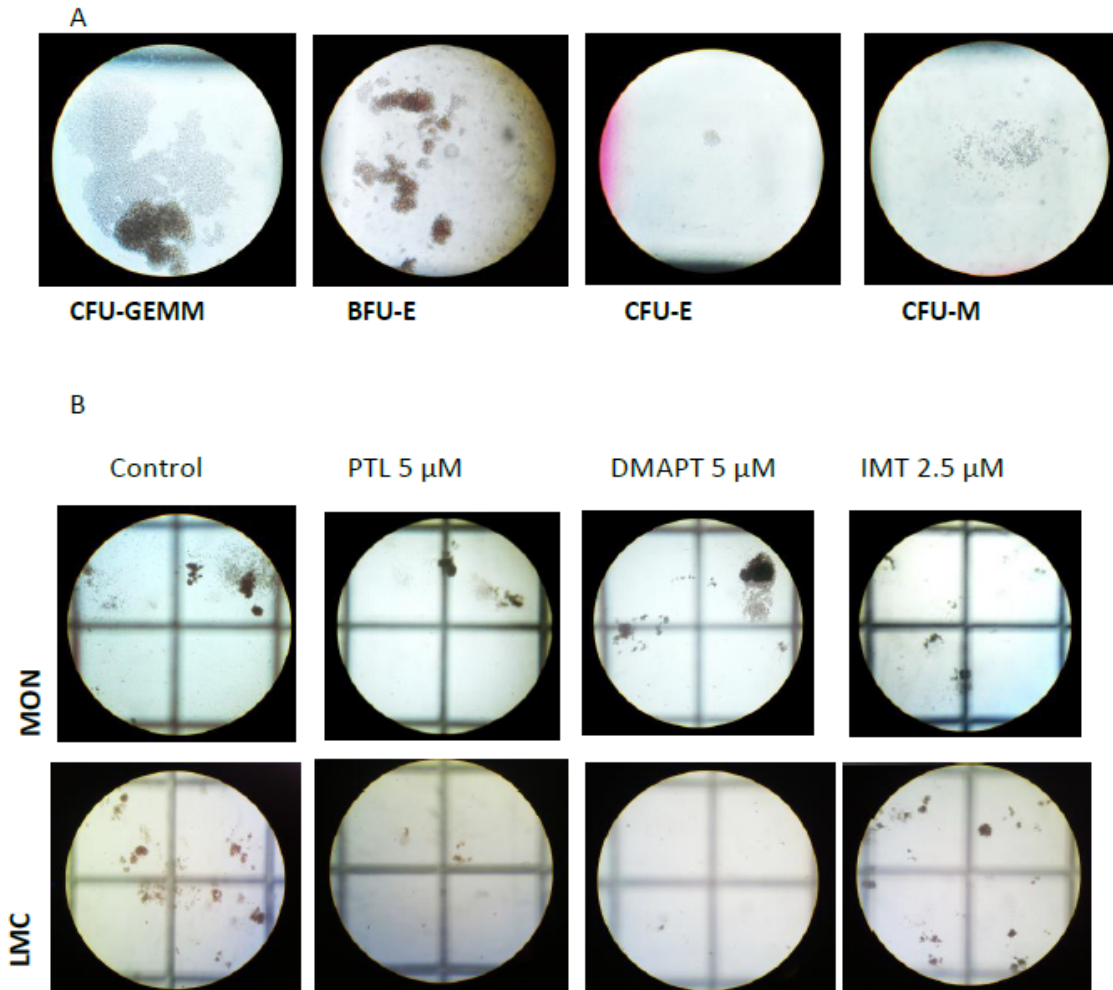
**Figura 7. PTL y DMAPT inhiben células primitivas y blastos de LMC.** **A.** Muestras primarias de pacientes con LMC en fase crónica y células de MON fueron expuestas a PTL y DMAPT. Se muestra el cálculo de viabilidad a partir de tinción con azul de tripano. La significancia se determinó por pruebas de T de Student no pareadas (se realizó una prueba por tratamiento). **B.** Se muestra el porcentaje de UFC con respecto al CTRL encontradas en células enriquecidas en inmunofenotipo CD34+ lin- tratadas con PTL o DMAPT a 14 días de cultivo. \*p<0.05 \*\*p<0.01 \*\*\*p<0.001

Con esto en mente, muestras provenientes de MON o LMC en fase crónica y virgen de tratamiento fueron enriquecidas por columna inmunomagnética de selección negativa para la obtención de células con inmunofenotipo CD34+ lin-. Las células enriquecidas se cultivaron a una densidad de cien mil células por mililitro, por 24 h con 5 µM de PTL o DMAPT o 2.5 µM de IMT en medio Stemspan (StemCell Technologies) adicionado con citocinas. A las 24 h las células fueron obtenidas y se determinó el

número de células viables por tinción con azul de tripano. Se sembraron cinco mil células viables por mililitro en Metilcelulosa adicionada con citocinas y se cultivaron a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>. Después de transcurridos 14 días se contabilizó el número de colonias hematopoyéticas y los resultados se graficaron en porcentaje de colonias relativas al número de colonias observadas en el grupo sin tratamiento, donde cada símbolo representa una muestra distinta. Los resultados fueron analizados por una prueba Dunnet para verificar significancia entre las células de LMC y las de MON bajo el mismo tratamiento (Fig. 7B y 8B). Las células tratadas con PTL y DMAPT mostraron una disminución significativa de 3 grados en el número de colonias formadas, indicando que ambas moléculas son capaces de inhibir la capacidad funcional de las células progenitoras de manera preferencial en poblaciones leucémicas que en poblaciones sanas.

## 2. EFECTO SOBRE LA MUERTE CELULAR

Con el fin de observar si la pérdida de viabilidad identificada en la figura 6 y 7 estaba relacionada a una inducción de muerte celular programada, se optó por tratar a las células por 24 h con o sin PTL o DMAPT. Se expusieron 3 líneas celulares de LMC (K562, Meg-01, y Kcl22) y la línea celular de LMA, HL60 a 7.5 y 10 µM de PTL o DMAPT por triplicado. Transcurridas 24 h, se realizaron ensayos de muerte celular descritos en la metodología. En la Fig. 9A se muestran diagramas de puntos representativos de los análisis citométricos y la Fig. 9B indica el promedio de los índices de muerte celular relativos al control de los tres experimentos. La significancia entre los tratamientos y el control se determinó utilizando una prueba de Dunnet. Las cuatro líneas celulares presentaron una inducción a muerte significativa, siendo HL60 la más sensible a ambas moléculas, y la menos sensible Meg-01.



**Figura 8. Ensayo de formación de colonias (CFU).** Células enriquecidas en inmunofenotipo CD34+lin-. Líneas celulares fueron tratadas con PTL o DMAPT. **A.** Se muestran diagramas de puntos, representativos del ensayo, donde se esquematiza el eje de las X como la señal de YoPro-1 y el eje de las Y representa la señal de 7AAD. **B.** Se calculó el índice de muerte celular considerando el porcentaje de muerte basal en el grupo CTRL como 1. La significancia entre células tratadas y el grupo control se determinó por análisis múltiple de Dunnet. Los ensayos fueron realizados por triplicado \* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$  \*\*\* $p < 0.001$  \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

Con el fin de comparar la respuesta a muerte celular en células provenientes de donadores sanos y muestras primarias de pacientes con LMC, se probaron células mononucleares provenientes de 2 muestras de médula ósea normal (MON), una muestra de un paciente en fase crónica (LMC-CP) y un paciente en crisis blástica (LMC-CB). Las células fueron tratadas por 24 h con concentraciones de 5, 7.5 10 o 20  $\mu$ M de PTL o DMAPT. Se consideraron células comprometidas a muerte aquellas que presentaron permeabilidad a Yopro-1 y 7AAD. Los resultados se presentaron por

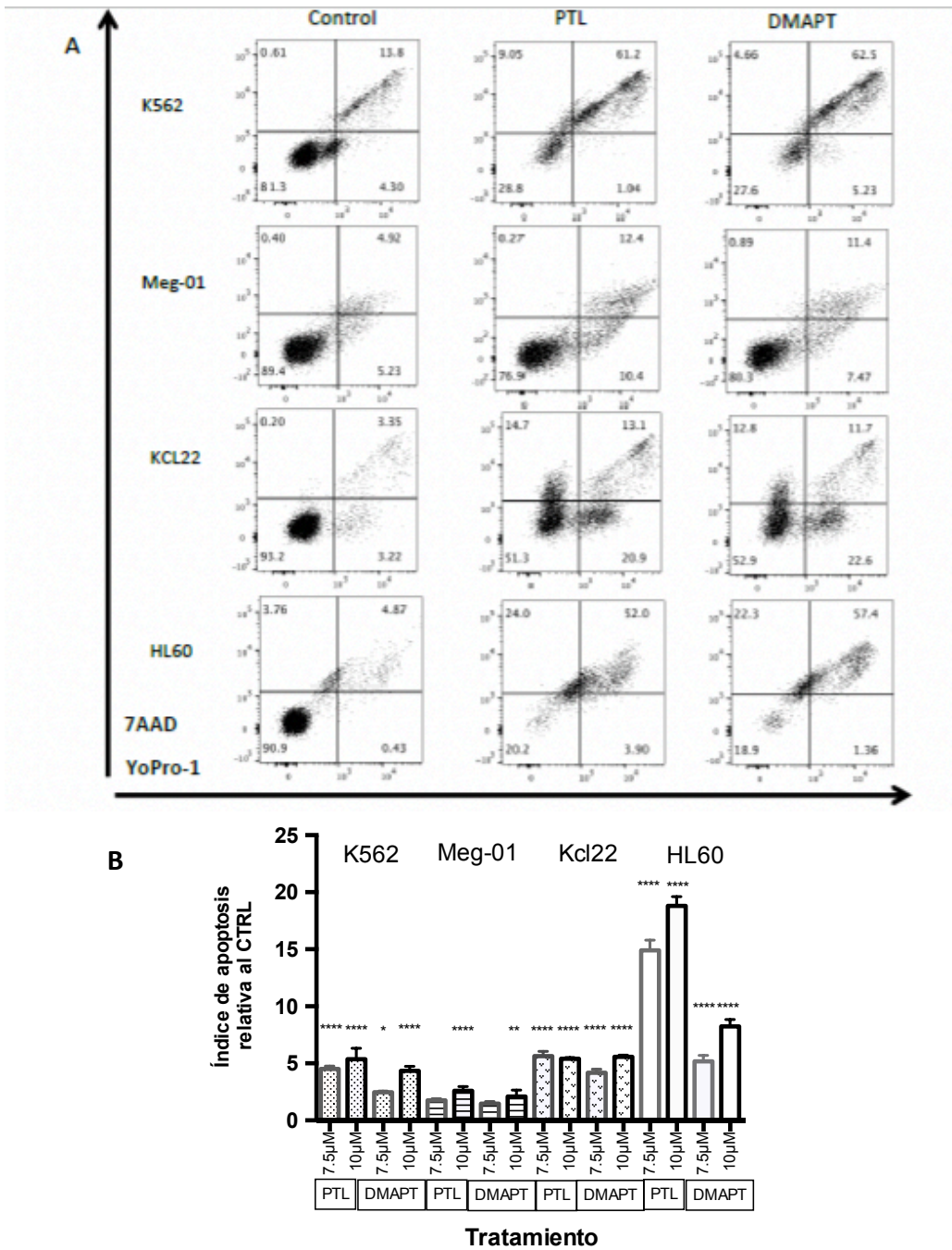
índice de muerte celular, y se realizó un análisis Tukey con el fin de verificar significancia entre las células provenientes de sujetos sanos y las de pacientes con LMC. En la figura 10 se observan diagramas representativos de los análisis citométricos ambas muestras

de LMC mostraron mayor sensibilidad a los tratamientos que su contraparte normal. La significancia entre los tratamientos se observó a 7.5, 10 y 20  $\mu\text{M}$  (Fig. 10).

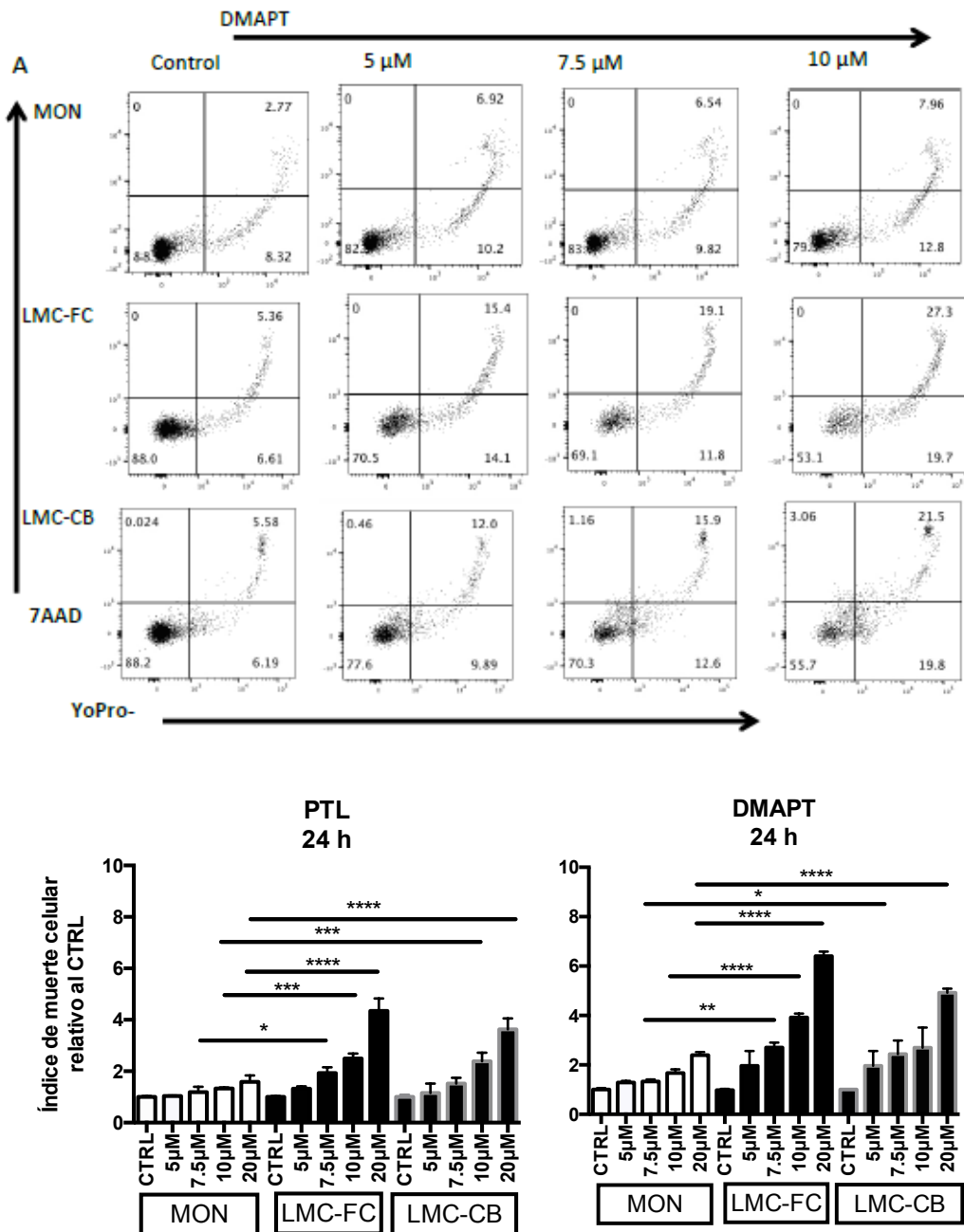
Con el fin de confirmar si la muerte celular observada en células expuestas a PTL y DMAPT (Fig. 10 y 11) era producto de un proceso apoptótico o de otro tipo de muerte celular programada, se buscó investigar la activación de caspasas en células expuestas a PTL o DMAPT. El acercamiento se realizó utilizando células provenientes de las líneas celulares utilizadas K562, Meg-01, HL60 y células provenientes de una muestra primaria de LMC en fase crónica enriquecidas en fenotipo CD34+ lin-.

Las células fueron pretratadas con 100  $\mu\text{M}$  de Z-Vad (un péptido inhibidor de la activación de caspasas), por 2 h y posteriormente fueron tratadas con PTL o DMAPT por 24 h. Al término de la exposición, las células fueron divididas en 2 partes, una parte fue teñida con Yo-Pro-1 y 7AAD con el fin de determinar el compromiso a muerte celular y la segunda parte de las células fue utilizada para determinar la activación de Caspasa-3, para ello, las células fueron lavadas y fijadas con paraformaldehído, permeabilizadas con el detergente Triton-100 y teñidas con el anticuerpo contra Caspasa 3 activa. Ambas fracciones celulares fueron analizadas por citometría de flujo y la significancia en ambas fracciones (entre el grupo control y los tratamientos) fue determinada por una prueba de Dunnet.

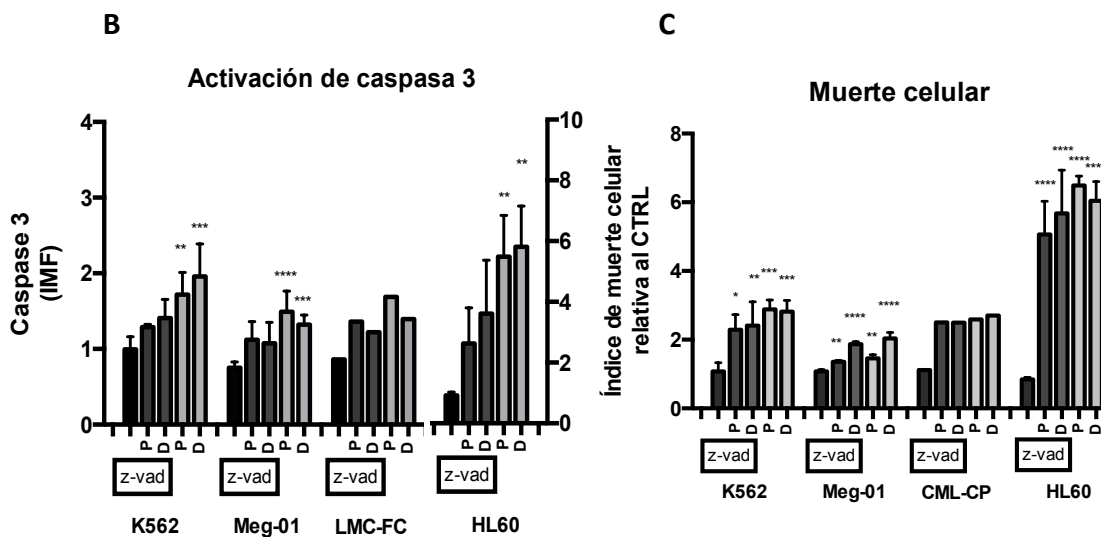
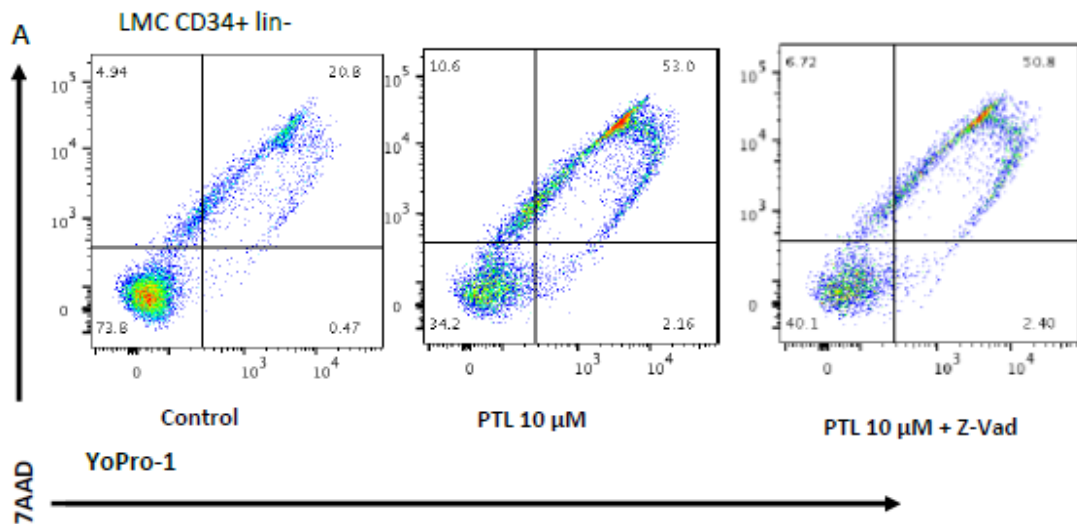
Nuestros resultados indicaron una activación significativa de Caspasa 3, tras la exposición a PTL y DMAPT, mientras que el pretratamiento con el inhibidor Z-Vad, causó un decremento en la activación de caspasa-3 (Fig. 11B). Sin embargo, la inhibición de caspasas no causó una disminución en la muerte celular en ninguna de las poblaciones leucémicas analizadas (Fig. 11C), lo cual sugiere que la muerte celular asociada a PTL o DMAPT en LMC es mayormente independiente de caspasas, tal y como ha sido reportado anteriormente en células de leucemia linfocítica crónica (Mateo et al., 1999).



**Figura 9. Muerte celular en líneas celulares.** Líneas celulares fueron tratadas con PTL o DMAPT. **A.** Se muestran diagramas de puntos, representativos del ensayo, donde se esquematiza el eje de las X como la señal de YoPro-1 y el eje de las Y representa la señal de 7AAD. **B.** Se calculó el índice de muerte celular considerando el porcentaje de muerte basal en el grupo CTRL como 1. La significancia entre células tratadas y el grupo control se determinó por análisis múltiple de Dunnet. Los ensayos fueron relaiados por triplicado \* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$  \*\*\* $p < 0.001$  \*\*\*\* $p < 0.0001$ .



**Figura 10. Muerte celular en células mononucleares.** Células mononucleares de 1 muestra de LMC en fase crónica, 1 muestra de LMC en crisis blástica y 2 muestras de MON fueron tratadas con PTL o DMAPT por 24 horas en medio líquido. **A.** Se muestran diagramas de puntos representativos del ensayo de muerte celular. **B.** Se muestran histogramas del índice de muerte celular considerando el porcentaje de muerte basal en el grupo control como 1. La significancia entre las células leucémicas tratadas y su contraparte normal (MON) se determinó por análisis múltiple de Tukey. Los ensayos fueron realizados por triplicado. \* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$  \*\*\* $p < 0.001$  \*\*\*\* $p < 0.0001$ .



**Figura 11. Mecanismo de muerte celular en células expuestas a PTL y DMAPT.** Células de líneas celulares (K562, Meg-01 y HL60) y una muestra primaria de un paciente de LMC en fase crónica enriquecida en fenotipo CD34+ lin- fueron pretratadas con o sin el inhibidor de caspasas Z-vad por 2 horas, posteriormente las células fueron tratadas por 24 horas con PTL o DMAPT. Al término del tratamiento, las células fueron teñidas con 7AAD y YoPro-1 y leídas por citometría de flujo, las células positivas para YoPro-1 únicamente fueron consideradas en muerte celular temprana y las dobles positivas consideradas como en proceso avanzado de muerte celular **A**. Se muestran diagramas de puntos representativos del ensayo, donde se esquematiza el eje de las X como la señal de YoPro-1 y el eje de las Y presenta la señal de 7AAD. **B**. Las células tratadas fueron fijadas, permeabilizadas y teñidas con un anticuerpo contra Caspasa 3 activada, acoplado al fluoróforo V450. Los niveles de señal se graficaron por IMF. **C**. Se calculó el índice de muerte celular considerando el porcentaje de muerte basal en el grupo tratado únicamente con Z-vad como 1. La significancia entre células tratadas y el grupo control se determinó por análisis múltiple de Dunnet. \* $p > 0.05$  \*\* $p < 0.01$  \*\*\* $p < 0.001$  \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

### 3. EL PAPEL DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS) EN EL TRATAMIENTO CON PTL Y DMAPT

#### **3.1 Efecto del tratamiento sobre los niveles de ROS**

Reportes anteriores de Guzmán y colaboradores han demostrado que PTL y DMAPT son capaces de inducir ROS en células de LMA. Aunado a ello Nieborowska-Skorska, et al., 2012 reportaron que poblaciones primitivas de LMC presentan un incremento en los niveles basales de ROS en relación a su equivalente normal; razón por la cual se buscó investigar si los niveles de ROS en células de LMC se modifican después del tratamiento con PTL o DMAPT. Para ello, células de LMC fueron teñidas con DCFDA y posteriormente tratadas con ambos compuestos por 1 h a 7.5  $\mu$ M para finalmente ser analizadas por citometría de flujo. En todos los casos se utilizó  $H_2O_2$  como control positivo.

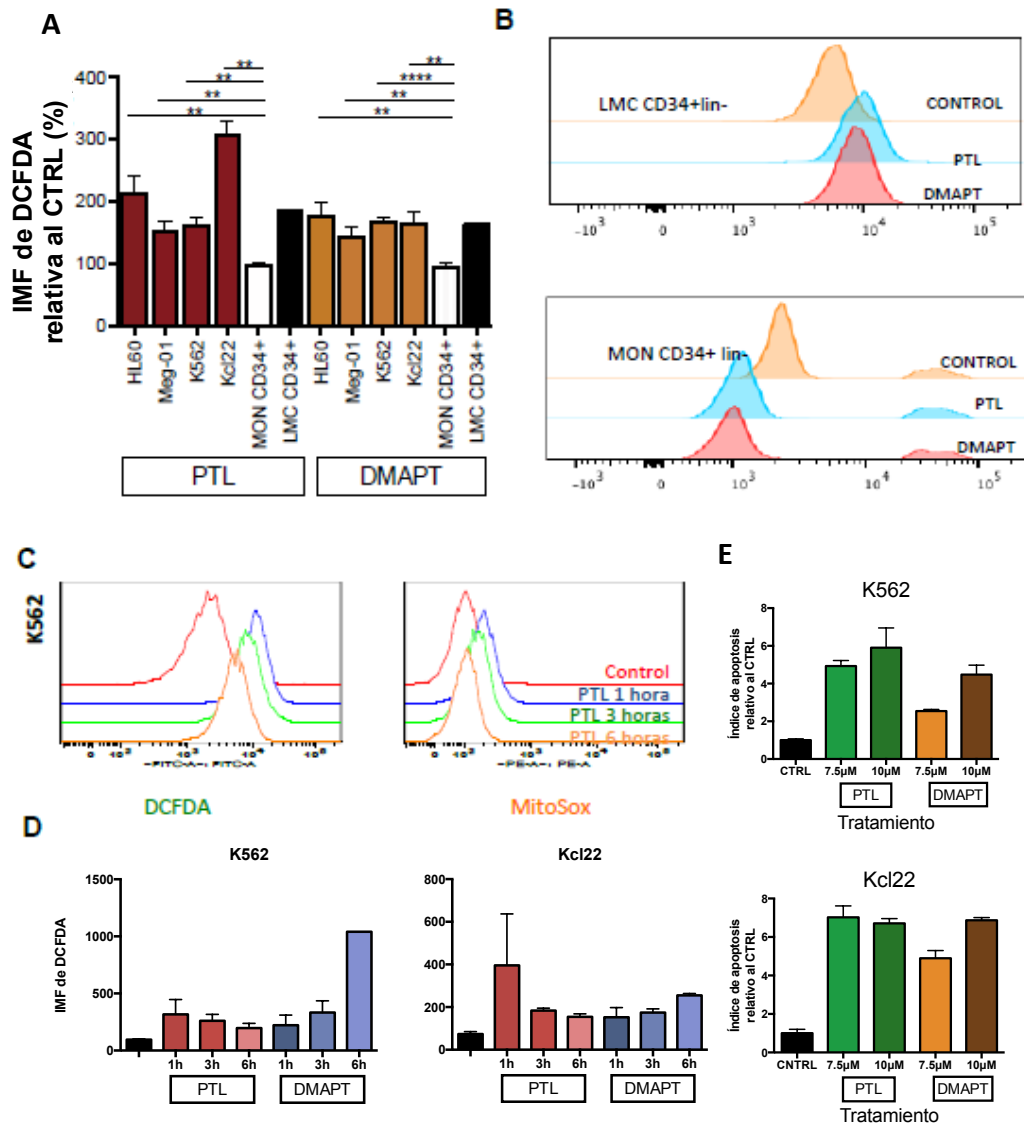
Los resultados muestran que semejante a lo ya reportado, las líneas celulares leucémicas tienen incrementado el nivel de ROS en relación a la normalidad. Dicha expresión es aún mayor al exponerlas a PTL o DMAPT (Fig. 12 A) en donde la significancia entre la respuesta de células leucémicas y células sanas fue determinada por una prueba de T de Student no pareada.

De manera interesante observamos que en células de MON enriquecidas en CD34+ lin, ninguno de los compuestos indujo un aumento en la IMF de DCFDA tras el tratamiento con PTL o DMAPT (Fig. 12 A y B), donde incluso se observó una tendencia a disminuir los niveles de ROS tras el tratamiento, lo cual podría indicar una mayor resiliencia a los efectos de ambos compuestos en la población primitiva normal.

#### **3.2 Cinética del estrés oxidativo inducido por PTL y DMAPT**

Con el fin de observar si los niveles de ROS presentaban una cinética al tratarse a las células con PTL o DMAPT, células de la línea celular K562 y Kcl22 fueron teñidas con DCFDA tratadas por 1, 3, o 6 h con 10  $\mu$ M PTL o DMAPT (Fig. 12 C y D).





**Figura 12. PTL y DMAPT inducen Especies Reactivas de Oxígeno en células de LMC.** **A.** Células de líneas celulares de LMC y muestras primitivas de LMC (n=2) y MON (n=3), fueron pre-teñidas con DCFDA y expuestas a PTL o DMAPT 7.5µM, tras 1 hora de tratamiento, las células fueron analizadas por citometría de flujo. La inducción de ROS se cuantificó calculando el nivel de aumento de intensidad Media de Fluorescencia de DCFDA, relativo al observado en las células control. **B.** Histogramas representativos de la señal de DCFDA observado en las muestras primarias expuestas a PTL y DMAPT. **C-D.** Células de las líneas celulares K562 y Kcl22 fueron expuestas a PTL (7.5µM) por 1, 3 y 6 horas, los niveles de ROS fueron evaluados por tinción con DCFDA, Mitosox y analizados por citometría de flujo. En la parte inferior se presentan los niveles de ROS en células tras el tratamiento. **E.** A las 24 horas de tratamiento se evaluó la muerte celular inducida por PTL. Se presenta el índice de muerte comparado con control en líneas celulares expuestas a PTL y DMAPT. La significancia entre la tasa de cambio de DCFDA entre las células primitivas de MON y las líneas celulares se determinó utilizando una prueba de T de Student no pareada \*\*p<0.01 \*\*\*\*p<0.0001.

Las células expuestas a PTL mostraron de manera consistente un pico en los niveles de ROS 1 h posterior al inicio del tratamiento, dicho pico se reduce conforme el

tiempo de evaluación continua, lo que sugiere, la adaptación de las células al estrés oxidativo inducido por PTL o DMAPT por algún mecanismo citoprotector. Cabe mencionar que, de manera consistente, el aumento de ROS se asocia al aumento en la concentración de PTL y DMAPT, así como el efecto en muerte celular (Fig. 12D).

### **3.3 Activación del sistema NrF2**

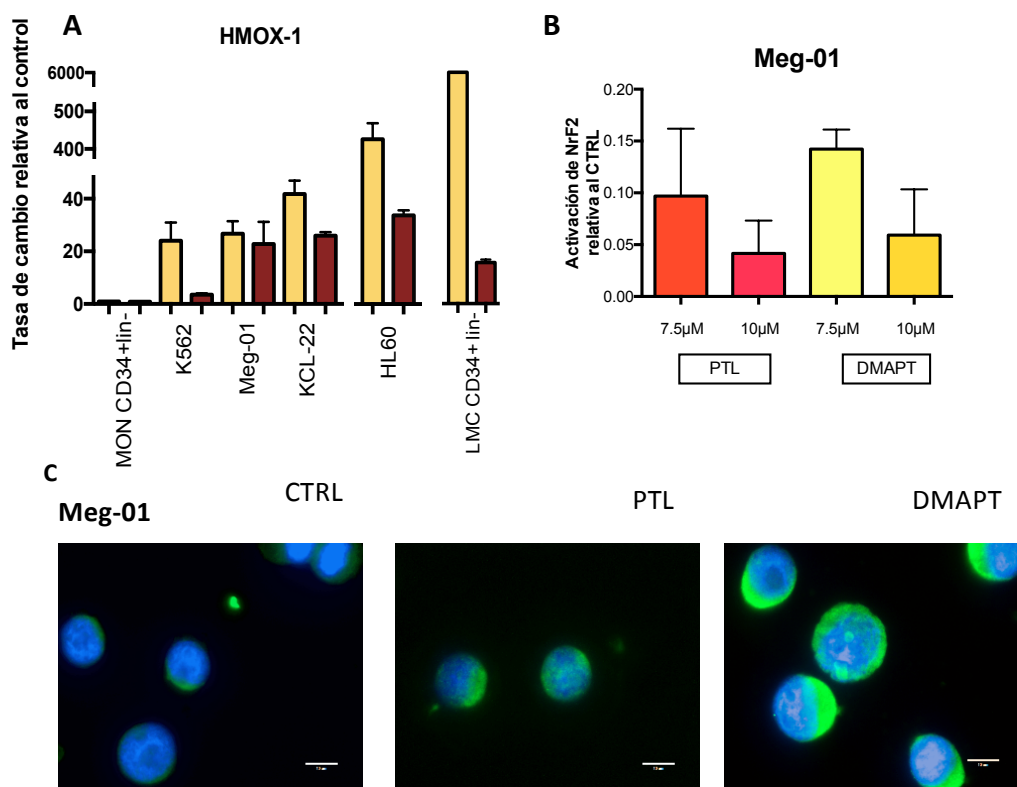
Anteriormente, se ha reportado la activación de sistemas citoprotectores en CTL de LMA, tras el tratamiento con PTL (Guzman et al., 2014), esto aunado a la disminución en los niveles de ROS tras el pico inicial a 1 h de tratamiento con PTL nos llevó a investigar si en células de LMC se daba la activación de un mecanismo citoprotector, por lo que se analizaron dos componentes del sistema NrF2: la localización subcelular del factor de transcripción NrF2 y la expresión de HMOX-1.

Para este análisis células de líneas celulares de LMC fueron expuestas a PTL o DMAPT por 6 h y se obtuvo RNA para la cuantificación relativa de Hmox-1 por PCR en tiempo real y se realizaron inmunofluorescencias tiñendo a las células con un anticuerpo contra NrF2 y DAPI, para visualizar la localización de la proteína relativa al control sin tratamiento.

A las 6 h se observó de manera consistente, un aumento en la tasa de cambio de expresión de HMOX-1 en células de LMC tratadas con PTL o DMAPT con respecto al control. Siendo el efecto mucho más fuerte en muestras primarias de LMC-FC enriquecidas en células CD34+ lin-. De manera muy interesante, no se detectaron cambios en la expresión de HMOX en las muestras de MON enriquecidas en la misma población celular, efecto que es consistente con la falta de aumento en los niveles de ROS en la contraparte normal de la población primitiva hematopoyética, al haber una resiliencia a los aumentos en ROS en esta población, razón por la cual el sistema Keap1 no sería activado y no desencadenaría en el aumento de la expresión de HMOX-1.

Con el fin de confirmar la activación de Keap1 en células de LMC, se realizaron ensayos ELISA de proteínas nucleares para la detección de NrF2 en núcleo e inmunofluorescencias con anticuerpo contra NrF2 para la localización del factor de transcripción. En este caso Células Meg-01 fueron tratadas por 6 h con o sin PTL o DMAPT y los resultados (Figura 13B) muestran una tendencia a aumentar la

localización nuclear de dicho factor de transcripción, lo que confirma la activación de un mecanismo citoprotector tras el tratamiento con ambos agentes.



**Figura 13. PTL y DMAPT inducen la activación del sistema Nrf2 en células de LMC. A.** Células de LMC de líneas celulares (K562, Meg-01, Kcl22), la línea HL60 y muestras primarias de LMC (n=2) y MON (n=2) enriquecidas en fenotipo primitivo (CD34+lin-) fueron tratadas con PTL o DMAPT por 6 h y lisadas para la obtención de RNA, se determinó la activación de Nrf2 por PCR cuantitativo del gen blanco HMOX-1, los niveles de expresión se presentan como tasa de expresión relativa al grupo control. **B.** Células de la línea Meg-01 fueron tratadas por 6 h con PTL y DMAPT 10uM por 6 h y lisadas para la obtención de proteínas nucleares, se realizó un análisis ELISA colorimétrica (Transam) para la cuantificación de Nrf2 adherido a DNA. **C.** Células de la línea celular Meg-01 fueron tratadas con PTL o DMAPT a 10uM por 6 h, fueron teñidas con anticuerpo contra Nrf2 y DAPI para observar la localización del factor de transcripción.

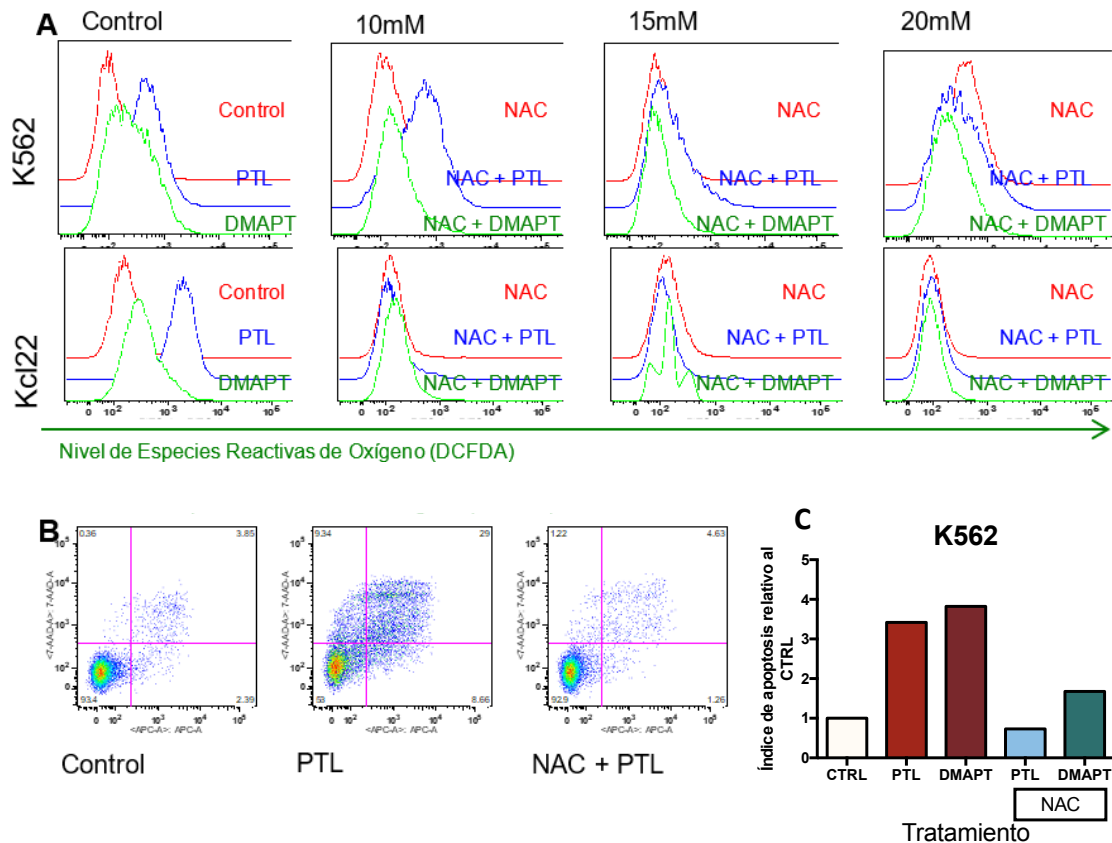
### 3.4 Dependencia en ROS en la inducción de muerte celular

Los aumentos en los niveles de ROS en respuesta a los tratamientos y la activación de respuestas citoprotectoras, nos llevó a verificar el papel de estos aumentos en el proceso de muerte celular. Para esto utilizamos al precursor de glutatión N-acetil

cisteína como un pretratamiento en las células Kcl22 y K562, con el fin de verificar el papel de las Especies Reactivas de Oxígeno en la inducción de muerte celular, durante el tratamiento con PTL o DMAPT.

Debido a la capacidad del NAC para modificar el pH en el medio, los medios preparados con NAC fueron ajustados en su pH hasta alcanzar el pH de 7.6 y con ello genera un estrés adicional a las células. Las células fueron pretratadas con NAC 15 mM por 1 h en incubadora, ya que los ensayos anteriores demostraron que esta concentración era la necesaria para revertir el efecto en los niveles de ROS observados tras el tratamiento con 10  $\mu$ M de PTL o DMAPT (Fig. 18) y lavadas 3 veces con PBS para eliminar NAC del sobrenadante, posteriormente fueron sembradas en medio nuevo y se les agregó PTL o DMAPT a 7.5  $\mu$ M o 10  $\mu$ M. A las 6 h de tratamiento, se tomó una fracción de las células en cultivo, estas células fueron lavadas y teñidas con Cell Rox (que detecta peróxido de hidrógeno) y Mitosox (que detecta el anión superóxido), con el fin de analizar dos tipos de ROS por citometría de flujo. Las células restantes fueron mantenidas en cultivo y a las 24 h de tratamiento, se evaluaron los niveles de muerte celular por tinción con YoPro-1, 7AAD y citometría de flujo. Los niveles celulares de Peróxido de Hidrógeno y Anión superóxido fueron expresados como IMF, mientras que el índice de muerte celular fue calculado considerando la muerte en el grupo control como 1. La significancia entre los grupos de tratamiento y el control fue determinada por una prueba de T de Student no pareada.

Las células pretratadas con NAC mostraron una reversión en los niveles de ROS en relación a lo observado en células tratadas únicamente con PTL o DMAPT (Fig. 15A y B). Aunado a lo anterior también se detectó ausencia de un aumento en los niveles de ROS tanto anión superóxido como en peróxido de hidrógeno, mismos que se vieron acompañados con una disminución significativa en los niveles de muerte celular, por lo que los resultados sugieren que la muerte celular inducida por PTL y DMAPT es dependiente de la inducción de ROS (Fig. 15C).

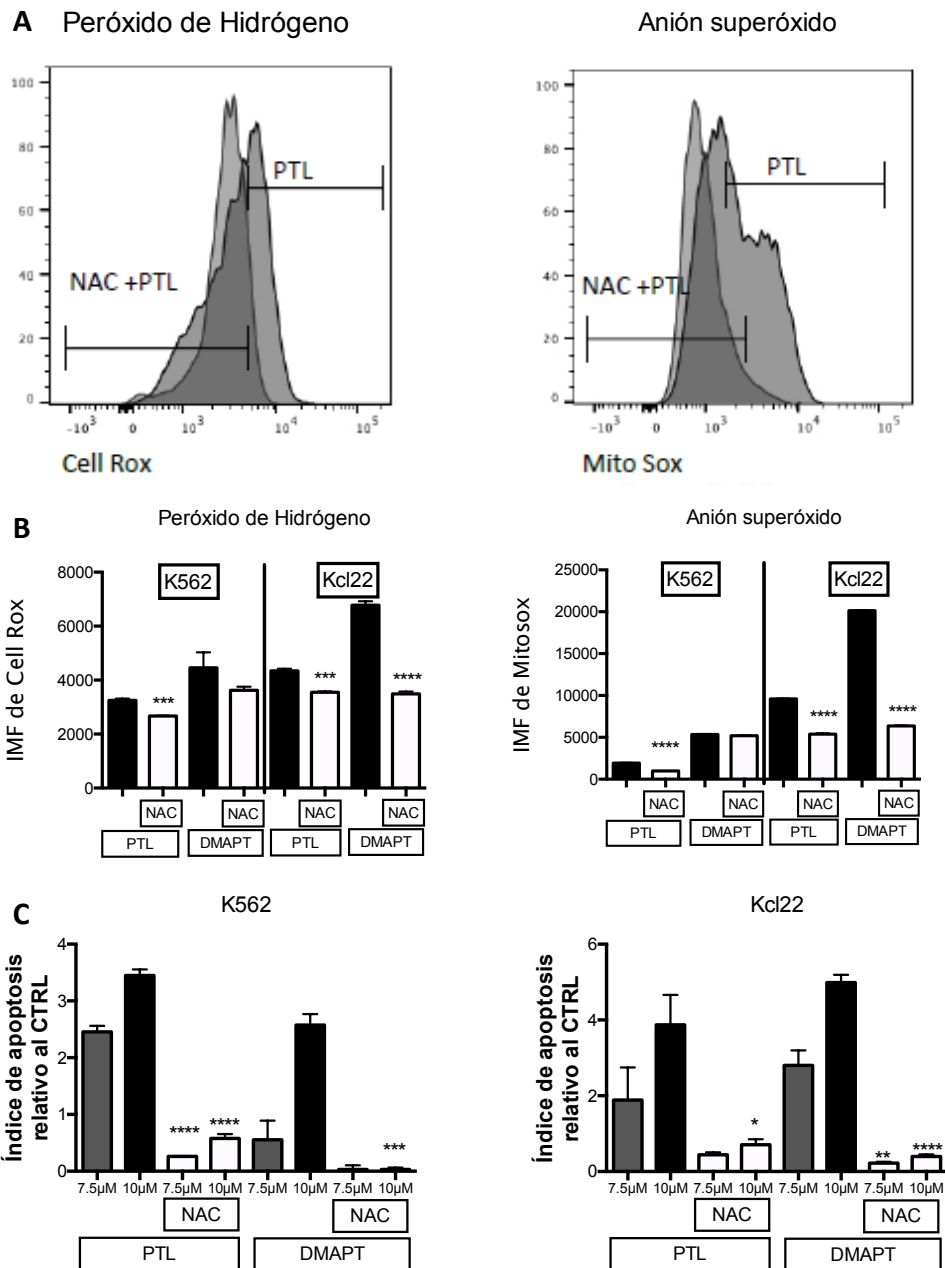


**Figura 14. La inducción de ROS por PTL y DMAPT es reversible por tratamiento con NAC. A.** Células de las líneas K562 y Kcl22 fueron pretratadas con el precursor de Glutacion N-Acetil cisteína (NAC) por 1 hora a distintas concentraciones y posteriormente fueron tratadas con PTL o DMAPT por 1 hora con o sin pretratamiento de NAC, la inducción de ROS se evaluó por tinción con DCFDA, Así como la muerte celular. **A.** Se muestran histogramas representativos del efecto de NAC sobre a inducción de ROS por PTL y DMAPT. **B.** Se muestran histogramas de puntos representativos de la muerte celular en células K562 tratadas con o sin PTL 10 $\mu$ M y pretratadas con NAC. **C.** Se muestran los valores obtenidos de la muerte celular con o sin pretratamiento de NAC.

#### 4. FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NF- $\kappa$ B

Guzmán y colaboradores (2001), anteriormente han reportado que la población troncal leucémica de LMA presenta activación constitutiva de NF- $\kappa$ B y su inhibición conduce a la reducción en el número celular leucémico. Con el fin de investigar el efecto de ambas moléculas en la actividad del factor NF- $\kappa$ B en el modelo de LMC, para ello las líneas celulares de LMC se expusieron por 6 h al tratamiento con PTL y DMAPT para posteriormente analizar la actividad del factor de transcripción por tres diferentes estrategias: en el primer acercamiento se realizaron inmunofluorescencias contra la proteína p65 total y DAPI para teñir núcleos, la segunda evaluación se

realizó mediante la obtención de extractos proteicos para realizar electrotransferencias de proteínas y



**Figura 15 La inducción a muerte celular por PTL y DMAPT es dependiente del aumento en ROS.** Células de las líneas K562 y Kcl22 fueron pretratadas con el precursor de glutatión (NAC) por 1 hora a 15mM, y posteriormente fueron tratadas con PTL o DMAPT (a 7.5 o 10 $\mu$ M) con o sin pretratamiento de NAC. **A.** Se muestran histogramas representativos los niveles de ROS de la línea K562 tratadas con PTL, con y sin pretratamiento de NAC. **B.** Se muestran los niveles de ROS en células expuestas a PTL y DMAPT con o sin pretratamiento con NAC, por tinción con Cellox y Mitosox. **C.** Las células pretratadas con 15mM de NAC fueron teñidas para la evaluación de apoptosis tras 24 horas de tratamiento con PTL o DMAPT. La significancia entre las células tratadas y el CTRL en IMF de los niveles de ROS y el índice de muerte celular se determinó utilizando una prueba de T de Student no pareada. \*p<0.05 \*\*p<0.01 \*\*\*p<0.001 \*\*\*\*p<0.0001.

detectar p65 fosforilado y p65 total (en este caso se utilizó como control de carga se utilizó la proteína Beta actina y se manejó un control positivo expuesto a LPS por 1 h), y finalmente se realizó extracción de RNA para la cuantificación por PCR en tiempo real de 2 genes blanco de NF- $\kappa$ B, el gen NF $\kappa$ B1(p50) Y PLAU (urocinasa activadora del plasminógeno).

#### **4.1 Localización de NF- $\kappa$ B**

Las imágenes obtenidas de los ensayos de inmunofluorescencia fueron analizadas utilizando el programa Fiji ImageJ determinando localización de p65, a través de colocalización en región nuclear (tinción con DAPI). La significancia de las imágenes de grupos tratados con el grupo control fue determinada utilizando un análisis de varianza ANOVA. Nuestros resultados de inmunofluorescencia indican activación basal de NF- $\kappa$ B en el grupo control en la ausencia de estímulo, donde se observa la señal de p65 tanto en citoplasma como intercalando con la señal de DAPI en el núcleo. Posterior al tratamiento con PTL y DMAPT se observa que las células tienen los núcleos teñidos con DAPI en una mayor intensidad que el control, mientras que la señal de p65 se encuentra en la periferia de los núcleos y el citoplasma (Fig. 16A). Tanto el tratamiento con PTL o DMAPT causó una disminución significativa en la colocalización nuclear de p65, sugiriendo una disminución en su actividad transcripcional (Fig. 16B).

#### **4.2 Fosforilación de NF- $\kappa$ B**

En los ensayos de electrotransferencia se trataron a células de las líneas K562, Kcl22, HL60 y una muestra de LMC enriquecida en CD34+ lin- a PTL 7.5 y 10  $\mu$ M. Como control positivo de la activación de NF- $\kappa$ B se utilizó estímulo con Lipopolisacárido de *Escherichia coli* (LPS) a 200 ng/ $\mu$ L por 1 h. Con el fin de cuantificar los niveles de fosforilación observados en las electrotransferencias, se analizaron las intensidades de señales utilizando el programa ImageStudio Lite™, las señales se cuantificaron señales de p65 fosforilado con respecto a p65 total y este con respecto a la señal de la proteína de control de carga (beta-actina). Posteriormente los valores fueron presentados, considerando la señal de fosfo-p65 en el grupo control como 100%. En

el caso de K562 y HL60, se promediaron los valores de triplicados, en el caso de kcl22 y la muestra primaria de LMC, se promediaron de duplicados (Fig. 17B).

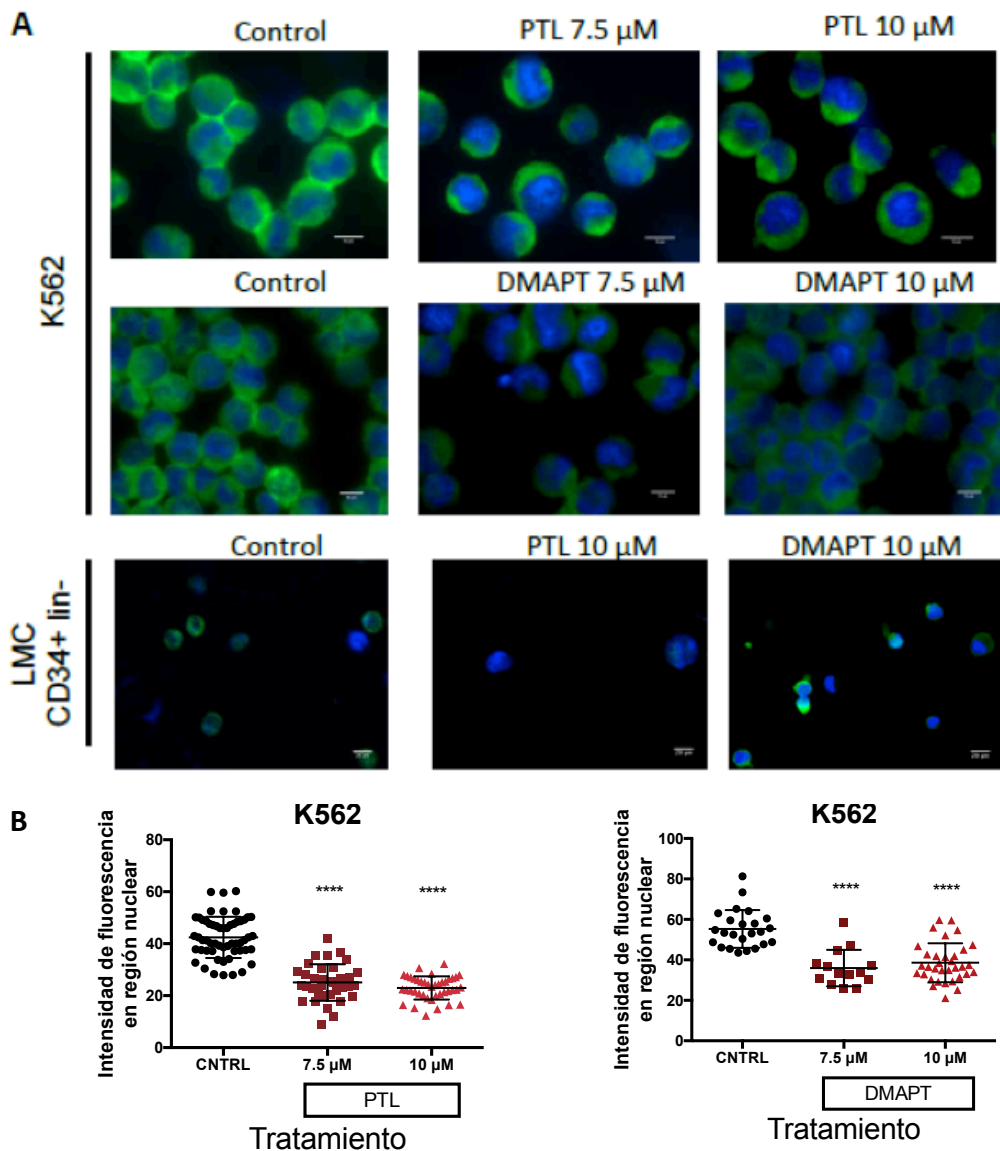
En general los 4 tipos celulares mostraron una activación basal del factor NF- $\kappa$ B, ya que se logró detectar en todos los grupos control una fracción de p65 que se encuentra fosforilado del p65 total (Fig. 17A). En las líneas celulares de LMC (K562 y Kcl22) se observó de manera consistente que los niveles de p65 total se mantuvieron similares en los distintos tratamientos, sugiriendo que PTL no induce cambios en la presencia de la proteína p65, sin embargo, se detectaron decrementos en los niveles de p65 fosforilados en ambas líneas cuando fueron tratadas con PTL (Fig. 17 A y B). Un resultado similar se observó en la muestra primaria de LMC enriquecida en fenotipo primitivo CD34+ lin-, donde no se observaron cambios en los niveles de p65 total, pero si hay un aparente decremento en la fracción de p65 fosforilado (Fig. 17 A y B). En el caso de la línea celular HL60, las células mostraron un decremento tanto en los niveles de la fracción de p65 fosforilado como en los niveles de p65 total, indicando una inhibición tanto de la activación como de la presencia del factor de transcripción en la célula (Fig. 17 A y B). Por su lado el estímulo con LPS indujo una activación en la línea celular K562, Kcl22 y la muestra de LMC, sin embargo, su efecto no fue notable en la línea HL60 (Fig. 17B). Estos resultados son consistentes con los descritos anteriormente y sugieren la inactivación de NF- $\kappa$ B tras el tratamiento con ambas moléculas.

#### **4.3 Actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B**

Con el fin de evaluar la actividad funcional de NF- $\kappa$ B en respuesta al tratamiento con PTL o DMAPT se realizaron ensayos de expresión de genes blanco de p65 utilizando PCR en tiempo real (qPCR), que permite extrapolar los niveles relativos a un estímulo de un RNA específico. Los ensayos fueron realizados en 4 líneas celulares de LMC (K562, Kcl22, Meg-01, Kasumi-4), una línea celular de LMA HL60, dos muestras de MON enriquecidas en CD34+ lin- y dos muestras de LMC en fase crónica enriquecidas en CD34+ lin-. Las células fueron sembradas a densidad de 300 mil células por ml y se expusieron a 6 h de tratamiento con PTL o DMAPT a 7.5  $\mu$ M. Tras este tiempo las células fueron lisadas para la obtención de RNA mensajero y el RNA fue sometido a qPCR para la cuantificación de los RNA mensajeros de los genes NF $\kappa$ B1, PLAU y



GAPDH como gen endógeno. Los resultados de los ensayos fueron graficados como tasa de expresión relativa al control sin tratamiento, relativa al gen control endógeno (GAPDH), y los valores obtenidos fueron calculados utilizando el método de expresión relativa  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak *et al.*, 2001).



**Figura 16. PTL y DMAPT inhiben la localización de NF- $\kappa$ B en células de LMC.** Células de la línea celular K562 y una muestra de LMC enriquecida en fenotipo primitivo (CD34+ lin-) fueron cultivadas por 6 horas con o sin PTL o DMAPT y teñidas con anticuerpo contra p65 y DPAI. **A.** Fotografías de campos representativos, de células fijadas y teñidas con un anticuerpo contra p65 total (verde) y el núcleo DAPI (azul). **B.** Las imágenes obtenidas fueron analizadas para obtener la intensidad de fluorescencia de la señal p65 co-localizada con la región nuclear. La significancia fue determinada realizando un análisis de varianza ANOVA de una vía. \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

Nuestros resultados mostraron una inhibición consistente de la expresión de NF $\kappa$ B1 (p50) en las líneas celulares de LMC y en las poblaciones primitivas de LMC (Fig. 17C),

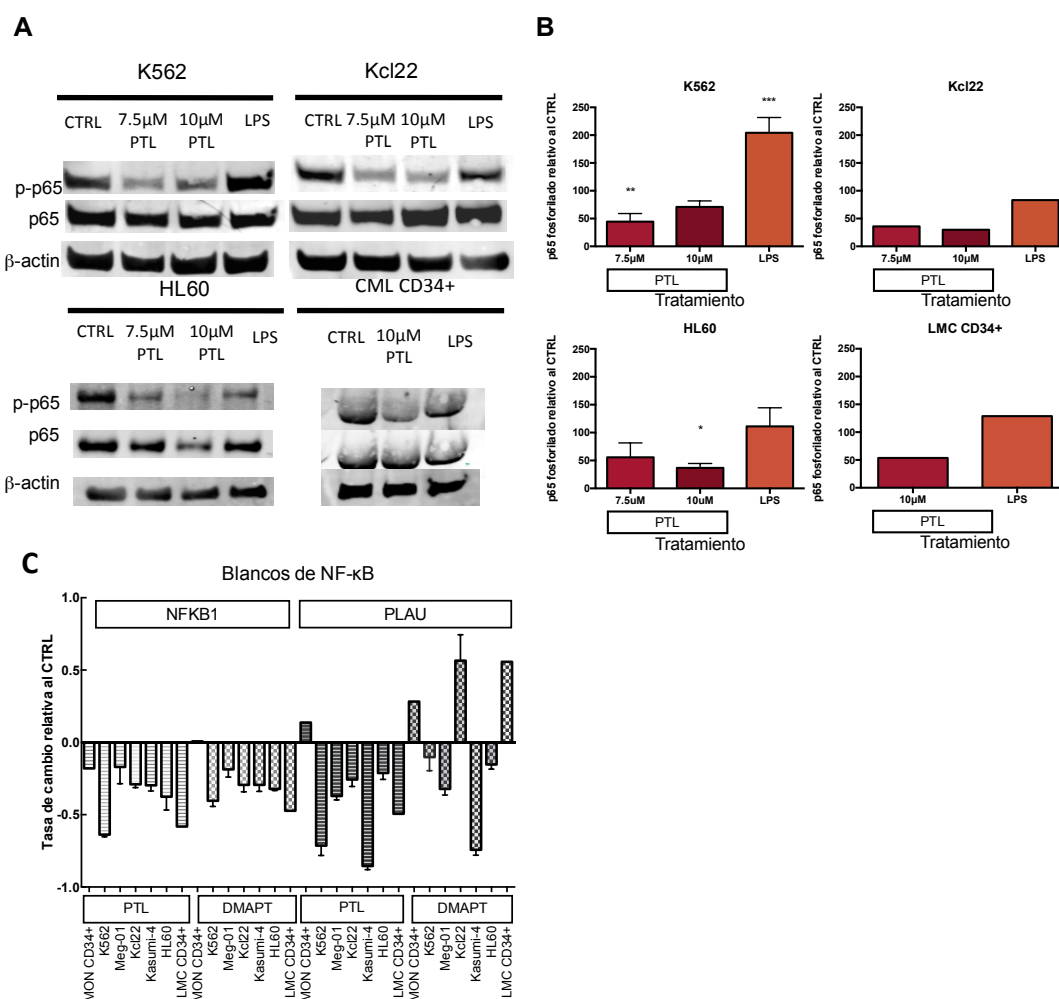
por otro lado, la población primitiva proveniente de MON mostró una menor inhibición cuando fueron expuestas a PTL y no presentó inhibición en la expresión de NFκB1 (Fig. 17C). En el caso de la expresión de PLAU, se observó en células expuestas a PTL, que estas presentaron una inhibición en su expresión, excepto las provenientes de MON, mientras que las tratadas con DMAPT mostraron respuestas diferenciales, mientras que K562, Meg-01 y Kasumi-4 mostraron una inhibición en la tasa de expresión de PLAU, mientras que las muestras de LMC CD34+ y Kcl22 mostraron una inducción en la expresión del gen, así como la población primitiva proveniente de muestras MON (Fig. 17C). Estos resultados confirman la reducción en la actividad transcripcional de NF-κB en respuesta a PTL y DMAPT

## 5. PROLIFERACION Y CICLO CELULAR

### ***5.1 Retraso en la proliferación celular***

Los tratamientos actuales para LMC (ITC) han demostrado efectividad en la eliminación de células maduras y proliferantes, sin embargo, estos fármacos, son incapaces de eliminar a las CTL, la estrategia más evidente que se observa en esta fracción sobreviviente es la disminución en la proliferación celular y la inducción de quiescencia. Con el fin de indagar el efecto de PTL y DMAPT sobre la proliferación celular, se buscó investigar el efecto de ambas moléculas en las células sobrevivientes al tratamiento.

Células de las líneas celulares K562, KCL22, Meg-01, HL60 y CMN de LMC fueron teñidas con diacetato de carboxifluoresceína (CFSE) y posteriormente cultivadas con o sin PTL o DMAPT (a 7.5 o 10 μM) por 48 h para finalmente ser teñidas con con Yoduro de Propidio, con el fin de detectar a las células sobrevivientes. Las células fueron analizadas por citometría de flujo y considerando el nivel de CFSE, se hizo un cálculo de la proliferación celular (la tinción con CFSE, permite obtener un estimado relativo de la proliferación celular, al contar con células teñidas en el tiempo cero (T0), las células que sufren una división celular pierden el 50% de la tinción con CFSE, causando una pérdida en la IMF proporcional a la proliferación celular).



**Figura 17. El tratamiento con PTL y DMAPT, se ve acompañado de inhibición de NF-κB en células de LMC.** Líneas celulares de leucemia y células primitivas (CD34+ lin-) de pacientes con LMC y donadores hematológicamente sanos fueron cultivadas en la presencia o ausencia de PTL o DMAPT a 7.5 y 10μM. **A.** Immunoblot representativo para la detección de p65 fosforilado, p65 total y la proteína beta actina como control de carga, en células tratadas con PTL por 6 horas, se utilizó tratamiento con LPS como control positivo para la activación de NF- κB. **B.** Se calcularon los niveles de p65 fosforilado a través de análisis densitométrico, las gráficas presentan los valores de señal relativa a p65 total, relativas a la proteína de control de carga. Los valores se ponderaron considerando la señal del grupo control como 100%. **C.** Representa un análisis de la expresión transcripcional de blancos moleculares de NF- κB (NFκB1 y PLAU) en células expuestas a PTL o DMAPT por 6 horas. La significancia entre tratamientos y CTRL se determinó por análisis de varianza ANOVA. \*p<0.05 \*\*p<0.01 \*\*\*p<0.001.

Nuestros resultados muestran que, tras 48 h de tratamiento, las células sobrevivientes se encuentran retrasadas en proliferación con respecto al grupo sin tratamiento (Fig. 18A). Dicho efecto varió entre las líneas celulares, siendo el retraso observado en la línea K562 más fuerte, ya que las células tratadas presentaron una IMF similar a la vista en el T0 correspondiente, mientras que la línea KCL22, no

presentó un retraso significativo (Fig. 18A). Las células mononucleares de LMC (LMC CMN), mostraron un retraso moderado en la proliferación celular, pero de manera interesante se observaron dos picos en el histograma que se separaron en los tratamientos con PTL y DMAPT, sugiriendo una fracción celular que es capaz de mantener la proliferación celular observada en el grupo control, y otra población que tiende a un retraso en la proliferación (Fig. 18A).

### ***5.2 Estado en el ciclo celular y dependencia en ROS***

El efecto observado en la proliferación celular sugirió cambios en los estadios del ciclo celular, por lo que se buscó investigar, si el tratamiento con PTL y DMAPT llevaba a las células que permanecen aún después de tratamiento a mantenerse en algún tipo de arresto en una etapa específica del ciclo celular, para ello las líneas celulares K562, Kcl22 y una muestra de LMC enriquecida en inmunofenotipo primitivo (CD34+ lin-), fueron tratadas por 48 h con o sin PTL o DMAPT 10  $\mu$ M, al término del tratamiento se obtuvo la fracción sobreviviente con fraccionamiento Ficoll-paque, las células obtenidas fueron fijadas, permeabilizadas y teñidas con anticuerpo conjugado contra Ki67, 7AAD y analizadas por citometría de flujo. La expresión de Ki67 se utilizó para diferenciar el estado quiescente (G0) de G1 y M, mientras que el contenido de ADN (tinción con 7AAD), permitió diferenciar el estadio G0/G1 del estadio S y G2.

Nuestros resultados indican un aumento consistente tanto en las líneas celulares como en la población primitiva de la fracción celular quiescente (G0), mientras que se observa a su vez un aumento en la fracción celular en fase G1 en las líneas celulares, mientras que la muestra mostró una tendencia a una disminución en esta fase, sugiriendo que aquellas células en la primera fase de crecimiento son reclutadas a un estado quiescente (Fig. 19 A-B).

Los cambios observados en el ciclo celular nos llevaron a preguntarnos si el efecto estaría relacionado a la inducción de ROS por PTL y DMAPT por lo que células de la línea celular K562 fueron pretratadas con NAC (15mM) por 1 h y tratadas con PTL o DMAPT por 48 h, al terminar el tratamiento las células sobrevivientes fueron separadas por ficoll-paque para obtener células viables, fijadas y teñidas con anticuerpo contra Ki67 y 7AAD para determinar estado en ciclo celular. Las células

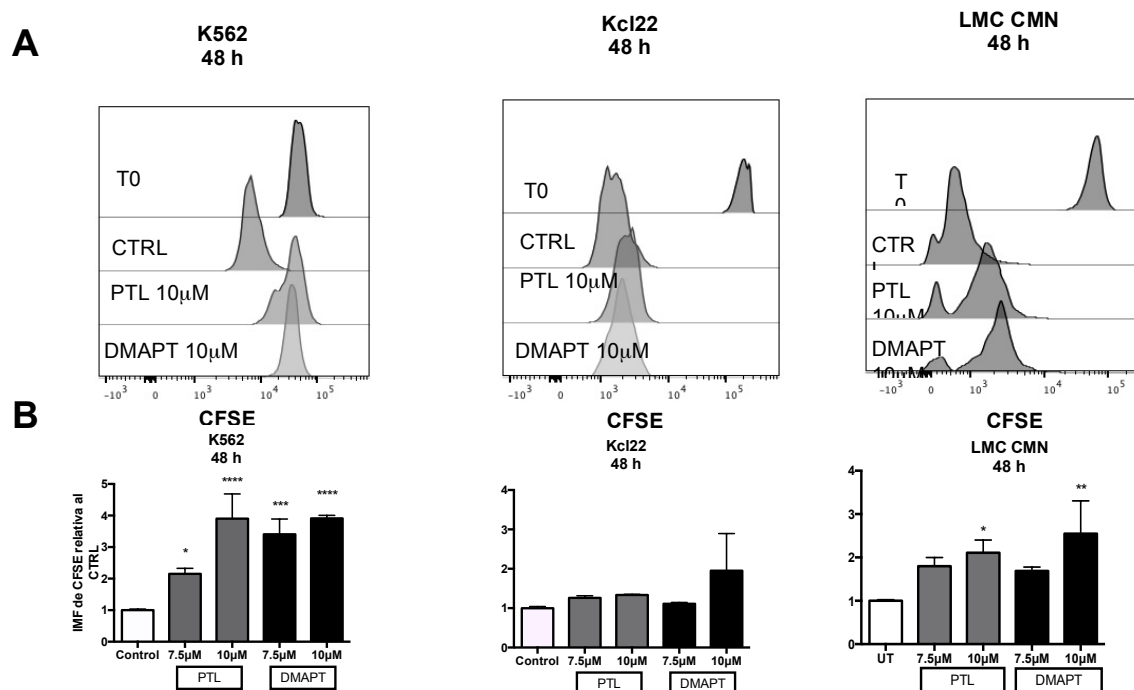
pretratadas con NAC mostraron cambios similares a los observados con PTL y DMAPT únicamente, caracterizados por un incremento en la fracción G<sub>0</sub>, sugiriendo que el efecto en el ciclo celular mostrado inicialmente es independiente de la inducción de ROS (Fig. 19C).

### ***5.3 Efecto en los niveles de reguladores de ciclo.***

Con el fin de investigar el efecto de PTL y DMAPT sobre reguladores de ciclo celular en células de LMC, como ha sido reportado anteriormente en células de LMC expuestas a ITC (Moreno-Lorenzana et al., 2016). Células de la línea K562 y una muestra primaria de LMC en fase crónica enriquecida en fenotipo primitivo (CD34+lin) fueron tratadas por 48 h con o sin PTL o DMAPT a 10  $\mu$ M, al término del tratamiento, se obtuvieron las células sobrevivientes por fraccionamiento con Ficoll-paque, se fijaron y permeabilizaron para su tinción con anticuerpos conjugados contra: CDK2, p21, ciclina A y D, y en la población primitiva se detectaron las proteínas CDK2 y p21, además se tiñeron con anticuerpo contra Ki67 y 7AAD, con el fin de detectar los niveles de los distintos reguladores en cada fase del ciclo celular. Los resultados se expresan como intensidad media de fluorescencia de cada una de las proteínas detectadas, en cada estado del ciclo, con el fin de facilitar el análisis de significancia, los valores de IMF se ponderaron considerando al valor observado en el estadio G<sub>0</sub> del grupo control como 1.

Nuestros resultados indican que tras el tratamiento con DMAPT, células sobrevivientes de K562 muestran una disminución en p21, ciclina A y D. En los tres casos, la disminución se observó en los distintos estadios del ciclo. En el caso del tratamiento con PTL, la disminución de estos reguladores se replicó en el caso de Ciclina D (Figura 24 A).

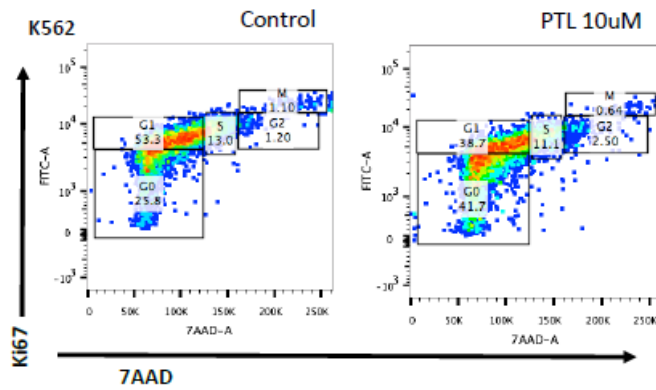
Las células primitivas de LMC mostraron un comportamiento distinto, en el caso de p21 y CDK2, las cuales mostraron bajo nivel de expresión basal en el grupo control, mostraron una alta inducción en su expresión, mientras que ambos reguladores mostraron tendencia a disminuir su expresión en células de la línea celular K562, sugiriendo un comportamiento propio de la población primitiva (Figura 24 B).



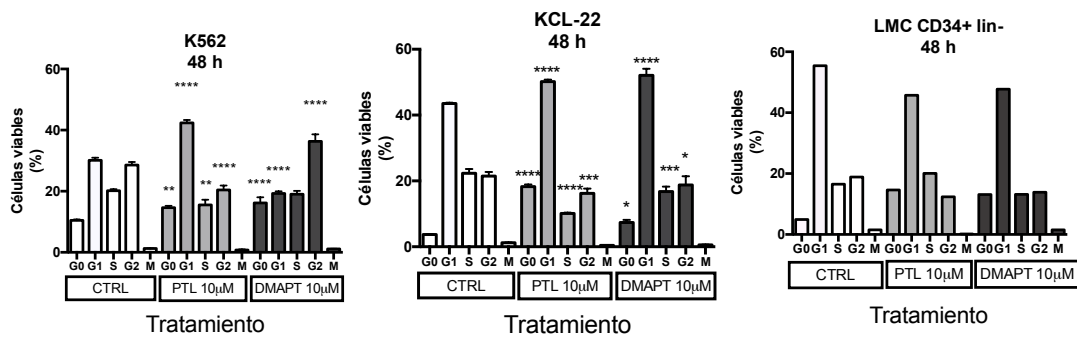
**Figura 18. El tratamiento con PTL y DMAPT retrasa la proliferación celular.**

Líneas celulares de LMC fueron cultivadas en la presencia o ausencia de PTL y DMAPT (7.5 and 10µM) por 48 h, células sobrevivientes del tratamiento fueron obtenidas por gradiente ficoll-paque y las células viables fueron seleccionadas por citometría de flujo por tinción con 7AAD, la proliferación se evaluó por tinción con éster de succinimidil-carboxifluoresceína (CFSE). **A** Se muestran histogramas representativos de niveles de fluorescencia de CFSE en células sobrevivientes al tratamiento con PTL o DMAPT por 48 h, como referencia de fluorescencia a tiempo cero (T0) se utilizaron células teñidas el mismo día del análisis. **B** Se graficaron los niveles de Intensidad Media de Fluorescencia, relativos a células sin tratamiento de tres experimentos independientes. La significancia entre células tratadas y grupos control se calculó utilizando una T de Student pareada. \*p<0.05 \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001.

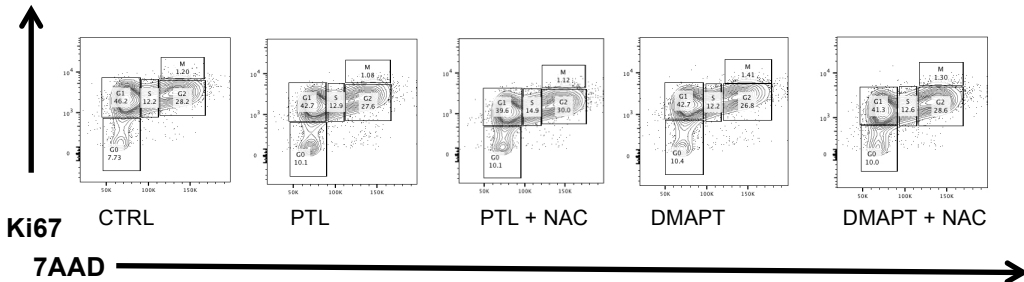
**A**



**B**

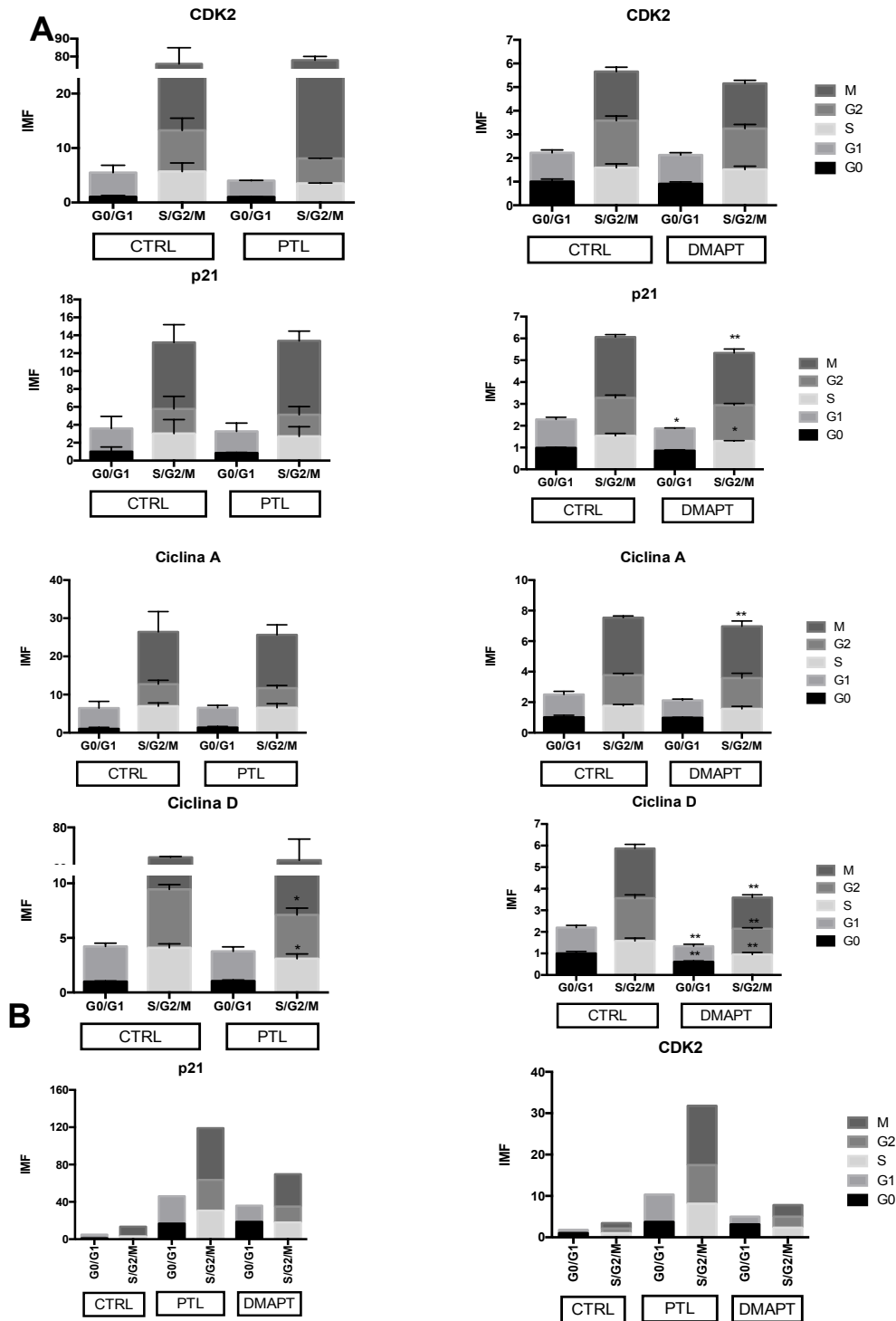


**C**



**Figura 19. El tratamiento con PTL y DMAPT arresta el ciclo celular en fase G0, en un mecanismo independiente de la inducción de ROS.**

Líneas celulares de LMC y células primitivas (CD34+lin-) de LMC fueron cultivadas en la presencia o ausencia de PTL y DMAPT (10 $\mu$ M) por 48 horas con o sin pretratamiento con el precursor de glutatión N-Acetil Cisteína (NAC), células sobrevivientes al tratamiento fueron obtenidas por gradiente ficoll-paque y fijadas con etanol. El estado en ciclo celular se evaluó por tinción con anticuerpo contra Ki67 y 7AAD. **A.** Se muestran diagramas de puntos representativos del efecto de PTL sobre el estado del ciclo celular en células K562. **B** Se muestra el porcentaje de células sobrevivientes al tratamiento en células expuestas a PTL o DMAPT por 48 horas **C** Células de la línea celular K562 fueron pretratadas con o sin NAC por 1 hora y posteriormente cultivadas con PTL o DMAPT por 48 horas. Se calculó la significancia entre tratamientos y células no tratadas se determinó realizando un análisis multicomparativo de Tukey. \*p<0.05 \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001.



**Figura 20. Efecto de PTL y DMAPT en los niveles de reguladores del ciclo celular.** Células de LMC fueron expuestas por 48 horas a PTL o DMAPT a 10  $\mu$ M al término del tratamiento fue fijada y teñida con anticuerpos conjugados para la detección de reguladores del ciclo celular (CDK2, p21, y Ciclina A y D) por citometría de flujo. Los resultados son expresados como Intensidad Media de Fluorescencia (IMF), las barras de error representan el promedio de triplicados. Los valores de IMF se ponderaron a los niveles observados en el grupo Control en G0 (considerado como 1). **A.** Se muestran los efectos de PTL y DMAPT en los reguladores de ciclo de la línea celular K562. **B.** Se muestran los efectos de PTL y DMAPT en células primitivas de LMC (CD34+ lin-). La significancia entre el grupo control y los tratamientos se determinó utilizando una prueba de T de Student pareada. \* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$ .



## IX. DISCUSION

### 1. PÉRDIDA DE VIABILIDAD EN CÉLULAS EXPUESTAS A PTL Y DMAPT

Con el fin de observar la actividad *in-vitro* de partenolida y su análogo DMAPT en la inducción de pérdida de viabilidad de células de Leucemia Mieloide Crónica, nuestro primer acercamiento fue a través de líneas celulares de LMC (Meg-01, K562 y Kcl22) además de una línea celular de Leucemia Mieloide Aguda (HL60). Las líneas celulares de LMC corresponden a pacientes en Crisis Blástica, donde la patología pierde paulatinamente la jerarquía hematopoyética, arrestándose la diferenciación del linaje mieloide a nivel de blastos, asemejándose a una Leucemia Mieloide Aguda. A su vez, con el fin de comparar el efecto de estas moléculas en la viabilidad de la contraparte normal hematopoyética, se utilizaron en células mononucleares provenientes de donadores hematológicamente sanos, estas obtenidas a partir de pacientes sometidos a cirugía de prótesis de cadera los cuales son capaces de donar médula ósea de las crestas iliacas, dichos donadores con una edad promedio de 50 años, similar a los pacientes con LMC de donde se obtuvieron las muestras primarias.

Las células provenientes de líneas celulares mostraron una sensibilidad a PTL y DMAPT alrededor de 7.5  $\mu\text{M}$  para inducir el 50% de pérdida en viabilidad a las 24 h, mientras que, a las 48 h de exposición, la concentración necesaria para llevar al 50% de pérdida de viabilidad se encontró alrededor de 5  $\mu\text{M}$ , la menor concentración necesaria para la inducción de un efecto similar a las 48 h es congruente con una citotoxicidad concentración dependiente.

Mientras que las líneas celulares mostraron una pérdida de viabilidad similar a las líneas celulares alrededor de 7.5  $\mu\text{M}$ , de manera paralela se cultivaron células mononucleares de Médula Ósea Normal (MON). Las células sanas se cultivaron en las mismas condiciones a las muestras primarias leucémicas, mostraron un efecto en la disminución de viabilidad arriba de 10  $\mu\text{M}$ , mientras que a concentraciones menores, se observó un aumento en el número total de células viables, comparadas con el grupo control, sugiriendo un aumento en proliferación o una pérdida en la muerte basal, dichos cambios por la naturaleza misma del ensayo con tinción azul tripano, se reflejaron en un aumento aparente en los niveles de viabilidad, el efecto no esperado en las células MON pudiese estar relacionado a efectos moleculares que ejercen

ambas moléculas, como a la activación del factor de transcripción FoxO, que se ve inducido con un aumento en especies reactivas de oxígeno, y se ha visto que es capaz de inducir proliferación en células del linaje mieloide (Tothova et al 2007). Sin embargo, al exponer células MNC de MON teñidas con CFSE a bajas concentraciones de PTL o DMAPT, no se observó un aumento en los niveles de proliferación (Figura 18), efecto que hubiese sido posible observar por la pérdida en IMF de CFSE.

Otra posible explicación al efecto observado en MNC de MON sería una inhibición de la muerte celular basal, que causaría un aumento en el número total de células viables, tras un tiempo determinado de exposición. Recientemente Li-Weber y colaboradores (2005) reportaron, que pese a la capacidad de PTL de inducir muerte celular a altas concentraciones, la molécula es capaz de proteger de la apoptosis a bajas concentraciones en linfocitos T, por medio de la inhibición del receptor Fas (CD95). De manera interesante, los autores reportan que dicho efecto está a su vez relacionado a la inhibición del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. Ya que la activación de dicho factor es necesaria para la expresión de CD95.

Por otro lado, células mononucleares de pacientes con LMC en fase crónica fueron expuestas a 5 y 10  $\mu$ M para a su vez observar el efecto en los niveles de viabilidad en células representantes de la fase crónica, a su vez, se cultivaron de manera paralela células mononucleares de muestras de MON, con el fin de comparar el efecto de ambas moléculas en la estirpe leucémica en medio adicionado con las citosinas mencionadas en la metodología. Dicha combinación de citocinas ha demostrado en trabajos anteriores la capacidad de mantener en cultivo a la población troncal tanto leucémica como normal (Bhatia et al., 1997), por lo que presenta las condiciones ideales para estudiar la biología de estas poblaciones en condiciones *in-vitro*.

Con el fin de investigar el efecto en la capacidad funcional de células progenitores en células tratadas con PTL o DMAPT, se realizaron ensayos de formación de colonias en muestras primarias enriquecidas en fenotipo progenitor troncal (CD34+ lin-). A los 14 días de cultivo se observó el número total de colonias en el medio, encontrándose menor número de colonias en progenitores provenientes de pacientes con LMC, cuando estas células eran previamente tratadas con PTL o DMAPT, comparadas con el control (Figura 7-8). Cabe destacar que al sembrar el mismo número de células viables se realizó una selección de las células sobrevivientes al tratamiento, con PTL y

DMAPT, el hecho de encontrar una disminución significativa en las unidades formadoras de colonias indica la especificidad ambas moléculas hacia la población primitiva leucémica, indicaría que las células eliminadas durante las primeras 24 h son preferencialmente células progenitoras funcionales, ya que las células restantes presentan una menor capacidad para formar colonias con respecto a las células no expuestas a PTL o DMAPT.

## 2. PTL Y DMAPT INDUCEN MUERTE CELULAR EN LMC

Una vez observado el efecto detrimental sobre la viabilidad celular en poblaciones leucémicas, tanto progenitoras como blastos, se buscó investigar si el efecto era debido a la inducción a muerte celular programada.

Los resultados encontrados en las líneas celulares expuestas (K562, Meg-01, Kcl22 y HL60), indican una mayor sensibilidad a ambos compuestos en las células de HL60, esta línea celular de LMA mostró de manera consistente una mayor vulnerabilidad a ambos compuestos, siendo la que presentó menor sensibilidad, Meg-01, estas diferencias entre las líneas celulares pueden asociarse a que cada línea celular fue aislada de un paciente distinto, cada uno con un arresto en la diferenciación particular, las diferencias en la citotoxicidad observada refleja las distintas particularidades moleculares de cada estirpe. Una particularidad de la línea HL60 fue la baja fosforilación basal observada en el factor de transcripción NF- $\kappa$ B, comparada con las líneas celulares de LMC (Figura 17), por lo que una menor concentración de PTL o DMAPT sería capaz de inhibir la activación de este factor que en células con un mayor nivel de activación basal. Cabe resaltar la alta activación de Caspasa-3 observada en HL60 comparada con K562 y Meg-01 (Figura 11), tras la exposición de ambos compuestos, alrededor de 6 veces más intensa que lo observado en las otras células leucémicas.

Las muestras primarias expuestas (Figura 10) mostraron una inducción a muerte marcada en las células leucémicas siendo las diferencias en la respuesta a muerte entre las células leucémicas y su contraparte normal observables a partir de 7.5  $\mu$ M. Por otra parte, cabe destacar que tanto las células de fase crónica como las obtenidas de muestras de crisis blástica mostraron una marcada inducción a muerte celular,

este efecto se observó pese a que las células en crisis blástica tienden a presentar resistencia o una menor sensibilidad a los tratamientos antineoplásicos, de manera interesante, las células de crisis blástica mostraron una sensibilidad similar a la observada en las células de fase crónica, siendo la concentración a la que se observó mayor diferencia entre muerte inducida en células leucémicas comparadas con su contraparte normal la de 10 y 20  $\mu\text{M}$ , sugiriendo que existe una ventana de tratamiento a estas concentraciones.

### 3. PTL Y DMAPT INDUCEN MUERTE CELULAR INDEPENDIENTE DE CASPASAS

Aunque la pérdida de la integridad membranal es una característica clave de la apoptosis, este tipo de muerte celular programada no puede ser confirmada únicamente con este tipo de tinciones nucleares, sino que resulta necesario verificar la apoptosis a través de la activación y participación de las cistein-proteasas, mejor conocidas como caspasas. Dichas enzimas involucradas en la actividad proteolítica que involucra la muerte celular ejercen su papel una vez activadas por incisión y dimerización. Las caspasas son sintetizadas originalmente como zimógenos inactivos, es decir que en un principio no presentan actividad catalítica debido a su conformación inactiva y en este estado son denominadas procaspasas. Dichas proteasas son clasificadas de acuerdo con el estadio en el proceso de muerte donde actúan. Siendo las iniciadoras, las caspasas involucrados en la respuesta temprana a un estímulo apoptótico, ya sea intrínseco o extrínseco (Caspasas 2, 8, 9 y 10), y las ejecutoras activadas durante la apoptosis tardía, (Caspasas 3, 6 y 7), donde el proceso de muerte celular es irreversible.

Con el fin de confirmar si la muerte celular observada en células de LMC expuestas a ambos compuestos, se eligió verificar la actividad de Caspasa -3, proteasa involucrada tanto en los procesos de apoptosis extrínseca como intrínseca. Aunque el pretratamiento con Z-VAD fue capaz de disminuir la activación de Caspasa 3 en células tratadas con PTL o DMAPT, la muerte celular no se vio disminuida en las células pretratadas con el inhibidor. Esto pareciera indicar que un proceso apoptótico no estaría involucrado en la inducción a muerte celular por PTL o DMAPT. Por otro lado, ya que el tratamiento con PTL y DMAPT si se ve acompañado por una activación

de caspasa 3 (Figura 11), se podría inferir que las células si se ven involucradas en un proceso apoptótico, que, al inhibirse la célula se encuentra en un estado demasiado dañado para permanecer viable. Las células dañadas por el incremento en ROS podrían estar optando por una muerte celular independiente de caspasas, entre las descritas en la literatura se encuentra la necroptosis, ferroptosis y muerte inducida por autofagia.

De especial interés para nosotros es un trabajo por Holze y colaboradores (2018) donde han descrito una nueva forma de muerte celular programada independiente de caspasas e inducida por especies reactivas de oxígeno, denominada Oxceptosis. En su trabajo Holze y colaboradores describen a la Oxceptosis como una muerte celular similar a la apoptosis, en el sentido de que se trata de un proceso no inflamatorio, desencadenado por un aumento en los niveles de especies reactivas de oxígeno, activando a la proteína Keap1, y desencadenando una serie de reacciones que involucran a la fosfatasa mitocondrial PGAM5 y al factor mitocondrial inductor de la apoptosis AIFM1 (Holze et al., 2018). Sin embargo nuestros resultados no son suficientes para inferir que el mecanismo descrito por Holze y colaboradores se está llevando a cabo en las células expuestas a PTL o DMAPT.

#### 4. PTL Y DMAPT INDUCEN NIVELES DE ROS EN CÉLULAS DE LMC

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son componentes ubicuos con importantes papeles en vías de señalización. Sin embargo, su desregulación puede causar estrés oxidativo con impacto en el funcionamiento celular (Antoszewska-Smith, 2017). De manera consistente, se ha encontrado un incremento en los niveles de estrés oxidativo en las células de los distintos padecimientos malignos, sin una relación clara entre si el incremento basal de ROS como parte del motivo del origen del padecimiento, o producto del ambiente oncogénico (Kumari et al 2018). Sin embargo, el consenso a lo largo de los años ha sido que los elevados niveles de ROS en las poblaciones malignas son producto de su acelerado metabolismo y proliferación.

Sin embargo, esta idea ha sido desafiada en los últimos años, donde algunos trabajos han encontrado estos altos niveles de ROS en poblaciones malignas en estado

quiescente. De especial interés para el estudio ha sido el reporte por Nieborowska y colaboradores (2012), donde han encontrado este incremento en los niveles de ROS, al comparar poblaciones primitivas de hematopoyéticas en pacientes con LMC en fase crónica, comparadas con su contraparte normal. Esto incluso en las poblaciones quiescentes, donde anteriormente se había supuesto un bajo nivel de ROS, los altos niveles de estrés oxidativo en estas poblaciones quiescentes se vieron acompañados de mayor inestabilidad genética. En el mismo trabajo Nieborowska y colaboradores encontraron que la causal del incremento en ROS en estas células eran defectos mitocondriales, que causaban una despolarización de membrana en estos organelos. Por otro lado, se ha descrito en el modelo de Leucemia Mieloide Aguda, que la población primitiva (CD34+) presenta una mayor expresión de proteínas regulatorias de la síntesis del glutatión, como un mecanismo compensatorio para el incremento en estrés oxidativo, de manera consistente, se ha demostrado que las poblaciones primitivas leucémicas presentan una mayor tasa de glutatión oxidado que su contraparte normal. Esto vuelve a estas poblaciones susceptibles a compuestos que comprometan el metabolismo de glutatión (Pei et al., 2013). Uno de los mecanismos que se han atribuido a la citotoxicidad de PTL y DMAPT es la capacidad de abrogar el abastecimiento de glutatión en células de LMA. Así mismo Pei y colaboradores (2013) reportaron que las poblaciones primitivas de LMA son especialmente susceptibles a los efectos de PTL, comparadas con su contraparte normal, incluso cuando las poblaciones malignas presentan sobre activación de la síntesis de glutatión como estrategia de compensación.

Nosotros observamos una tendencia en la población primitiva de MON a presentar una menor IMF de DCFDA a la observada en la población primitiva leucémica, dicha diferencia reflejaría menores niveles de ROS basales en la contraparte normal a la leucémica que podrían estar relacionados a una mayor tasa de glutatión reducido que la población primitiva maligna como lo reportó Pei y colaboradores (2013) y Nieborowska y colaboradores (2012). Este comportamiento haría a las poblaciones normales más resilientes a ambos compuestos, como lo han reportado Guzmán y colaboradores en el modelo de LMA.

Los niveles intracelulares de ROS son altamente regulados por una serie de sistemas de señalización que, gracias a residuos susceptibles a oxidación, son capaces de

detectar cambios en los niveles de las especies reactivas de oxígeno (Scaturro y Pichlmair, 2019). El sistema Keap1 es uno de los sistemas de resiliencia a ROS más estudiados, en niveles normales de ROS y la actividad de Keap1 consiste en degradar al factor de transcripción NRF2. La proteína Keap1, cuenta con una serie de residuos de Cisteína en su terminal C, que al oxidarse causa un cambio conformacional y evitan su interacción con NRF2, causando la acumulación del factor, su traslocación a núcleo y la posterior expresión de genes antioxidantes y citoprotectores, como Hmox-1. Cabe mencionar que se ha reportado una sobreexpresión del factor Nrf2 en líneas celulares de LMC resistentes a IMT (Gemani et al., 2010), además de los reportes por Pei y colaboradores (2013) que encontraron una mayor expresión de Nrf2 en células primitivas de CD34+ que su contraparte normal, que podría ser responsable de la alta expresión de componentes del metabolismo de glutatión en la estirpe leucémica, sobre todo en poblaciones responsables de su mantenimiento y resistencia a tratamientos.

Tras observar el comportamiento cinético en los niveles de ROS tras el tratamiento con PTL o DMAPT, donde el pico alcanzado en un corto tiempo (1h) disminuye con el tiempo, antes de inducir muerte celular en las células expuestas (24 h), supusimos la participación de respuestas citoprotectivas. Tomando esto en cuenta y las observaciones realizadas por Pei et al en el modelo de LMA, optamos por verificar la activación del sistema Nrf2, por PCR en tiempo real e inmunofluorescencia. Nuestros resultados indican una activación de la expresión de HMOX-1, gen blanco del factor Nrf2 activado por Keap1, en células expuestas a PTL y DMAPT. Dicho aumento se vio consistentemente más alto en células expuestas a PTL que a DMAPT, esta diferencia concuerda con diferencias en la cinética observada entre PTL y DMAPT, donde PTL alcanza un pico en el aumento en los niveles de ROS en un menor tiempo que DMAPT, lo cual podría resultar en menores niveles de activación de HMOX-1 a las 6 h. De particular importancia es la falta de activación de expresión de HMOX-1 en la población primitiva CD34+lin- de MON, comparada con la población primitiva proveniente de pacientes con LMC en fase crónica, este resultado concuerda con la ausencia de cambios en IMF de DCFDA en la población normal, al ser expuesta a PTL y DMAPT (Figura 12). Además, respecto a la respuesta en HMOX en muestras primitivas de LMC, cabe mencionar que los niveles de activación observados en las

muestras primarias de LMC fueron mucho mayores a los cambios observados en las líneas celulares de LMC (K562, Meg-01 y Kcl22).

Aunque el sistema Keap1 ha sido anteriormente descrito como el sistema citoprotector a ROS por excelencia, Holze y colaboradores reportaron en 2018 un papel dual en su activación. Al observar en células depletadas de Keap1, que muestran mayor resiliencia a altos niveles de ROS que células con Keap1 positivas. Por otro lado, encontraron que una sobreactivación del sistema Keap1 llevaba a una muerte celular independiente de caspasas que llamaron Oxeyptosis, ya que el sistema de Keap1 se basa en la modificación de 27 residuos de cisteína, para sensar la presencia o ausencia de ROS, este sistema podría permitirle a la proteína integrar información cuantitativa que le permita diferenciar entre niveles fisiológicos y niveles catastróficos de ROS y responder de una manera apropiada (Holze et al., 2018). El sistema Keap1 tendría una dualidad en la función del sistema protector, la primera sería la más conocida como regulador de la expresión de genes citoprotectores a niveles moderados, mientras que estaría disparando un programa de muerte celular a mayor activación.

Es de importancia comentar que los ensayos realizados durante este estudio se llevaron a cabo en una incubadora adaptada para cultivos celulares mamíferos, las condiciones que mantienen estos equipos simulan los niveles de oxígeno observados en un ambiente arterial, conocido como normoxia y reflejan las condiciones de una célula en circulación y no los de una población primitiva en el microambiente medular, en lo que concierne niveles de oxígeno. La residencia natural tanto de las poblaciones primitivas normales como las leucémicas se encuentran en la médula ósea, un ambiente que se considera hasta ahora un ambiente hipóxico. Los estudios realizados por Nieborowska y colaboradores indagaron sobre como las diferentes tensiones de O<sub>2</sub> podrían afectar a la producción de ROS en las poblaciones leucémicas, lo que ellos reportaron fue que estas poblaciones mantienen mayores niveles de ROS comparado con la contraparte normal, tanto en normoxia (17% O<sub>2</sub>) como en hipoxia (1% O<sub>2</sub>), (niveles de oxígeno que simularían el ambiente arterial y la médula ósea respectivamente), siendo los niveles de ROS poco alterados por la presencia o ausencia de oxígeno. Al mantener esta tendencia de un alto estrés oxidativo y genotóxico incluso en un ambiente hipóxico, sugiere que estas



poblaciones en la médula ósea serían capaces de mantener una inestabilidad genética que daría lugar a clonas resistentes.

Los aumentos en los niveles de ROS y la activación de mecanismos citoprotectores observados en células expuestas a PTL o DMAPT nos llevó a investigar el papel del estrés oxidativo en la inducción a muerte que ejercen ambas moléculas. Con este fin, se trabajó con el precursor de glutatión NAC, capaz de inhibir el efecto de PTL o DMAPT en los niveles de ROS. Los resultados indican de manera tajante que la ausencia de aumento en ROS es crucial en la capacidad de ambas moléculas para inducir muerte celular, ya que, en células pretratadas con NAC, la muerte inducida por PTL y DMAPT se vió revertida significativamente, efecto que correlaciona con una disminución en los niveles de ROS inducidos por ambos compuestos. De manera interesante, el reciente reporte de Holze y colaboradores (2018) describe a la oxeiptosis como un tipo de muerte celular programada independiente de caspasas y disparada por un aumento en los niveles de ROS, donde la activación de Keap1 es clave para el desencadenamiento de los pasos que llevan a la muerte celular. Aunque la Oxeiptosis se ha atribuido principalmente a muertes por infección viral, fue demostrada por primera vez en células expuestas a peróxido de hidrógeno. En este sentido, se requeriría indagar en este proceso e investigar su implicación en la muerte inducida por PTL y DMAPT.

## 5. PTL Y DMAPT INHIBEN LA ACTIVACION DE NF- $\kappa$ B

Como ha sido reportado anteriormente, otra vía importante necesaria para la citotoxicidad de PTL y DMAPT es la capacidad de inhibir al factor de transcripción de NF- $\kappa$ B. El mecanismo por el cual actúan las lactonas sesquiterpénicas ha sido reportado por distintos autores, y no se ha elucidado por completo. De acuerdo con García Piñeres y colaboradores (2004), PTL bloquea la señalización de NF- $\kappa$ B a través de la alquilación de residuos de cisteína en p65, por otro lado otros autores han señalado que el mecanismo ocurre río arriba, uniéndose directamente al complejo IKK e inhibiendo su actividad (Minhajuddin et al., 2011), por lo que no se ha llegado a un consenso general del mecanismo necesario, sin embargo, la capacidad inhibitoria de ambas moléculas se ha descrito en numerosos modelos malignos (Kawasaki et al.,

2009; Kwok et al., 2001) y que ha despertado interés en la capacidad terapéutica de PTL y DMAPT.

Con el fin de indagar los efectos de ambas moléculas sobre la activación de NF- $\kappa$ B, se realizaron una serie de ensayos que permitieron verificar el estado del factor de tres maneras: la localización de la subunidad p65 dentro de la célula por inmunofluorescencia, el nivel de fosforilación de p65 respecto a los niveles de p65 total por inmunoblot y la actividad transcripcional del factor por la expresión a nivel de RNA mensajero de dos genes blanco (PLAU y NF $\kappa$ B1). Nuestros resultados mostraron de manera general una inhibición de la actividad, fosforilación y localización en núcleo de NF- $\kappa$ B, de especial interés para nosotros fue la aparente activación basal en la población primitiva leucémica (CD34+ lin-) de p65 (Figura 17), ya que las células del grupo control mostraron la fosforilación de una fracción considerable de p65, similar a lo observado en las líneas celulares. Esta característica las volvería vulnerables al tratamiento con PTL o DMAPT, como fue observado en los distintos ensayos de viabilidad y muerte en este tipo de población leucémica.

Cabe destacar la poca fosforilación basal de NF- $\kappa$ B que se encontró en la línea celular HL60 (Figura 17), al compararlo con las líneas celulares K562, Kcl22, y la muestra de población primitiva CD34+ de LMC. Este bajo nivel de fosforilación se observó incluso cuando la expresión de p65 total presento niveles altos, el tratamiento con PTL en esta línea celular resultó en una disminución prácticamente total de la señal de la proteína fosforilada, efecto que pudiese estar relacionado a la mayor sensibilidad a ambos compuestos en esta línea celular.

Los ensayos realizados con pretratamiento de NAC, sugieren que la sola inhibición de NF- $\kappa$ B no es suficiente para inducir muerte celular en las poblaciones leucémicas (Figura 12 y 15). Sin embargo, no descarta un efecto sinérgico que pudiera aportar esta inhibición a la inducción de ROS.

Por otro lado, reportes anteriores han encontrado que la citotoxicidad de PTL en células malignas no se basa solamente en la inhibición de NF- $\kappa$ B, sino a una serie de efectos sobre distintos componentes moleculares, como la activación de p53, la ubiquitinización de MDM2, la inhibición de DNMT1 y HDAC1, (Guzman et al., 2005) y de gran interés para nosotros, la inducción de ROS a través de la depleción de glutatión.

## 6. PTL Y DMAPT INHIBEN LA PROLIFERACION EN CELULAS DE LMC

Una de las características biológicas de la LMC es el aumento en la proliferación celular debido a la actividad de Bcr-Abl. Los ITC presentan la capacidad de inducir apoptosis en blastos de LMC, ya que se ha demostrado que el grueso de la población leucémica se encuentra adicta a la activación constitutiva de Bcr-Abl (Hamilton et al., 2012), mientras que la población primitiva no es dependiente de esta actividad y es capaz de sobrevivir la inactividad de Bcr-Abl, a través de una inducción a quiescencia. Trabajos anteriores realizados por nuestro grupo de investigación han reportado que la fracción celular en estado G0/G1 incrementa en células de LMC tras ser tratadas con ITCs (Moreno-Lorenzana et al., 2016), y que este efecto es dependiente de la localización nuclear de los inhibidores de CDK, p21 y p18.

Los objetivos vigentes en el desarrollo de terapias para leucemias incluyen la erradicación de las poblaciones resistentes a los tratamientos actuales y causantes de recaídas en pacientes, esto debido a que las quimioterapias clásicas de manera histórica se han dirigido a las poblaciones proliferantes y son inefectivas en poblaciones quiescentes, como lo son las células troncales leucémicas. De ahí el interés en conocer el efecto sobre la proliferación en las células sobrevivientes al tratamiento con PTL y DMAPT.

Con este fin, se investigó por medio de pre-tinción con carboxifluoresceína y tinción con Ioduro de Propidio tras un tratamiento de 48 h en líneas celulares y muestras primarias de LMC y MON. Nuestros resultados muestran que una fracción de la población leucémica es capaz de sobrevivir el tratamiento por PTL y DMAPT, tras las 48 h de tratamiendo, siendo el grado de retraso en la proliferación distinto entre las líneas celulares. La línea K562 presentó el mayor nivel de retraso y Kcl22, la de menor retraso. Cabe destacar que Kcl22 presentó mayor inducción de ROS durante las exposiciones a ambos compuestos y la mayor activación de Nrf2 de las tres líneas celulares de LMC (Figura 13).

En general se observó un retraso en la proliferación celular, tanto en líneas celulares como en muestras primarias leucémicas, no fue sorpresa para nosotros que el efecto se replicase en la fracción primitiva proveniente de sujetos con LMC(CD34+lin-) (Figura 18).

## 7. LA INHIBICION DE LA PROLIFERACION VIENE ACOMPAÑADA DE UN ARRESTO EN EL CICLO CELULAR

Los cambios en las tasas de proliferación celular nos llevaron a indagar sobre el estado en el ciclo celular de las células sobrevivientes al tratamiento, con esto en mente se analizó el estado en el ciclo celular de dicha fracción sobreviviente por medio de fijación y tinción con anticuerpo contra Ki67 y 7AAD, encontramos que las células viables se encuentran enriquecidas en estadio G0/G1.

En estudios anteriores se ha encontrado que los niveles de ROS tienen un papel en la proliferación celular. Se ha reportado que los factores de transcripción FoxO (Tothova et al., 2007) son un factor importante en la diferenciación mieloide y al deletarse dichos factores en una población troncal hematopoyética, se observa un incremento en los niveles de ROS y una diferenciación a linaje mieloide. Con esto en mente, nosotros esperábamos encontrar que estos cambios en el ciclo celular serían revertidos por un pretratamiento con NAC, como sucedió con la muerte celular. Para nuestra sorpresa, se encontró que mientras estas células fueron consistentemente rescatadas de muerte por el pretratamiento con NAC, estas aun así sufren el cambio en el ciclo celular, sin mostrar una relación con la inducción de ROS (Figura 19). Este efecto nos ha llevado a pensar en NF- $\kappa$ B como el responsable de la inhibición del ciclo celular.

Con el fin de indagar el mecanismo detrás de los cambios en el ciclo celular, se cultivaron células de la línea K562, la cual mostró mayor retraso en la proliferación celular, y células de LMC enriquecidas en CD34+lin-. Las células fueron cultivadas a con o sin PTL o DMAPT a 10  $\mu$ M por 48 h, y las sobrevivientes al tratamiento fueron analizadas para verificar el nivel de expresión de p21, ciclina D y A. Para nuestra sorpresa, las células primitivas y la línea K562 mostraron cambios prácticamente inversos en los niveles de los reguladores de ciclo, mientras que la línea K562 tendió a mostrar inhibición en la expresión de p21, CDK2, Ciclina A y D, las células primitivas de LMC mostraron una tendencia a incrementar ante PTL y DMAPT los niveles de p21 y CDK2 (Figura 20), sugiriendo que p21 en especial, juega un rol importante en la sobrevivencia de las poblaciones primitivas de LMC. Anteriormente, Cheng y colaboradores (2000) han reportado que el regulador de ciclo p21 juega un papel clave en el mantenimiento de la quiescencia en células troncales hematopoyéticas.

## X. CONCLUSIONES

Durante la realización de este trabajo se determinó el efecto de partenolida y DMAPT sobre células del compartimento primitivo (CD34+ lin-) de LMC, así como en blastos de este tipo de leucemia. Las poblaciones celulares primitivas obtenidas de pacientes con LMC en fase crónica de recién diagnóstico, mostraron una disminución en viabilidad y capacidad formadora de colonias (autorenovación), dicho efecto se observó de manera específica en esta población maligna, al compararlo con su contraparte normal en poblaciones primitivas (CD34+ lin-) provenientes de médula ósea de donadores hematológicamente sanos. Por otro lado, células mononucleares de LMC mostraron a su vez una disminución en viabilidad acompañada con un aumento de muerte celular programada comparado con su contraparte normal.

Al indagar el efecto sobre el mecanismo molecular de ambas moléculas en células de LMC, se encontró que tanto partenolida como DMAPT inducen un aumento en los niveles de estrés oxidativo (ROS) el cual se asocia con la inducción de muerte celular a través de este aumento. Dicho efecto fue observado en las poblaciones primitivas (CD34+ lin-), como en blastos de LMC (K562, Meg-01, Kcl22), mientras que la contraparte normal de la población primitiva no mostró un aumento en los niveles de ROS ni en la activación del sistema Keap1.

El tratamiento con PTL y DMAPT inhibe al factor de transcripción NF- $\kappa$ B, tanto en la fosforilación de la subunidad p65, como en su localización nuclear y su actividad como regulador de la transcripción. Dicho efecto se observó tanto en la población primitiva leucémica (CD34+ lin), como en blastos de LMC tras el tratamiento con PTL o DMAPT.

Tras un tratamiento prolongado (48 h) con PTL o DMAPT, las células de LMC sobrevivientes manifestaron una supresión de su proliferación, efecto que se vio acompañado con un aumento en el porcentaje de células en fase G0, indicando una inducción a quiescencia, misma que parece estar asociada con el CDKI p21.

Los resultados descritos en este trabajo demuestran la capacidad que tienen ambas moléculas en eliminar de manera preferencial el compartimento primitivo de LMC, población causante de las recaídas en pacientes con LMC en tratamiento con ITC,

resaltando la importancia de ambas moléculas como un campo de investigación en el desarrollo de nuevas terapias en este padecimiento.

## XI. PERSPECTIVAS

Una de las preguntas planteadas por el presente trabajo es el papel del factor de transcripción NF- $\kappa$ B sobre la inducción de quiescencia en células expuestas a PTL o DMAPT. Ya que el pretratamiento con NAC en células expuestas a PTL y DMAPT no afecta los cambios observados en el ciclo celular de las células sobrevivientes a los tratamientos, y la exposición PTL y DMAPT se vio acompañada con modulación del inhibidor de ciclo p21, que ha sido reportado anteriormente como proteína clave en la regulación de quiescencia de poblaciones primitivas, se podría suponer que el efecto está ligado directamente a la actividad de NF- $\kappa$ B, sin embargo, dicha relación tendría que ser investigada con mayor profundidad.

Por otro lado, la activación de sistemas de citoprotección despiertan la duda de si su inhibición potenciaría el efecto de PTL y DMAPT, sobretodo en la población primitiva, donde se observó la mayor transcripción de HMOX-1 de todos los tipos celulares. La activación de Keap1 ha sido correlacionado con mal pronóstico en distintas malignidades y recientemente la molécula K-563 ha sido aislada del actinomiceto *Streptomyces* sp. ha mostrado potencial como un antiproliferativo en cáncer de pulmón al inhibir la actividad de Keap1 (Hori et al., 2019), sería de interés investigar si existe un efecto sinérgico entre inhibidores de este tipo y PTL y DMAPT en la citotoxicidad de poblaciones primitivas de LMC.

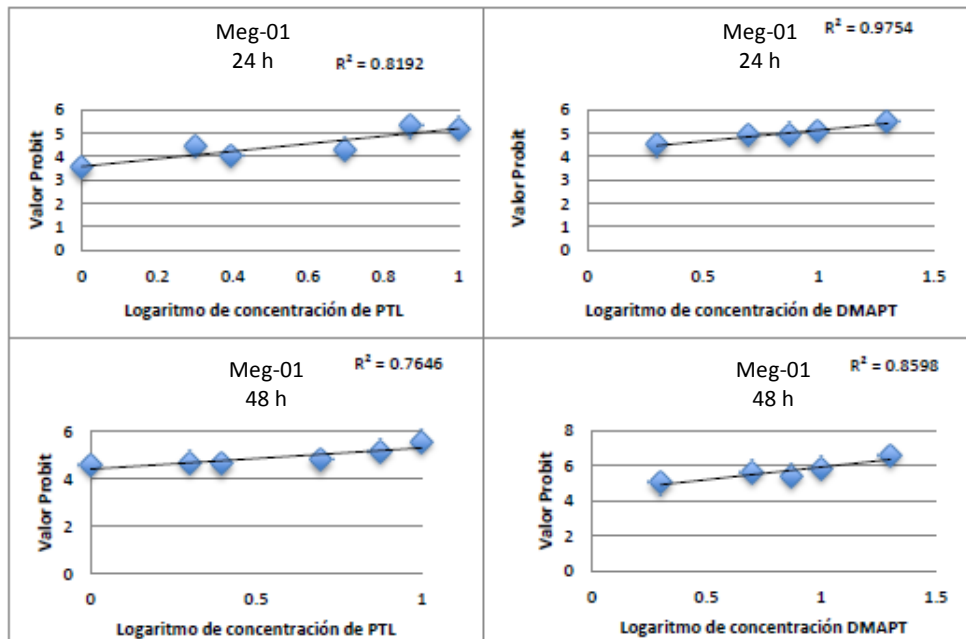
Otra de las preguntas que surgen del trabajo es el mecanismo de muerte celular involucrado en la citotoxicidad tras el tratamiento con PTL o DMAPT, ya que el pretratamiento de las células con el péptido Z-VAD se vio acompañado de una disminución en la activación de caspasa-3, sin embargo, no se vieron afectados los niveles de muerte celular, sería de interés investigar si se está dando lugar un tipo de muerte celular descrita por Holze y colaboradores, (2018) denominada Oxeiptosis, muerte celular desencadenada por altos niveles de ROS y la sobre activación de Keap1.

Finalmente, la actividad de ambas moléculas en modelos *in-vitro* permitió indagar el potencial de ambas moléculas a afectar la permanencia de poblaciones primitivas leucémicas en pacientes, sin embargo el mecanismo molecular descrito en el presente trabajo no fue realizado en un ambiente experimental hipóxico, donde la

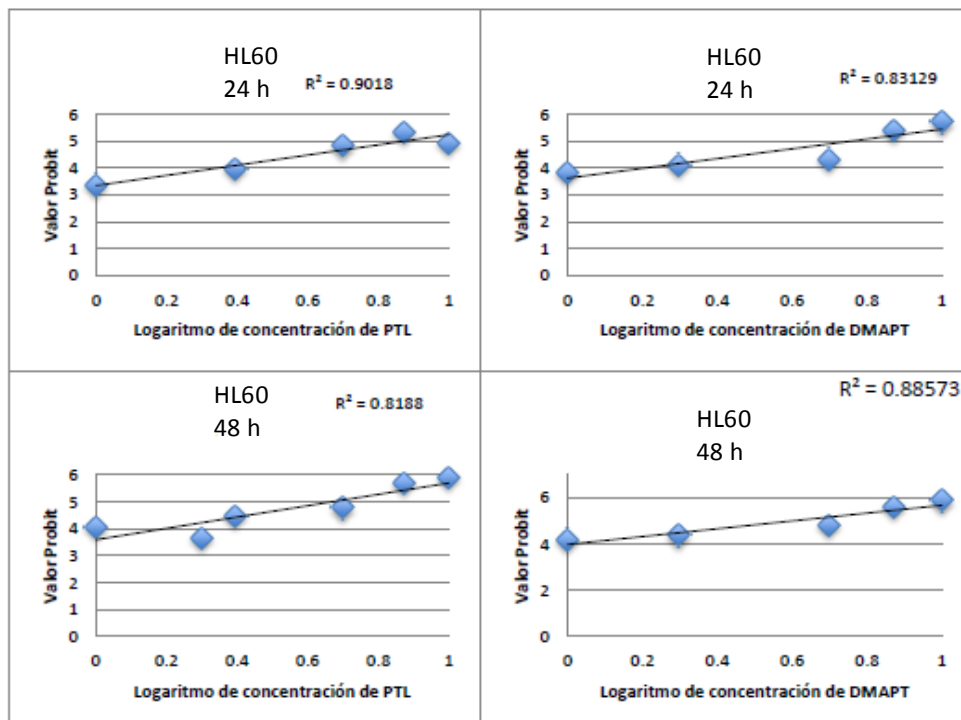
inducción de ROS podría diferir de los resultados realizados en un ambiente normóxico, ya que la médula ósea, espacio residente de las poblaciones troncales leucémicas, se caracteriza por presentar un ambiente hipóxico, resultaría necesario investigar el efecto de ambas moléculas sobre este tipo de ambiente.



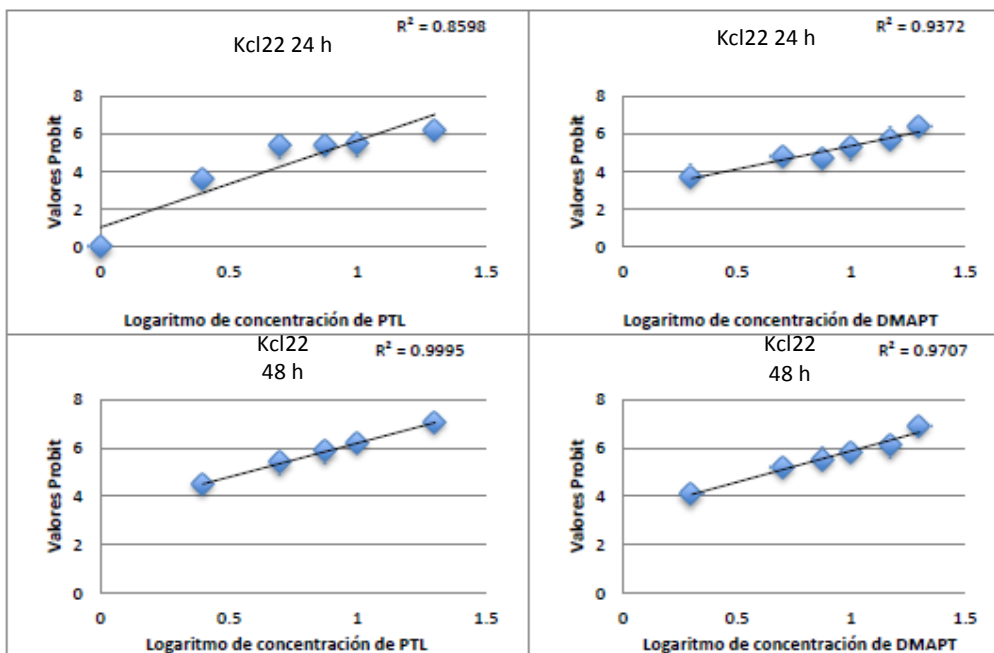
## XII. ANEXO



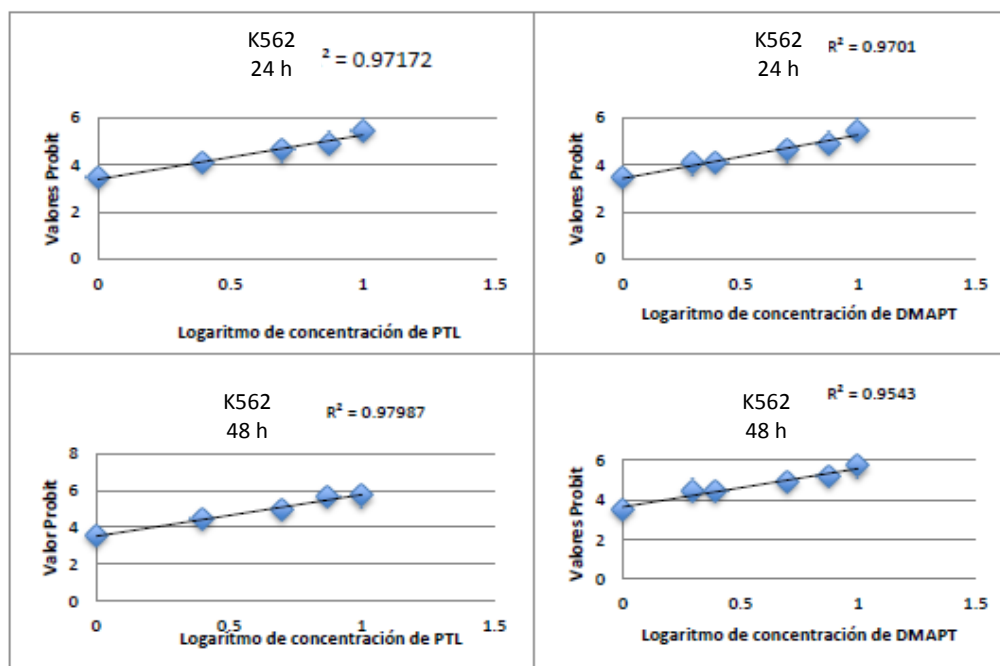
**Figura Anexo 1. Análisis PROBIT en células Meg-01.** Se determinaron los valores PROBIT respect al Logaritmo de concentración de PTL y DMAPT, en células Meg-01 expuestas por 24 y 48 horas.



**Figura Anexo 2. Análisis PROBIT en células HL60.** Se determinaron los valores PROBIT respect al Logaritmo de concentración de PTL y DMAPT, en células HL60 expuestas por 24 y 48 horas.



**Figura Anexo 3. Análisis PROBIT en células Kcl22.** Se determinaron los valores PROBIT respect al Logaritmo de concentración de PTL y DMAPT, en células Kcl22 expuestas por 24 y 48 horas.



**Figura Anexo 4. Análisis PROBIT en células K562.** Se determinaron los valores PROBIT respect al Logaritmo de concentración de PTL y DMAPT, en células K562 expuestas por 24 y 48 horas.

### XIII. LITERATURA CITADA

Advani, A.S.; Pendergast, A.M. (2002). Bcr–Abl variants: biological and clinical aspects. *Leukemia Research* 26, 713–720.

Antoszewska-Smith, J.; Pawlowska, E.; Blasiak, J. (2017). Reactive oxygen species in BCR-ABL1-expressing cells - relevance to chronic myeloid leukemia. *Acta Biochimica Polonica* 64, 1–10.

Arber, D.A.; Orazi, A.; Hasserjian, R.; Thiele, J.; Borowitz, M.J.; Le Beau, M.L.; Bloomfield C.D.; Cazzola M.; Vardiman, J.M. (2016). The 2016 revision to the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 127: 2391-2405.

Avilés-Vázquez, S.; Chávez-González, A.; Mayani, H. (2013). Inhibidores de cinasas de tirosina (ICT): la nueva revolución en el tratamiento de la leucemia mieloide crónica (LMC). *Gaceta Médica de México* 149, 646–654.

Baccarani, M. (2006). Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 108, 1809–1820.

Bayreuther, K. (1960). Chromosomes in Primary Neoplastic Growth. *Nature* 186, 6–9.

Becker, A.J.; McCulloch, E.A.; Till, J.E. (1963). Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* 197, 452–454.

Berenson, R.J. Andrews, R.G.; Bensinger, W.I.; Kalamasz, D.; Knitter, G.; Buckner, C.D.; Bernstein, I.D. (1988). Antigen CD34+ marrow cells engraft lethally irradiated baboons. *Journal of Clinical Investigation* 81, 951–955.

Bhatia, R., McGlave, P.B., Miller, J.S., Wissink, S., Lin, W.N., Verfaillie, C.M. (1997). A clinically suitable ex vivo expansion culture system for LTC-IC and CFC using stroma-conditioned medium. *Experimental hematology*. 25. 980-91.

Bolton-Gillespie, E.; Schemionek, M.; Klein, H.U.; Flis, S.; Hoser, G.; Lange, T.; Nieborowska-Skorska, M.; Maier, J.; Kerstiens, L.; Koptyra, M.; Müller, M.C.; Modi, H.; Stoklosa, T.; Seferynska, I.; Bhatia, R.; Holyoake, T.L.; Koschmieder, S.; Skorski, T. (2012). Genomic instability may originate from imatinib-refractory chronic myeloid leukemia stem cells. *Blood*. 121(29); 4175-83.

Bonnet D.; Dick, J.E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* 3, 730–737.

Bose, S.; Deininger, M.; Gora-Tybor, J.; Goldman, J.M.; Melo, J.V. (1998). The presence of typical and atypical BCR-ABL fusion genes in leukocytes of normal individuals: biologic significance and implications for the assessment of minimal residual disease. *Blood* 92, 3362–3367.

Bosma M.J., Carroll A.M. (1991). The SCID mouse mutant: definition, characterization, and potential uses. *Annu. Rev. Immunol.* 9; 323-50.

Boulais, P.E.; Frenette, P.S. (2015). Making sense of hematopoietic stem cell niches. *Blood* 125, 2621–2629.

Bradford, J.W.; Baldwin, A.S. (2014). IKK/Nuclear Factor-kappaB and Oncogenesis. In *Advances in Cancer Research*, (Elsevier), pp. 125–145.

Brunet de la Grange, P.; Vlaski, M.; Duchez, P.; Chevaleyre, J.; Lapostolle, V.; Boiron, J.M.; Praloran, V.; Ivanovic, Z. (2013). Long-term repopulating hematopoietic stem cells and “side population” in human steady state peripheral blood. *Stem Cell Research* 11, 625–633.

Bryder, D.; Rossi, D.J.; Weissman, I.L. (2006). Hematopoietic Stem Cells. *The American Journal of Pathology* 169, 338–346.

Butcher, E.C. (1991). Leukocyte-endothelial cell recognition: Three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell*. 67(6);1033-1036.

Butler, J.M.; Nolan, D.J.; Vertes, E.L.; Varnum-Finney, B.; Kobayashi, H.; Hooper, A.T.; Seandel, M.; Shido, K.; White, I.A.; Kobayashi, M.; Witte, L.; May, C.; Shawber, C.; Kimura, Y.; Kitajewski, J.; Rosenwaks, Z.; Bernstein, I.D.; Shanin, R. (2010). Endothelial Cells Are Essential for the Self-Renewal and Repopulation of Notch-Dependent Hematopoietic Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 6(3). 251-264.

Carrà, G.; Torti, D.; Crivellaro, S.; Panuzzo, C.; Taulli, R.; Cilloni, D.; Guerrasio, A.; Saglio, G.; Morotti, A. (2016). The BCR-ABL/NF-kBA; B signal transduction network: a long-lasting relationship in Philadelphia positive Leukemias. *Oncotarget* 7.

Chávez-González, M.A.; Centeno, S.; Flores-López, A.G. (2016). Células Troncales en Leucemias Mieloides. Nuevas estrategias de eliminación. In *Células Troncales: Biología y Aplicaciones En Biomedicina*, (México: Grañén-Porrúa), p. 591.

Chávez-Gonzalez, A; Aviles-Vázquez, S.; Moreno Lorenzana, D.; Mayani, H. (2013). Hematopoietic Stem Cells in Chronic Myeloid Leukemia. In *Stem Cell Biology in Normal Life and Diseases*, K. Alimoghaddam, ed. (InTech), p.

Chen, W., Dong, J.; Haiech, J.; Kilhoffer, M.C.; Zeniou, M. (2016). Cancer Stem Cell Quiescence and Plasticity as Major Challenges in Cancer Therapy. *Stem Cells International* 2016, 1–16.

Cheng, T., Rodrigues, N., Shen, H., Yang Y., Dombkowski, D., Sykes, M., Scadden, D.T. (2000). Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1. *Science*. 287:1804-1808.

Coulombel, L.; Kalousek, D.K.; Eaves, C.J.; Gupta, C.M.; Eaves, A.C. (1983). Long-Term Marrow Culture Reveals Chromosomally Normal Hematopoietic Progenitor Cells in Patients with Philadelphia Chromosome-Positive Chronic Myelogenous Leukemia. *New England Journal of Medicine* 308, 1493–1498.

Crane, G.M.; Jeffery, E.; Morrison, S.J. (2017). Adult haematopoietic stem cell niches. *Nature Reviews Immunology* 17, 573–590.

Deininger, M.W.; Goldman, J.M.; Melo, J.V. (2000). The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 96, 3343–3356.

Dexter, T.M.; Allen, T.D.; Lajtha, L.G. (1977), Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. *J. Cell. Physiol.*, 91: 335-344.

Ding, L.; Saunders, T.L.; Enikolopov, G.; Morrison, S.J. (2012). Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature* 481, 457–462.

Gale, R.; Goldman, J. (2013). E Donnall Thomas (1920–2012). *Bone Marrow Transplantation* 48, 1–1.

García-Piñeres, A.J., Lindenmeyer, M.T., Merfort I. (2004). Role of cysteine residues of p65/NF- $\kappa$ B on the inhibition by the sesquiterpene lactone parthenolide and N-ethyl maleimide, and on its transactivating potential. *Life Sci.* 75:841-856.

Gatto, S.; Scappini, B.; Pham, L.; Onida, F.; Milella, M.; Ball, G.; Ricci, C.; Divoky, V.; Verstovsek, S.; Kantarjian, H.M.; Keating, M.J.; Cortes-Franco, J.E.; Beran M. (2003) The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth and induces apoptosis in Bcr/Abl-positive cell lines sensitive and resistant to imatinib mesylate. *Haematologica.* 88:853–63.

Gemani, D., Tobin, L.A., Singh, A., Baer, M.R., Biswal, S., Rassool, F. (2010). The Dark Side of NRF2: Upregulation of NRF2 as a Mechanism for Resistance to Imatinib In CML. *Blood*. *116*:3401

Goldman, J.M. (2010). Chronic Myeloid Leukemia: A Historical Perspective. *Seminars in Hematology* *47*, 302–311.

Greaves, M. (2016). Leukaemia “firsts” in cancer research and treatment. *Nature Reviews Cancer* *16*, 163–172.

Grivennikov, S.I.; Karin, M. (2010). Dangerous liaisons: STAT3 and NF- $\kappa$ B collaboration and crosstalk in cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews* *21*, 11–19.

Guzman, M.L. (2001). Nuclear factor-kappaB is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells. *Blood*. *98*, 2301–2307.

Guzman, M.L., Rossi, R.M., Karnischky, L., Li, X., Peterson, D.R., Howard, D.S., Jordan, C.T. (2005). The sesquiterpene lactone parthenolide induces apoptosis of human acute myelogenous leukemia stem and progenitor cells. *Blood*. *105*:4163-4169.

Guzman, M.L., Rossi, R.M., Neelakantan, S., Li, X., Corbett, C.A., Hassane, D.C., Becker M.W., Bennett, J.M., Sullivan, E., Lachowicz, J.L., Vaughan, A., Sweeney, C.J., Mathews, W., Carroll, M., Liesveld, J.L., Crooks, P.A., Jordan, C.T. (2007). An orally bioavailable parthenolide analog selectively eradicates acute myelogenous leukemia stem and progenitor cells. *Blood*. *110*:4427-4435.

Guzman, M.L., Yang N., Sharma K.K., Balys M., Corbett C.A., Jordan C.T., Becker M.W., Steidl U., Abdel-Wahab, O., Levine R.L., Marcucci G., Roboz G.J., Hassane, D.C. (2014). Selective Activity of the Histone Deacetylase Inhibitor AR-42 against Leukemia Stem Cells: A Novel Potential Strategy in Acute Myelogenous Leukemia. *Mol. Cancer Ther.* *13*(8); 1979-90.

Hamilton A, Helgason GV, Schemionek M. (2012). Chronic myeloid leukemia stem cells are not dependent on Bcr-Abl kinase activity for their survival. *Blood*. *119*:1501-1510.

Hanahan, D.; Weinberg, R.A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*. *100*, 57–70.

Hanahan, D; Weinberg R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011; *144* (5); 646-674.

Hsieh, M.-Y., and Van Etten, R.A. (2014). IKK-dependent activation of NF- $\kappa$ B contributes to myeloid and lymphoid leukemogenesis by BCR-ABL1. *Blood* *123*, 2401–2411.

Hoggatt, J.; Kfoury, Y.; Scadden, D.T. (2016). Hematopoietic Stem Cell Niche in Health and Disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* *11*, 555–581.

Holyoake, T.; Jiang, X.; Eaves, C.; Eaves, A. (1999). Isolation of a highly quiescent subpopulation of primitive leukemic cells in chronic myeloid leukemia. *Blood* *94*, 2056–2064.

Holyoake, T.L.; Helgason, G.V. (2015). Do we need more drugs for chronic myeloid leukemia? *Immunological Reviews* *263*, 106–123.

Holyoake TL, Vetrie D. (2017). The chronic myeloid leukemia stem cell: stemming the tide of persistence. *Blood*. *129*:1595-1606.

Holze, C., Michaudel, C., Mackowiak, C. Haas, D.A., Benda, C., Hubel, P., Pennemann, F.L., Schnepf, D., Wettmarshausen, J., Braun, M., Leung, D.W., Amarasinghe, G.K., Perocchi, F., Staeheli, P., Ryffel, B., Pichlmair, A. (2018). Oxceptosis – a ROS induced caspase-independent apoptosis-like cell death pathway. *Nat Immunol*. *19*(2): 130–140.

Hori R., Yamaguchi, K., Sato H., Watanabe, M., Tsutsumi, K., Iwamoto S., Abe M., Onodera M., Nakamura S., Nakai R. (2019) The discovery and characterization of K-563, a novel inhibitor of the Keap1/Nrf2 pathway produced by *Streptomyces* sp. *Cancer Medicine*. *8*: 1157-68.



Hughes, T.P.; Hochhaus, A.; Branford, S.; Muller, M.C.; Kaeda, J.S.; Foroni, L.; Druker, B.J., Guilhot; F., Larson; R.A.; O'Brien, S.G.; et al. (2010). Long-term prognostic significance of early molecular response to imatinib in newly diagnosed chronic myeloid leukemia: an analysis from the International Randomized Study of Interferon and STI571 (IRIS). *Blood* 116, 3758–3765.

Ismail, S.I.; Naffa, R.G.; Yousef, A.M.F.; Ghanim, M.T. (2014). Incidence of bcr-abl fusion transcripts in healthy individuals. *Molecular Medicine Reports* 9, 1271–1276.

Jacobson, L.O.; Marks, E.K. (1949). The role of the spleen in radiation injury. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 70, 740–742.

Kampen, K.R. (2012). The discovery and early understanding of leukemia. *Leukemia Research* 36, 6–13.

Karvela, M., Baquero, P., Kuntz, E.M. Mukhopadhyay, A., Mitchell, R., Allan, E.K., Chan, E., Kranc, K.R., Calabretta, B., Salomoni, P., Gottlieb E., Holyoake, T.L., Helgason, G.V. (2016). ATG7 regulates energy metabolism, differentiation and survival of Philadelphia-chromosome positive cells. *Autophagy*. 12: 936-948

Karin, M. (2009). NF- $\kappa$ B as a Critical Link Between Inflammation and Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 1, a000141–a000141.

Kawasaki, B. T., Hurt, E. M., Kalathur, M., Duhagon, M. A., Milner, J. A., Kim, Y. S. and Farrar, W. L. (2009). Effects of the sesquiterpene lactone parthenolide on prostate tumor-initiating cells: An integrated molecular profiling approach. *Prostate*, 69: 827-837. doi:[10.1002/pros.20931](https://doi.org/10.1002/pros.20931)

Kiel, M.J.; Radice, G.L.; Morrison, S.J. (2007). Lack of Evidence that Hematopoietic Stem Cells Depend on N-Cadherin-Mediated Adhesion to Osteoblasts for Their Maintenance. *Cell Stem Cell* 1, 204–217.

Kiel, M.J.; Yilmaz, Ö.H.; Iwashita, T.; Yilmaz, O.H.; Terhorst, C.; Morrison, S.J. (2005). SLAM Family Receptors Distinguish Hematopoietic Stem and Progenitor Cells and Reveal Endothelial Niches for Stem Cells. *Cell* 121, 1109–1121.

Koretzky, GA. (2007). The legacy of the Philadelphia chromosome. *J Clin Invest.* 117(8): 2030–2032.

Krause, D.S.; Fackler, M.J.; Civin, C.I.; May, W.S. (1996). CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood* 87, 1–13.

Kwok, B.H., Koh, B., Ndubuisi, M.I., Elofsson, M., and Crews, C.M. (2001). The anti-inflammatory natural product parthenolide from the medicinal herb Feverfew directly binds to and inhibits I $\kappa$ B kinase. *Chem. Biol.* 8, 759–766.

Levin, R.H., Whang, J., Tjio, J.H., Carbone, P.P., Frei, E., Freireich, E.J. (1963). Persistent mitosis of transfused homologous leukocytes in children receiving antileukemic therapy. *Science.* 142(3597):1305-1311

Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2 $^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* 25, 402–408.

Lord, B.I.; Testa, N.G.; Hendry, J.H. (1975). The relative spatial distributions of CFUs and CFUc in the normal mouse femur. *Blood* 46, 65–72.

Lorenz, E.; Uphoff, D.; Reid, T.R.; Shelton, E. (1951). Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J. Natl. Cancer Inst.* 12, 197–201.

Maehle, A.H. (2011). Ambiguous cells: the emergence of the stem cell concept in the nineteenth and twentieth centuries. *Notes Rec R Soc Lond* 65, 359–378.

Marín-Llera, J.; Chimal-Monroy, J. (2016). Conceptos básicos de la Biología de las Células Troncales. In *Células Troncales: Biología y Aplicaciones En Biomedicina*, (México: Grañén-Porrúa), p. 591.

Mateo, V., Lagneaux, L., Bron, D., Biron, G., Armant, M., Delespesse, G., Sarfati, M. (1999). CD47 ligation induces caspase-independent cell death in chronic lymphocytic leukemia. *Nat. Med. Nat.* *5(11)*:1277-84.

Mayani, H. (2016). Sangre Blanca. Doscientos años de estudio y tratamiento de la leucemia. (Paralelo 21).

Méndez-Ferrer, S.; Lucas, D.; Battista, M.; Frenette, P.S. (2008). Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. *Nature* *452*, 442–447.

Minhajuddin, M., Pei, S., Ashton, J.M., Callahan, K., Lagadinou, E., Balys, M., Corbett, C., Neeing, S., Rossi, R.M., Jordan, C.T. (2011). Molecular Mechanisms of Parthenolide-Mediated Pro-Apoptotic Activity in Acute Myeloid Leukemia Cells. *Blood*. *118*:2463.

Moreno-Lorenzana, D., Avilés-Vazquez, S., Sandoval-Esquivel M.A., Alvarado-Moreno, J., 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*. 00-00. 10.1080/15384101.2016.1160976.

Morrison, S.J., Scadden, D.T. (2014). The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature* *505*, 327–334.

Mughal, T.I.; Radich, J.P.; Deininger, M.W.; Apperley, J.F.; Hughes, T.P.; Harrison, C.J., Gambacorti-Passerini, C.; Saglio, G.; Cortes, J.; Daley, G.Q. (2016). Chronic myeloid leukemia: reminiscences and dreams. *Haematologica* *101*, 541–558.

Nakagawa Y., Iinuma M., Matsuura N., Yi K., Naoi M., Nakayama T., Nozawa Y., Akao Y. (2005). A potent apoptosis-inducing activity of a sesquiterpene lactone, arucanolide, in HL60 cells: a crucial role of apoptosis-inducing factor. *J. Pharmacol. Sci.* *97*, 242-52

Nieborowska-Skorska, M.; Kopinski, P.K.; Ray, R.; Hoser, G.; Ngaba, D.; Flis, S.; Cramer, K.; Reddy, M.M.; Koptyra, M.; Penserga, T.; et al. (2012). Rac2-MRC-cIII-generated ROS cause genomic instability in chronic myeloid leukemia stem cells and primitive progenitors. *Blood* *119*, 4253–4263.

Nilsson, S.K. (2005). Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood* *106*, 1232–1239.

Nowell, P.C. (2007). Discovery of the Philadelphia chromosome: a personal perspective. *Journal of Clinical Investigation* *117*, 2033–2035.

Papayannopoulou, T.; Scadden, D.T. (2008). Stem-cell ecology and stem cells in motion. *Blood* *111*, 3923–3930.

Pei, S., Minhajuddin, M., Callahan, K.P., Balys, M., Ashton, J.M., Neering, S.J., Lagadinou, E.D., Corbett, C., Ye, H., (2013). Targeting aberrant glutathione metabolism to eradicate human acute myelogenous leukemia cells. *J. Biol. Chem.* *288*:33542-33558.

Petzer, A.L., Eaves, C.J., Lansdorp, P.M., Ponchio, L., Barnett, M.J., Eaves, A.C. (1996). Characterization of primitive subpopulations of normal and leukemic cells present in the blood of patients with newly diagnosed as well as established chronic myeloid leukemia. *Blood*. *88*(6):2162-2171.

Purton L.E., Scadden, D.T. (2008). The hematopoietic stem cell niche. *StemBook*. [Internet]. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute

Quintas-Cardama, A.; Cortes, J. (2009). Molecular biology of *bcr-abl1*-positive chronic myeloid leukemia. *Blood*. *113*; 1619-1630.

Ramalho-Santos, M., Willenbring, H. (2007). On the Origin of the Term "Stem Cell." *Cell Stem Cell* *1*, 35–38.

Scaturro P., Pichlmair (2019). A. Oxidative: a discreet way to respond to radicals. *Current Opinion in Immunology*. *56*:37–43

Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* *4*, 7–25.

Seita, J., Weissman, I.L. (2010). Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Rev. Syst. Biol. Med.* *2(6)*, 640-653.

Sell, S. (2010). On the Stem Cell Origin of Cancer. *The American Journal of Pathology* *176*, 2584–2594.

Sen, R., Baltimore, D. (1986). Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* *46*, 705–716.

Spangrude, G., Heimfeld, S., Weissman, I. (1988). Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* *241*, 58–62.

Stier, S.; Ko, Y.; Forkert, R.; Lutz, C.; Neuhaus, T.; Grünewald, E.; Cheng, T.; Dombkowski, D.; Calvi, L.M.; Rittling, S.R.; et al. (2005). Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size. *The Journal of Experimental Medicine* *201*, 1781–1791.

Tefferi, A. (2007). The history of myeloproliferative disorders: before and after Dameshek. *Leukemia* *22*, 3.

Thomas, E.D. (1994). Bone marrow transplantation: past, present and future. *Rev. Invest. Clin. Suppl*, 5–6.

Tothova, Z.; Kollipara, R.; Huntly, B.J.; Benjamin, H.L.; Castrillon, D.H., Cullen, D.E., McDowell, E.P., Lazo-Kallanian, S.; Williams, I.R.; Sears, C.; Armstrong, S.A.; Passegué, E.; DePinho, R.A., Gilliland, D.G. (2007) FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. *Cell*. 128:325-339.

Tough, I.M., Jacobs, P.A., Court-Brown, W.M., Baikie, A.G., Williamson, E.R. (1963). Cytogenic studies on bone-marrow in chronic myeloid leukaemia. *The Lancet*. 281 (7286); 844-846.

Vardiman, J.W.; Harris, N.L.; Brunning, R.D. (2002). The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 100, 2292–2302.

Walker, W.H.; Stein, B.; Ganchi, P.A.; Hoffman, J.A.; Kaufman, P.A.; Ballard; D.W., Hannink; M.; Greene, W.C. (1992). The v-rel oncogene: insights into the mechanism of transcriptional activation, repression, and transformation. *J. Virol*. 66, 5018–5029.

Yao L.; Yokota T.; Xia L.; Kincade P.W.; McEver R.P. (2995) Bone marrow dysfunction in mice lacking the cytokine receptor gp130 in endothelial cells. *Blood*. 106:4093-4101

Zhou P. (2011). Localization, activity and targeting of Bcr-Abl in chronic myeloid leukaemia. Ph. D. University of Glasgow.