



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

**Participación de los Inhibidores de Cinasas Dependientes de Ciclinas (CDKIs) en la
Inhibición de la Proliferación Mediada por los Fármacos Antineoplásicos, Imatinib y
Dasatinib, en de Células Primitivas de Leucemia Mieloide Crónica.**

T E S I S

Que presenta

M. en C. Dafné L. Moreno Lorenzana

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOMEDICINA MOLECULAR

Directores de la Tesis:

Dra. María Antonieta Chávez González

Dr. Vianney Ortiz Navarrete

México, D.F.

Agosto, 2015

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Biomedicina Molecular del CINVESTAV por acreditarme como estudiante y ahora Doctora en Ciencias.

A la Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca, con registro 332745, proporcionada con registro durante la realización de este trabajo.

A la Dra. María Antonieta Chávez Gonzáles por su apoyo incondicional como tutor principal de este proyecto.

Al Dr. Vianney Ortiz Navarrete y a la Dra. Rosana Pelayo por sus importantes aportaciones y sugerencias como miembros del Comité Tutor de este proyecto.

INDICE

AGRADECIMIENTOS.....	2
RESUMEN.....	5
ABSTRACT.....	6
INTRODUCCIÓN.....	7
- SISTEMA HEMATOPOYÉTICO.....	7
- LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA.....	10
- TRATAMIENTO ACTUAL.....	16
- CICLO CELULAR.....	22
JUSTIFICACIÓN.....	26
HIPÓTESIS.....	27
OBJETIVO GENERAL.....	28
OBJETIVOS PARTICULARES.....	28
MATERIALES Y METODOS.....	29
RESULTADOS.....	34
- Los inhibidores de la actividad tirosina cinasa de BCR-ABL reducen la viabilidad y retrasan la proliferación de células leucémicas	34
- Los inhibidores de la actividad tirosina cinasa de BCR-ABL arrestan en las fases G ₀ /G ₁ a las células leucémicas.....	42
- Los inhibidores de la actividad tirosina cinasa de BCR-ABL reducen los niveles proteicos de p18 y p57.....	45
- Los inhibidores de la actividad tirosina cinasa de BCR-ABL incrementan la concentración de p18 y p57 en el núcleo.....	49
- El tratamiento in vitro con dasatinib o imatinib arresta a las células CD34 ⁺ CD38 ⁻ Lin ⁻ de pacientes con leucemia mieloide crónica en las fases G ₀ /G ₁ y reduce los niveles proteicos totales de p18 y p57.....	53
DISCUSIÓN.....	56
CONCLUSIÓN.....	62

PERSPECTIVAS.....	63
REFERENCIAS.....	64

RESUMEN

La Leucemia Mieloide Crónica (LMC) es una enfermedad mieloproliferativa, que se origina en una población de células troncales hematopoyéticas (CTL) que expresan la proteína oncogénica BCR-ABL, la cual tiene actividad tirosina cinasa constitutiva. Los tratamientos contra la LMC consisten en fármacos inhibidores de dicha actividad, llamados Imatinib y Dasatinib, que aunque son capaces de mejorar el estado general del paciente, son incapaces de eliminar a las CTL, ya que en este nivel de la hematopoyesis parecen actuar únicamente bloqueando la proliferación, aunque no se ha descrito las moléculas que están involucradas. Por esta razón, el objetivo de este trabajo es elucidar si la inhibición inducida por Imatinib y Dasatinib esta relacionada con los CDKIs: p16, p18, p21, p27 y p57.

En líneas celulares de LMC y en células primitivas hematopoyéticas de sujetos con LMC tratadas *in vitro* con Imatinib y Dasatinib fueron analizadas en cuanto a proliferación, estado del ciclo celular, expresión de ARN, expresión de proteína y localización celular de CDKIs

Los resultados demuestran que al inhibir BCR-ABL con Imatinib o Dasatinib se bloquea la proliferación de una población que es independiente de la actividad de BCR-ABL, sin afectar la contraparte normal favoreciendo la acumulación de las CTLs en fase G₀ o G₁ del ciclo celular, sin modificar los niveles de ARN, pero si genera una reducción en los niveles proteicos de p18 y p57, así como en su localización celular.

El tratamiento con Imatinib o Dasatinib, induce la translocación de CDKIs al núcleo favoreciendo la acumulación de CTL en las fases G₀/G₁ del ciclo celular, permitiendo el resurgimiento de la hematopoyesis normal detectada en los pacientes.

ABSTRACT

Chronic Myeloid Leukemia (CML) is a myeloproliferative disease, which originates in a population of hematopoietic stem cells (CTL) expressing the BCR-ABL oncogenic protein, which has constitutive tyrosine kinase activity. CML treatments consist inhibitor drugs such activity, called Imatinib and Dasatinib, which although capable of improving the general condition of the patient, are unable to eliminate the CTL, since in this level of hematopoiesis appear to act by blocking only proliferation, although not described molecules are involved. Therefore, the objective of this work is to elucidate whether inhibition induced by Imatinib and Dasatinib is related to the CDKIs: p16, p18, p21, p27 and p57.

In CML cell lines and hematopoietic stem cells in patients with CML treated in vitro with Imatinib and Dasatinib were analyzed for proliferation, cell cycle status, RNA expression, protein expression and cellular localization of CDKIs

The results show that inhibiting BCR-ABL with Imatinib or Dasatinib proliferation of a population that is independent of BCR-ABL activity is blocked, without affecting the normal counterpart favoring the accumulation of CTLs in G0 or G1 phase of the cell cycle , unmodified RNA levels, but results in a reduction in the protein levels of p18 and p57 as well as their cellular location.

Treatment with Imatinib or Dasatinib induces translocation to the nucleus CDKIs favoring the accumulation of CTL in the G0 / G1 phase of the cell cycle, allowing the revival of normal hematopoiesis detected in patients.

INTRODUCCIÓN

SISTEMA HEMATOPOYÉTICO

La hematopoyesis -producción de células sanguíneas- es un proceso complejo a través del cual las células troncales hematopoyéticas proliferan y se diferencian, dando lugar a los distintos tipos de células maduras circulantes en sangre. Este proceso se lleva a cabo en diferentes órganos a lo largo del desarrollo prenatal, como es en: el saco vitelino, la región aorta-gónada-mesonefros, el hígado fetal, el bazo fetal y la médula ósea, siendo. Este último órgano es donde se desarrolla más del 95% de la actividad hematopoyética durante la vida adulta (Mayaniet *al.*, 1992).

El Sistema Hematopoyético, para su estudio, se ha dividido en cuatro compartimentos. El primero, corresponde a las Células Troncales Hematopoyéticas (CTHs), residen en la médula ósea y constituye una población heterogénea con morfología linfoblastoide que representa menos del 0.1% del total de células contenidas en médula ósea. Funcionalmente las CTHs se distinguen por tres características principales: 1) Son autorrenovables, ya que tienen la capacidad de dar origen a células con las mismas características funcionales de la célula original. Esta función es muy importante, ya que asegura la existencia de un número suficiente de células troncales disponibles para cubrir las demandas hematopoyéticas de un individuo a lo largo de toda su vida y aunque pudieran estar sujetas a un constante estrés fisiológico que estimula su diferenciación y proliferación, como sucede bajo condiciones de hipoxia o durante una infección, en condiciones normales nunca se genera el agotamiento de la población. 2) Son multipotentes, es decir, tienen la capacidad de generar al menos los ocho linajes hematopoyéticos: linfocitos B y T, eritrocitos, megacariocitos/plaquetas, basófilos/células cebadas, eosinófilos, neutrófilos/granulocitos y monocitos/macrófagos. 3) Poseen un alto potencial de proliferación ya que se ha estimado que un humano sano existen aproximadamente 50 millones de CTHs, algunas de las cuales generaran más de 10^3 células maduras a lo largo de su vida (Szilvassy SJ, 2003).

Las CTHs no pueden ser reconocidas por su morfología, su identificación se ha realizado con base en la expresión de marcadores moleculares de la superficie celular, como: CD34, CD133, CD90 y CD117. Además, son negativas para: CD38, CD45-RA y HLA-DR, glicoforina A, CD2, CD3, CD14, CD15, CD16, CD19, CD20, CD56 y CD66b, lo que las agrupa dentro de la población células linaje negativo (Lin⁻)

(Wognum *et al*, 2003). Funcionalmente las CTH al ser trasplantadas en ratones irradiados son capaces de reconstituir la hematopoyesis a largo plazo.

Conforme las CTHs avanzan en el proceso de maduración, dan origen al segundo compartimiento, formado por las Células Progenitoras Hematopoyéticas (CPHs). Esta población es muy heterogénea y constituye más del 0.5% del total de las células presentes en la médula ósea (Engelhardt *et al*, 2002). Funcionalmente, aunque han perdido la capacidad de autorrenovarse, conservan su alto potencial de proliferación y pueden ser multipotenciales, bipotenciales o monopotenciales. Las CPH mantienen la expresión de la molécula CD34 y presentan patrones de expresión de marcadores celulares muy particulares, de acuerdo al linaje hacia el cual comienzan a diferenciarse. Por ejemplo, el progenitor común para células mieloides expresa CD10 (Mayani *et al*, 1993).

Durante el progreso de la diferenciación las CPHs dan lugar al tercer compartimiento, los precursores hematopoyéticos, que a pesar de ser inmaduros, son reconocibles por su morfología y representan más del 95% de las células residentes en médula ósea. Finalmente, el cuarto compartimiento involucra a todas las células sanguíneas circulantes, encargadas de realizar funciones biológicas específicas en el organismo. Las células maduras tienen un tiempo de vida finito, que va de un rango de 1 día, como los neutrófilos; hasta 120 días, como los eritrocitos en humanos.

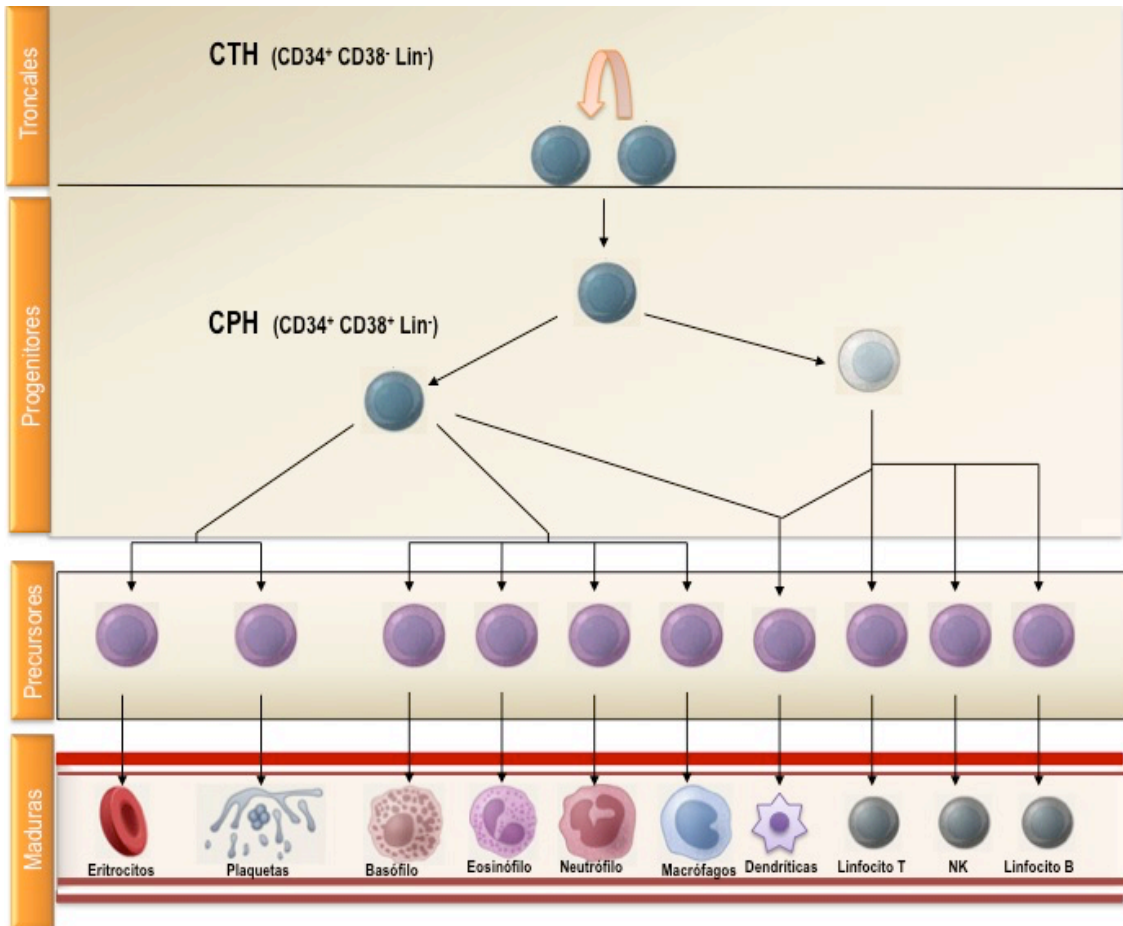


Figura 1. Organización del Sistema Hematopoyético. El esquema muestra al inicio las Células Troncales Hematopoyéticas (CTHs), que dan origen a las Células Progenitoras Hematopoyéticas (CPHs), conforme progresa la diferenciación se encuentran las Células Precursoras Hematopoyéticas y finalmente las Células Maduras que se encuentran en circulación.

Es evidente que la hematopoyesis es un proceso muy complejo, en el que participan diversos tipos celulares y sus productos; todos estos interactúan estrechamente para permitir que la producción de células sanguíneas ocurra de manera controlada. Sin embargo, ocasionalmente este control se pierde y la producción de células sanguíneas se altera, de manera que los niveles de células circulantes sean abatidos drásticamente o incrementados muy por encima de lo normal; cualquiera de estas condiciones lleva a estados patológicos severos dentro de los que se encuentra la Leucemia Mieloide Crónica (Chávez González M A y Moreno-Lorenzana D., 2011).

LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA

La Leucemia Mieloide Crónica (LMC) es una enfermedad mieloproliferativa que tiene su origen en una población con fenotipo troncal CD34⁺CD38⁻Lin⁻, que ha adquirido el cromosoma Philadelphia (Ph⁺) y su producto oncogénico *bcr-abl*. La población iniciadora de la LMC co-existe y comparte características funcionales con las CTHs normales, como: capacidad de autorenovación, capacidad de diferenciación y proliferación, razón por la cual reciben el nombre de Células Troncales Leucémicas (CTLs). La capacidad de autorrenovación de las CTLs de sujetos con LMC fue demostrada empleando modelos de xenotrasplante, en los que células CD34⁺ obtenidas de individuos con LMC fueron trasplantadas a ratones inmunodeficientes (SCID) y ratones diabéticos no-obesos (NOD/SCID), esta población fue capaz de injertar y recapitular el fenotipo leucémico humano (Huntly BJ and Gilliland DG, 2005). Posteriormente también se demostró que las CTLs eran capaces de generar células maduras Ph⁺ de linaje mieloide y linfoide, funcional y fenotípicamente indistinguibles de su contraparte normal (Eaves CJ, *et al.*, 2001).

La incidencia de LMC a nivel mundial es de 0.76 – 1.96 casos por cada 100, 000 habitantes. En EUA se diagnostican más de 6, 000 casos nuevos por año, cifra que representa el 10% de todos los casos de leucemia diagnosticados (Höglund M, *et al.* 2015) y la prevalencia en el 2010 fue de 70,000 casos, tan sólo en este país (Xuelin H, *et al.* 2012). En México no existen datos oficiales acerca del epidemiología de las leucemias, pero gracias a información directa proporcionada por hematólogos, se ha calculado que existen alrededor de 80, 000 casos de leucemia por año, de las cuales el 10% corresponde a LMC (Chávez-González A, *et al.*, 2009). La frecuencia de la LMC es baja en personas menores de 40 años, pero se incrementa exponencialmente con la edad. No hay evidencia de que exista predisposición genética para desarrollar LMC, pero tener un alto índice de masa corporal ha sido identificado como un posible factor de riesgo. La exposición a radiación ionizante se ha identificado como causante de LMC, ya que su incidencia se incrementó entre los sobrevivientes de la ciudad de Hiroshima y Nagasaki después de la segunda guerra mundial, mismo fenómeno que se repitió entre los trabajadores encargados de limpiar el desastre de la planta nuclear en Chernobyl. También parece existir una asociación entre el desarrollo de la enfermedad y la exposición a: benceno, solventes orgánicos, agentes alquilantes, inhibidores de la topoisomerasa II y otros agentes quimioterapéuticos (Rohrbacher M and Hasford J, 2013).

Los síntomas típicos que presentan el 50% de los pacientes son: astenia, anorexia, pérdida de peso y esplenomegalia. El otro 50% de los pacientes son asintomáticos y su diagnóstico se basa únicamente en hiperleucocitosis (cuentas superiores a 20,000 leucocitos/mm³).

La LMC distingue tres fases clínicas:

- Fase Crónica: Etapa indolente que dura entre 4 y 6 años, se caracteriza por el incremento en la producción de granulocitos ya lo largo de esta etapa, las células son capaces de diferenciarse de manera normal con menos del 5% de blastos en sangre periférica y médula ósea. El 90% de los pacientes son diagnosticados en esta fase.
- Fase Acelerada: Se caracteriza por un incremento de la frecuencia de blastos (5-30%) en sangre periférica y médula ósea. Estudios citogenéticos y moleculares muestran alteraciones adicionales al cromosoma Ph, relacionados con la evolución de la enfermedad. En 70-80% de los pacientes se detectan cambios que involucran los cromosomas 8, 17, 9 y 22. Específicamente se observa: trisomía 8, que está asociado a la sobreexpresión del gen *myc*; mutaciones, rearrreglos o deleciones del cromosoma 17 que involucra alteraciones en el gen *p53*, lo que causa alteraciones en la regulación del ciclo celular, así como alteraciones en *p16^{INK4A}*, que se encuentra en el cromosoma 9.
- Crisis Blástica: Etapa terminal de la enfermedad, dura 3 - 5 meses, durante esta fase las células han perdido la capacidad de diferenciarse y clínicamente resulta en más del 30% de blastos en médula ósea e incluso en infiltrados extramedulares. Aproximadamente el 65% de los pacientes evolucionan a una crisis blástica mieloide, el 30% presenta una crisis blástica linfóide y el resto, el 5% de los casos, se manifiestan como leucemias bifenotípicas, ya sea indiferenciadas o de células T.

La LMC fue la primera neoplasia humana asociada a la presencia de una anormalidad cromosómica, el cromosoma Philadelphia (Ph). Dicha anormalidad resulta de la translocación recíproca entre los brazos largos del cromosoma 9 y 22, dando origen a un gen de fusión llamado *bcr-abl* t(9,22)(q34,q11), que involucra un segmento del extremo 3' del gen *abl* (9q34) y un segmento del extremo 5' del gen *bcr* (22q11), que genera un transcrito de 8.5 kb (Figura 2) (Quintás-Cardama A and Cortes J, 2008). En 1990, el grupo de Verfaillie demostró que el gen *bcr-abl* es la causa del desarrollo de la

enfermedad, ya que al trasplantar células CD34⁺ humanas infectadas con un retrovirus que contenía la secuencia *bcr-abl* en ratones inmunodeficientes desarrollan un fenotipo leucémico semejante a LMC de humanos (Zhao RC *et al.*, 2001).

El gen *bcr* (del inglés breakpoint cluster region), localizado en el brazo largo del cromosoma 22, codifica para una proteína de 160kDa de expresión ubicua, con función serina/treonina cinasa en el extremo amino terminal. La cinasa BCR se localiza en citoplasma y dentro de sus sustratos se encuentran: proteínas de la familia 14-3-3, BAP1, la proteína adaptadora GRB2 (del inglés Growth-factor.receptor-bound 2) y la proteína XPB (del inglés Xeroderma pigmentosum protein). En el extremo carboxilo terminal tiene un sitio de unión a proteínas GAP (del inglés GTPase Activating Protein) y en la región central tiene una secuencia homóloga a las GEFs (del inglés Guanine nucleotide Exchange Factor). Las proteínas con las que se asocia BCR están involucradas en: ciclo celular, daño al ADN y rearrreglo del citoesqueleto (Laurent E, *et al.*, 2001).

El gen *abl* humano, tiene una secuencia homologa al del virus Abl (del inglés Abelson murine leukemia), se localiza en el cromosoma 9 y da lugar a una proteína tirosina cinasa de 140kDa de expresión ubicua. ABL, además del dominio tirosina cinasa (SH1), tiene una secuencia altamente conservada en homología con SRC (SH2), dominio SH3 y una región rica en prolinas. La secuencia rica en prolinas le permite unirse a dominios SH3 de otras proteínas adaptadoras como CRKL, GRB2, también posee un dominio de unión al ADN, dominio de unión a actina, tres señales de localización nuclear y una de localización citoplasmática, que determinan la localización subcelular de ABL en respuesta a estímulos del ambiente. La función de ABL está asociada a regular procesos relacionados con el crecimiento y supervivencia celular, también participa en el remodelamiento del citoesqueleto durante la diferenciación, división y adhesión celular. Regula la reparación de daño al ADN, a través de la interacción con Atm, p53 y p57, cuando el daño es irreversible activa vías proapoptóticas (Quintás-Cardama A and Cortes J, 2008).

El punto de ruptura del gen *abl* puede ocurrir en cualquier sitio a lo largo de una región de 300kb en su extremo 5'. En contraste el gen *bcr* puede romperse en tres diferentes regiones: el primer sitio se ubica en una región de 5.8kb entre los exones 12 y 16, referido como la región de ruptura principal (M-bcr) porque ocurre en mayor frecuencia y da origen a una proteína de 210kDa (p210^{Bcr-Abl}), característica de los pacientes con LMC y de una tercera parte de los pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA). El

segundo sitio de ruptura se ubica en el exón 2, en una región de 54.4kb, conocida como región de ruptura menor (m-bcr) y codifica a una proteína de 190kDa (p190^{Bcr-Abl}), presente en pacientes con LLA. Finalmente, el sitio de ruptura que ocurre en menor frecuencia y conocido como μ -bcr se ubica en el exón 19, da origen a una proteína de 230kDa (p230^{Bcr-Abl}), característica de la Leucemia Neutrófilica Crónica (Laurent E, *et al.*, 2001).

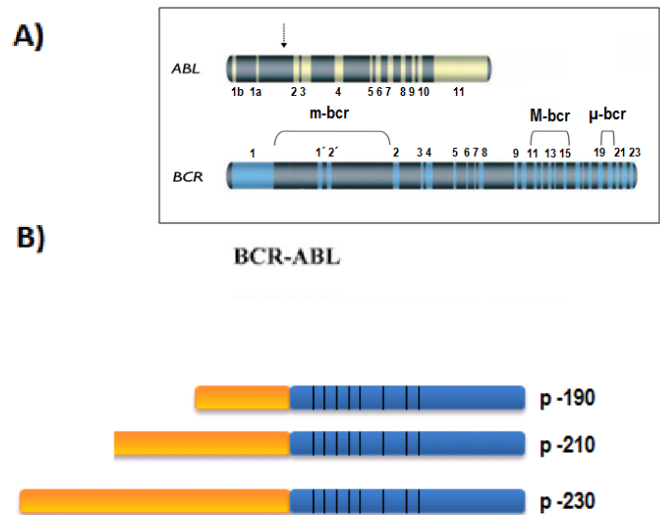


Figura 2. (A) Sitios de ruptura en el gen *abl* y *bcr*. El sitio de ruptura en *abl* es entre el primer y segundo exón. En el gen *bcr* existen tres regiones de ruptura: M-bcr, m-bcr y μ -bcr. (B) Dependiendo del sitio de ruptura se pueden originar tres productos proteicos de diferente peso molecular, cuando la ruptura se da en la región m-bcr se origina una proteína de 190 kDa, en M-bcr se origina una proteína de 210 kDa y en μ -bcr se origina una proteína de 230 kDa.

La proteína p-210^{Bcr-Abl} se localiza exclusivamente en citoplasma y tiene una actividad tirosina cinasa incrementada y constitutiva, esencial para la transformación maligna. La actividad tirosina cinasa de BCR-ABL resulta de la eliminación del dominio SH3 de ABL, encargado de regular negativamente su actividad, y tiene como consecuencia la autofosforilación de p-210^{Bcr-Abl} en el residuo Tirosina 177 (Y177), correspondiente a la región de BCR (Sattler M and Griffin JD, 2001). p-210^{Bcr-Abl} activa constitutivamente diferentes vías de señalización, que tienen como efectos biológicos: incremento de la proliferación celular, inhibición de la apoptosis, alteraciones en la adhesión y en la migración celular; eventos que conducen al

fenotipo leucémico (Deininger JM *et al*, 2000). El incremento en la actividad proliferativa está mediada por múltiples vías de señalización e involucran la participación de diferentes proteínas: RAS (Sawyers C *et al*, 1995), STAT 3/5 (Horita M *et al*, 2000) y PI3k (Rauther J *et al*, 1998), estas dos últimas también participan en los mecanismos de evasión de la apoptosis, ya que regulan la inhibición de miembros con actividad proapoptótica de la familia de proteínas BCL-2 (Gutiérrez-Castellanos S *et al*, 2004). Los mecanismos a través de los cuales p-210^{Bcr-Abl} interactúa con la vía de Ras son complejos, dentro de las moléculas involucradas se encuentran proteínas adaptadoras como GRB-2 y SOS, y a través de proteínas intermediarias favorecen la activación de factores de transcripción como: JUN, CREB y ELK, que regulan positivamente la expresión de genes que participan en proliferación celular. Otra de las principales vías que se activa es PI3k, también a través de proteínas adaptadoras, GRB-2 y CRKL, dos de los principales efectores finales de esta vía son: AKT y el factor de transcripción NFκB, que participan en la inhibición de la proliferación y en la supervivencia celular, respectivamente. En células hematopoyéticas CD34⁺ p-210^{Bcr-Abl} se ha demostrado que son independientes de factores de crecimiento como consecuencia de la constante activación de miembros de la familia de factores de transcripción STAT, específicamente STAT3 y STAT5. Los factores de transcripción STAT3 y STAT5 están río abajo de los diferentes factores de crecimiento que regulan la hematopoyesis, como IL3 y GM-CSF. En LMC su activación constitutiva favorece la expresión de genes que favorecen la supervivencia de estas células (Laurent E, *et al.*, 2001).

Por otro lado, la adhesión de células CD34⁺ p-210^{Bcr-Abl} a la matriz extracelular y al estroma de la médula ósea está reducida porque BCR-ABL, a través de CRKL y SCR, fosforila e inactiva a proteínas de adhesión focal, entre ellas a FAK, p130, CAS y HEF1, que tiene como consecuencia la reducción de las fibras de estrés y el incremento en la motilidad celular, además, se ha demostrado que la actividad de p-210^{Bcr-Abl} favorece la expresión de la integrina β1, una variante que no se encuentra en la contra parte normal, que inhibe la adhesión al estroma y/o matriz celular, en conjunto tienen como efecto la expansión y salida prematura a circulación de progenitores y precursores mieloides (Jorgensen HG and Holyoake TL, 2001).

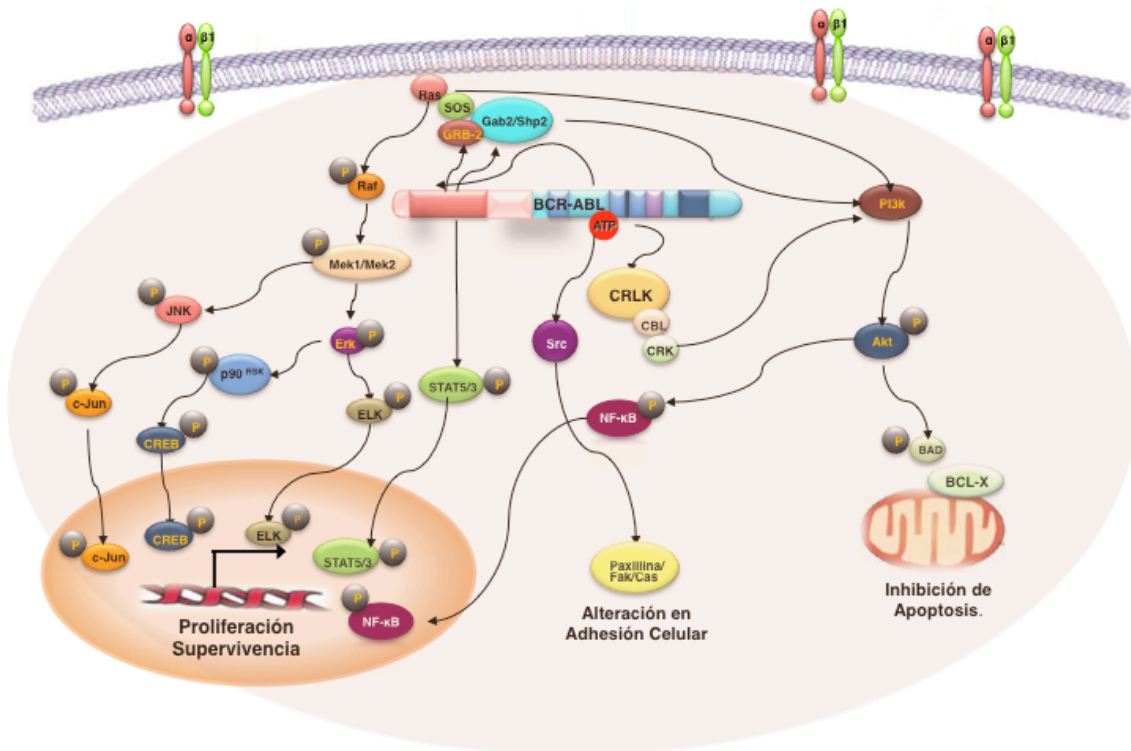


Figura 3. Vías de señalización activadas por Bcr-Abl. La fosforilación del residuo Y177 de Bcr sirve como sitio de anclaje para la proteína GRB2 (Growth Factor Receptor 2), la cual asocia a la proteína GAB2 (GRB2-associated binding protein 2), así como a SOS (Son of sevenless; de la superfamilia de las proteínas Ras), resultando en la activación de la vía de Ras-MAPK, que resulta en la transcripción del gen anti-apoptótico BCL-2. Por otro lado GAB-2 fosforilado es capaz de reclutar a PI3K (phosphatidylinositol 3-kinasa), y resulta en la activación de AKT. Bcr-Abl también es capaz de activar a STAT5, de manera indirecta a través de la activación de las cinasas de la familia de Src: HCK y LYN. El efecto global de la activación constitutiva de Bcr-Abl es el aumento de la proliferación y supervivencia celular, así como en alteraciones en adhesión y motilidad celular.

p210^{BCR-ABL} es el principal evento molecular identificado que desencadena la LMC, pero no es el único, las CTLs no son dependientes de la actividad tirosina cinasa de BCR-ABL y tienen otros mecanismos moleculares, algunos compartidos con las CTHs, que favorece la supervivencia y la autorenovación de estas células, como son: reguladores de metabolismo celular (Arachinodate 5-lipogénase (*Alox5*) y Stearoyl-CoA desaturase1 (*Scd1*), genes que participan en la diferenciación de CTH (β -catenina y Hedgehog (*Hh*)), miembros de la familia cinasas de SRC (HCK y LYN), moléculas de adhesión (P-

selectina, CD44 y MSR1) y factores de transcripción (Forkhead O transcription factor3a (*Foxo3a*) e Hypoxia-inducible factor-1 α (*Hif1* α) (Chen and Li, 2013) (Figura 4).

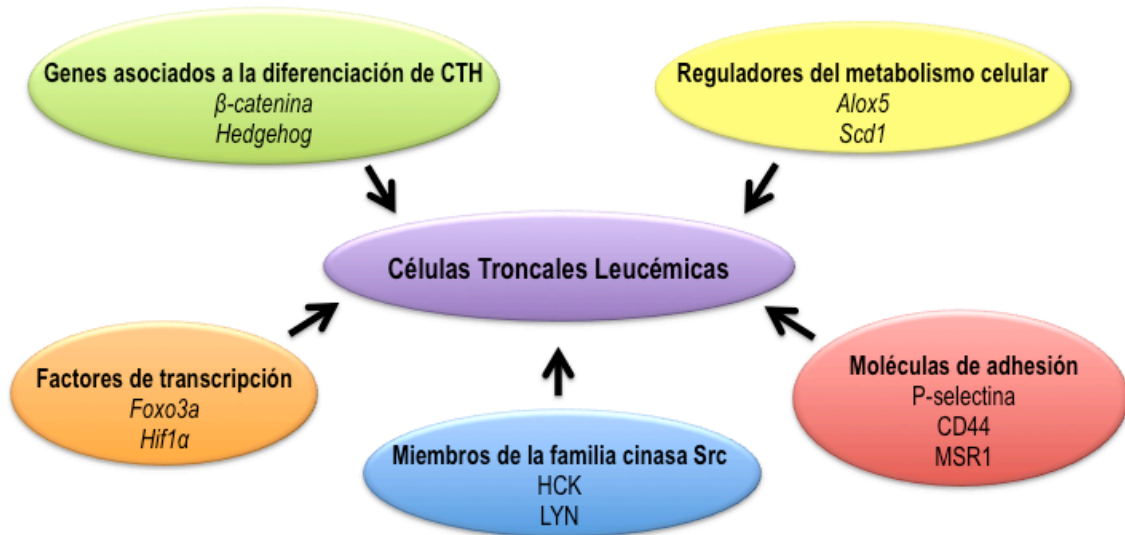


Figura 4. Células Troncales Leucémias. Las CTLs tienen otros mecanismo moleculares, algunos compartidos con las CTHs, que favorece la supervivencia y la autorenovación de estas células, como son: reguladores de metabolismo celular (Arachinodate 5-lipogenase (*Alox5*) y Stearoyl-CoA desaturase1 (*Scd1*), genes que participan en la diferenciación de CTH (β -catenina y Hedgehog (*Hh*)), miembros de la familia cinasas de SRC (HCK y LYN), moléculas de adhesión (P-selectina, CD44 y MSR1) y factores de transcripción (Forkhead O transcription factor3a (*Foxo3a*) e Hypoxia-inducible factor-1 α (*Hif1* α)).

TRATAMIENTO ACTUAL

Las estrategias terapéuticas para LMC han ido cambiando a lo largo del tiempo y aunque a la fecha la única opción curativa es el trasplante alogénico de células hematopoyéticas, con esta opción entre 50-80% de los pacientes tienen, en promedio, hasta 33 meses de supervivencia libre de enfermedad (Milone JH, *et al.* 1999). Sin embargo, el trasplante alogénico está limitado a pacientes que cuentan con un donador compatible y tiene las condiciones óptimas para ser sometido al procedimiento, que involucra altas dosis de quimioterapia e irradiación total del cuerpo. (Savage and Goldman, 1997). Considerando lo anterior, ha sido necesario buscar alternativas para el tratamiento de los pacientes con LMC.

El Interferon- α (IFN α), fue y en algunos casos continúa siendo la primera opción terapéutica capaz de extender de manera significativa la fase crónica de la enfermedad y por lo tanto retrasar la progresión a la fase acelerada. El IFN α es una molécula, que de manera general, regula la actividad de los linfocitos T e *in vivo* incrementa la respuesta inmune a través de la activación de células: dendríticas, NKs (del inglés Natural Killers) y T citotóxicas, cada una ellas capaces de generar respuesta anti-tumoral. En células BCR-ABL⁺, el IFN α induce inhibición de la proliferación y retrasa la progresión a etapas más avanzadas de la enfermedad, además es capaz de modular la hematopoyesis porque incrementa la adhesión de células progenitoras leucémicas a las células estromales del microambiente. Este incremento en la adhesión de células progenitoras leucémicas ha sido asociado con una reducción en los niveles de ácido neuroamínico y por el incremento en la expresión de moléculas que regulan las interacciones celulares entre células del microambiente y las células hematopoyéticas, como: β 2-Integrina, L-selectina e ICAM-1 (Dowding C, *et al.*, 1993; Martín-Henao G, *et al.*, 2000; Talpaz M, 2001). Debido a que el IFN α es un inmunostimulante inespecífico muchas personas tienen que discontinuar el tratamiento por efectos secundarios adversos.

Desde que se identificó la actividad tirosina cinasa de p210^{BCR-ABL} como la principal causante de la fisiopatología, la búsqueda o diseño de moléculas que inhiban su actividad de manera selectiva se convirtieron en una opción atractiva para su tratamiento. En 1996, Buchdunger y cols. realizaron la síntesis de una serie de compuestos que inhiben la actividad del receptor del factor derivado de plaquetas (PDGF-R) y de la cinasa ABL. (Buchdunger *et al.*, 1996). Estos compuestos emergen de una amplia librería de compuestos con la finalidad de identificar a inhibidores de proteínas cinasas. Uno de estos compuestos identificados es la 2-fenilamonopirimidina, que sirvió como punto de partida para otros compuestos

relacionados. Después de las modificaciones realizadas al compuesto original se generó STI571 (del inglés Signal Transduction Inhibitor 571), ahora conocido como Imatinib (Gleevec®, Novartis Pharmaceuticals), que en estudios *in vitro* e *in vivo* demostró tener una actividad inhibidora potente y específica contra la cinasa BCR-ABL (Drucker *et al.*, 1997). Imatinib actúa como un inhibidor competitivo del ATP, se une específicamente a BCR-ABL a través de puentes de hidrógeno que establece con seis residuos de aminoácidos localizados en el sitio activo de ABL, de esta manera evita su activación y la fosforilación de los sustratos activados río abajo (Deninger and Drucker, 2001).

En 1998, los estudios clínicos de fase I se iniciaron en tres centros de salud de EUA. La población de estudio incluía a pacientes de LMC en fase crónica que habían sido resistentes a INF α y utilizaron como criterios de respuesta al tratamiento los establecidos por la organización ELN (del inglés European Leukemia Net), que incluyen los siguientes criterios: remisión hematológica completa (CHR), que se refiere a una cuenta leucocitaria normal y desaparición de cualquier síntoma de la enfermedad; respuesta citogenética mayor (MMR), implica que se reduce en 35% las metafases Ph⁺, respuesta citogenética completa (CCR), que implica la ausencia total de metafases Ph⁺; y respuesta molecular completa (CMR), en donde no hay niveles detectables del transcrito de Bcr-Abl. La dosis inicial fue de 25mg de Imatinib al día, pero no se observó respuesta hematológica hasta que la dosis fue incrementada a 300mg al día, con esta dosis el 98% (53/54) de los pacientes tratados presentaron CHR, 13% obtuvieron MMR y 13% CCR. En 1999, en tres centros internacionales iniciaron los estudios clínicos de fase II, además de incluir pacientes en fase crónica resistentes al tratamiento con INF α , también incluía pacientes en crisis blástica. El rango de respuesta hematológica en todos los pacientes tratados con una dosis de 400mg generó CHR hasta en el 95% de los casos, el 41% de ellos presentó CCR y 60% MMR. Los estudios clínicos de fase III que se realizaron a partir de Junio del año 2000, demostraron que el tratamiento con Imatinib es más efectivo comparado con el tratamiento con INF- α , además de generar CHR y CCR en los pacientes, retrasa hasta 18 meses la progresión de la enfermedad de fase crónica a crisis blástica, evento que colocó al imatinib como primera línea de tratamiento para pacientes con LMC alrededor del mundo (Drucker *et al.* 2000; Wassmann *et al.*, 2001; O'Brien *et al.*, 2003).

En el año 2002, se detectó que algunos pacientes no presentaban respuesta hematológica completa y/o remisión citogenética mayor, después de 3 y 6 meses de tratamiento, respectivamente, lo que permitió identificar los primeros casos de resistencia a imatinib, misma que puede ser generada con el

curso del tratamiento o puede presentarse desde el inicio de la enfermedad. Los mecanismos asociados a la resistencia incluyen: 1) Mutaciones en el dominio cinasa de ABL, que se ha reportado del 22 al 55% de los casos y varias de estas mutaciones afectan los residuos que forman los puentes de hidrógeno con Imatinib (Nicholson E and Holyoake H, 2009). 2) Aumento en la expresión de Bcr-Abl, que en algunos casos se debe a la duplicación del cromosoma Ph, mientras que en otros casos está asociado a incrementos en los niveles del transcrito de *bcr-abl*. (Hochhaus *et al.*, 2002). 3) Aumento de la expresión de proteínas transportadoras de fármacos como MDR-1 (del inglés multidrug-resistance gene 1 protein), que favorece la salida de Imatinib del interior al exterior de la célula (Litzow MR, 2006), 4) Reducción de la expresión de proteínas transportadoras de la familia HCAT, involucradas en la entrada de Imatinib a la célula (Gorre ME, *et al.* 2001) y 5) La propia quiescencia de las células troncales, a partir de las cuales se origina la LMC (Holyoake T, *et al.* 2009).

La necesidad de enfrentar la resistencia a Imatinib llevó a explorar el uso de otros fármacos inhibidores de la actividad cinasa de ABL, conocidos como fármacos de segunda generación. Uno de estos fármacos es Dasatinibo BMS-35482 (Sprycel®, Bristol Meyers Squibb) es un inhibidor de la actividad tirosina cinasa de miembros de la familia de SRC y también de C-KIT, PDGFR y de BCR-ABL. Dasatinib es un inhibidor competitivo de ATP y a diferencia de Imatinib, Dasatinib se une a ABL a través de tres puentes de hidrogeno que forma con el sitio de unión al ATP y se puede unir al la conformación activa e inactiva de BCR-ABL, además de unirse a algunas de las formas mutadas. En estudios realizados *in vitro*, Dasatinib no inhibe el crecimiento de progenitores hematopoyéticos de individuos sanos, pero es capaz de inhibir entre el 60-80% el crecimiento de progenitores de individuos con LMC resistentes y no-resistentes a Imatinib (Litzow MR, 2006).

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

En 2010, el estudio clínico fase III o DASISION (del inglés Dasatinib vs Imatinib study in treatment-naive CML patients) que evaluó la eficacia y seguridad de dasatinib en dosis de 100 mg (259 pacientes) o de 400 mg (260 pacientes) como tratamiento de primera línea, mostró mayor eficacia que imatinib a los 12 meses, con el 83% de pacientes en CCR, en relación al 72% en imatinib. La CMR a los 12 meses se presentó en el 46% de los pacientes tratados con dasatinib, mientras que sólo se alcanzó en un 28% de los pacientes del grupo de imatinib (Jabbour E, Kantarjian HM, Saglio G, et al., 2014). Dasatinib fue aprobado en 2006 por la FDA en dosis de 100 mg diarios para pacientes con LMC en fase crónica y 70 mg dos veces al día para pacientes en fase acelerada o crisis blástica.

A pesar del éxito de las terapias con inhibidores de la actividad tirosina cinasa de Bcr-Abl, se ha demostrado en estudios *in vitro* e *in vivo* que no son capaces de eliminar a las CTLs. En el 2005 Chávez-González A, *et al.* demostraron lo anterior en ensayos *in vitro* a partir de células CD34⁺ Lin⁻ de aspirados de médula ósea de pacientes tratados con imatinib o dasatinib (aquellos que presentaron resistencia a imatinib), y que en el momento del estudio presentaban CMR, CHR y CCR. Las células CD34⁺ fueron cultivadas durante 15 días en ausencia de cada uno de los inhibidores, y después de este tiempo se analizó la expresión de Bcr-Abl y, contrario a lo esperado, había niveles detectables del transcrito, sugiriendo que ninguno de los dos tratamiento es capaz de eliminar el total de la CTLs en los pacientes. Por otro lado, también se ha demostrado lo anterior *in vivo* en dos estudios clínicos prospectivos y multicentricos de manera independiente: STIM (del inglés Stop Imatinib) en Francia en el 2010 (Mahon FX, *et al.*, 2011) y TWISTER en Australia en el 2013 (Ross DM, *et al.*, 2013), además otro estudio en curso EURO-SKI (del inglés European Stop Kinase Inhibitor) de la ELN que es llevado a cabo en 10 países diferentes y con resultados preeliminares semejantes (Sweet K and Oehler V., 2013). Los primeros dos estudios propusieron detener el tratamiento con imatinib en dos grupos diferentes de pacientes, 100 pacientes en el estudio STIM y 40 pacientes en el estudio TWISTER, en aquellos pacientes que tuvieran CMR, CHR y CCR durante 2 años ininterrumpidos y ambos estudios obtuvieron resultados semejantes, el 61% de los pacientes presentaron recaída dentro de los 12 primeros meses de interrumpir el tratamiento y el 40%, después de más de dos años de seguimiento, mantuvieron CMR, CHR y CCR. Dentro del estudio TWISTER realizaron PCR de *bcr-abl* del ADN genómico de los pacientes que no tuvieron recaída después de más de dos años de tratamiento y aún estaba presente la clona leucémica, y durante dos años subsecuentes realizaron secuenciación del gen *bcr-abl* y encontraron continuaba acumulando mutaciones. Se ha tratado de encontrar factores biológicos que permitan identificar a aquellos pacientes en los que es

seguro suspender el tratamiento, a la fecha se han asociado la baja expresión en células mononucleares de sangre periférica del miR-148b, que los análisis in silico sugieren que puede estar indirectamente relacionado con la maduración de las células NKs, y también el conteo celular de las mismas (Sweet K and Oehler V., 2013).

Con los resultados anteriores de los estudios in vitro e in vivo se sugiere que el efecto principal de los inhibidores de la actividad tirosina cinasa de BCR-ABL es inhibir la proliferación de las CTLs, pero ninguno de ellos es capaz de eliminarlas, así que cuando es retirado el tratamiento la enfermedad se restablece provocando recaídas, en la mayoría de los pacientes, y/o persistencia de la clona leucémica. A la fecha, no se han identificado las moléculas que participan en el bloqueo de la progresión en el ciclo celular mediada por los inhibidores de la actividad tirosina cinasa de BCR-ABL, pero las moléculas candidatas son aquellas que de manera normal regulan negativamente el ciclo celular, los inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (CDKIs), de las que se distinguen dos familias: INK4a y WAF/KIP.

CICLO CELULAR

El ciclo celular es un término usado para describir una serie de eventos responsables de coordinar la duplicación del material genético y citoplásmico de una generación celular a la siguiente. En células eucarióticas el ciclo celular se divide en cuatro fases denominadas: G_1 , S, G_2 y M. Durante dos de ellas, las células llevan a cabo dos eventos básicos en la división celular: generación de una copia idéntica de su material genético (Fase S o de síntesis) y segregación de los componentes celulares entre las dos células hijas (Fase M o mitosis). Entre la fase S y M existen dos intervalos, G_1 y G_2 (del inglés gap), la fase G_1 , es un intervalo durante el cual la célula es sensible a señales positivas y negativas de factores de crecimiento. La fase G_2 es el intervalo posterior a la fase S durante el cual la célula se prepara para entrar en mitosis. Cuando la proliferación se detiene, debido a señales antimitogénicas o a la ausencia de factores de crecimiento, las células entran a una fase reversible de quiescencia conocida como G_0 .

La progresión a través del ciclo celular está gobernada por la activación y desactivación coordinada de una familia de proteínas heterodiméricas con actividad serina/treoninas cinasa, formada por una subunidad catalítica denominada cinasa dependiente de ciclina (CDK) y otra subunidad reguladora, denominada Ciclina. Los complejos: Ciclina D/CDK4, Ciclina D/CDK6 y Ciclina E/CDK2 regulan la progresión a través de la fase G_1 . El complejo Ciclina A/CDK2 inicia la fase S y el complejo Ciclina B/CDK1 regula la progresión a través de G_2 y el inicio de la mitosis.

Para asegurar que la progresión a través del ciclo celular sea adecuada las células presentan algunos puntos de control que evitan su entrada a la siguiente fase del ciclo celular hasta que no hayan terminado exitosamente la fase previa. Si durante estos puntos de control la célula detecta un evento aberrante o incompleto del ciclo celular, por ejemplo, daño al DNA, se activan moléculas que detienen el ciclo celular hasta que el problema sea resuelto. Dentro de estas proteínas se encuentran los Inhibidores de Cinasas Dependientes de Ciclinas (CDKIs), los cuales pueden detener reversiblemente la progresión del ciclo celular.

Los CDKIs se dividen en las familias INK4a y WAF/KIP, que se pueden unir directamente a las CDKs o a los complejos Ciclina/Cdk inhibiendo su actividad cinasa. La familia INK4a está formada por: p16 (INK4A), p15 (INK4B), p18 (INK4C) y p19 (INK4D), ejercen su efecto asociándose a la subunidad catalítica de las proteínas Cdk4 y Cdk6, actúan únicamente durante la transición de la fase G_1 a S del ciclo celular. La familia WAF/KIP está integrada por p21 (WAF1), p27 (KIP1) y p57 (KIP2), que inhiben la actividad de los

CDKs asociados a las Ciclinas A, D y E, de esta manera son capaces de actuar a través de todo el ciclo celular (Peter, 1997) (Figura 5).

En el caso particular del ciclo celular en las CTHs, se ha descrito que al menos cerca del 90% de éstas se encuentran en las fases G₀/G₁, además tienen ciclos celulares muy largos, que en promedio se llevan a cabo durante 30 días en el ratón bajo condiciones normales (Traycoff, *et al.*, 1994). En células primarias humanas con fenotipo CD34⁺ Lin⁻ de Sangre de Cordón Umbilical (SCU) y de Sangre Periférica Movilizada (SPM), se ha reportado que *in vitro* su tiempo de doblaje es de 33 h y 45h, respectivamente (Alvarado-Moreno A, *et al.*, 2007).

La quiescencia tiene un papel biológico muy importante en la naturaleza de las CTHs, ya que asegura la existencia de un número suficiente de células troncales disponibles para cubrir las demandas hematopoyéticas de un individuo a lo largo de toda su vida (Szilvassy SJ, 2003). Estas características particulares en el ciclo celular y quiescencia de las CTHs requieren la presencia y regulación estricta de la maquinaria del ciclo celular.

p21, tiene un papel predominante en el mantenimiento de la quiescencia de CTH, tanto en ratón como en humano. El modelo de ratón deficiente de p21 (*p21*^{-/-}) demostró que la población está más activa en el ciclo celular y es más sensible al agotamiento a través de trasplantes seriales (Cheng *et al.*, 2000). En células troncales de sangre de cordón umbilical, la expresión de p21 se incrementa al tiempo que las células entran en quiescencia. En el 2003, Scadden y *cols.* demostraron que el silenciamiento de p21 en CTHs de sangre de cordón umbilical resultaba en células más activas en el ciclo celular y también más sensibles al agotamiento después de trasplantes seriales en ratones (Scadden *et al.* 2003).

Por otra parte, una alta expresión de p16 ha sido reportada en CTHs de ratón, además su expresión disminuye conforme progresa su diferenciación a células progenitoras comprometidas a un linaje (Furukawa *et al.*, 2000).

En cuanto a p27, se sabe que el ratón deficiente (*p27*^{-/-}) no ve afectada numéricamente la población de CTH, estado en el ciclo celular y la capacidad de autorrenovación de las CTHs, pero sí está incrementada la tasa de proliferación de progenitores hematopoyéticos más comprometidos, lo que resulta en altas cuentas de células maduras en circulación.

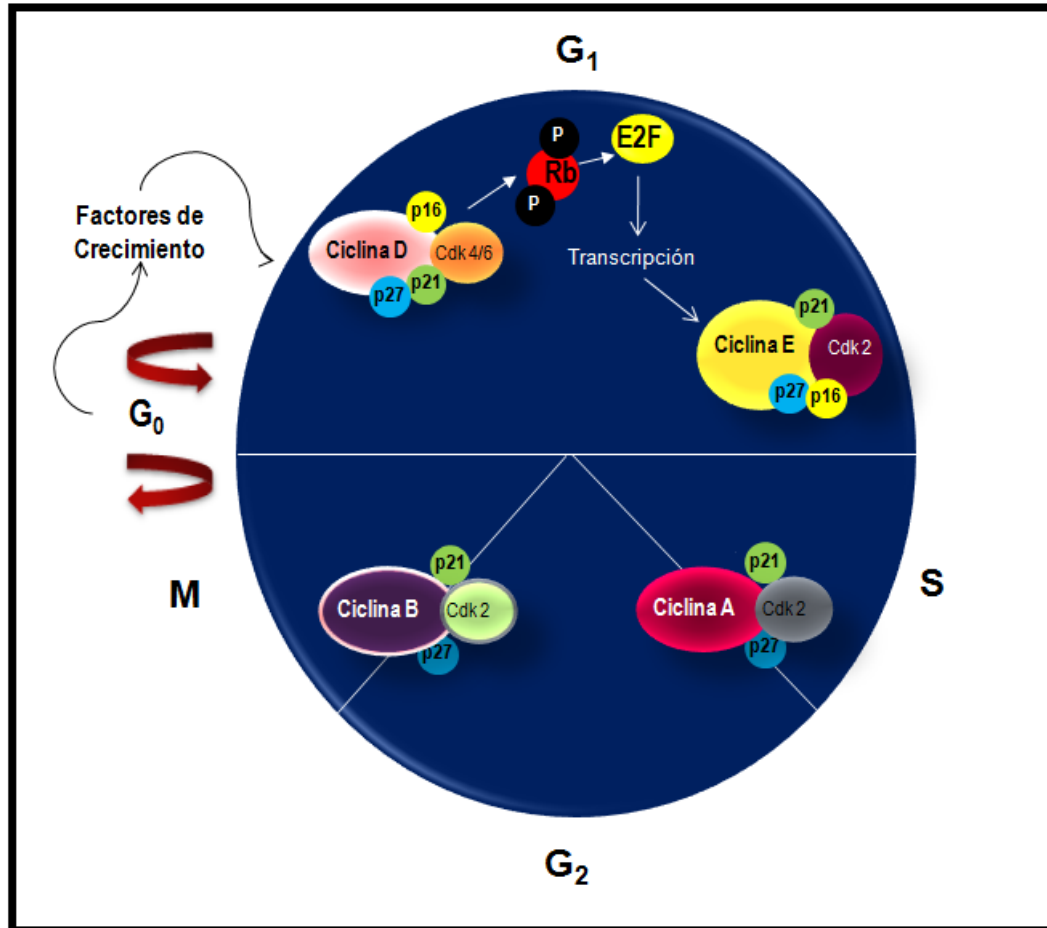


Figura 5. Ciclo celular. Se distinguen cuatro fases: G₁, S, M y G₂. La progresión del ciclo celular está regulada por la formación de complejos heterodiméricos formados por Ciclinas (A, B, D o E) y Cdks (Cdk 2/4/6). Durante la fase G₁, las células dependen del estímulo externo de factores de crecimiento y en presencia de estos las células progresan a través de G₁ para llegar a la fase S, de síntesis de material genético; G₂ es el intervalo entre la culminación de la síntesis de DNA y la mitosis o Fase M. La progresión en el ciclo celular se puede regular negativamente gracias a los CDKIs (p21, p27, p16, etc.), que se pueden unir a los CDKs o directamente a los dímeros CDK/ciclina, inhibiendo su actividad cinasa.

A diferencia de las CTH normales, en las CTLs no hay evidencia contundente que asocie la quiescencia con un patrón de expresión de CDKIs. En 1999, el grupo de Holyoake, aisló de pacientes con LMC una población de LSC altamente quiescente (CD34⁺ Ph⁺, G₀), y demostró que esta población es capaz de recapitular el fenotipo leucémico en ratones letalmente irradiados, y dicho fenotipo se mantiene a través de trasplantes seriales (Holyoake T, *et al.*, 1999). En líneas celulares Ph⁺ se ha reportado que existe baja

expresión de p27, debido a un aumento de su degradación (Tomoda K, *et al.*, 2005). No obstante, en células primarias CD34⁺ de LMC se han reportado altos niveles proteicos de p27 en el citoplasma, lo que da como consecuencia la pérdida de su función como regulador del ciclo celular. Así mismo, se ha reportado que BCR-ABL favorece la retención de p27 en citoplasma a través de proteínas de andamiaje, como CRKL y GAB2, que a su vez activan la vía de PI3k y Akt, esta última es capaz de fosforilar a p27 (Thr 157), evitando su translocación al núcleo (Figura 4). Sin embargo, al bloquear la actividad de Bcr-Abl se reducen los niveles de p27 y favorecen su localización nuclear (Chu S, *et al.*, 2010) (Figura 6).

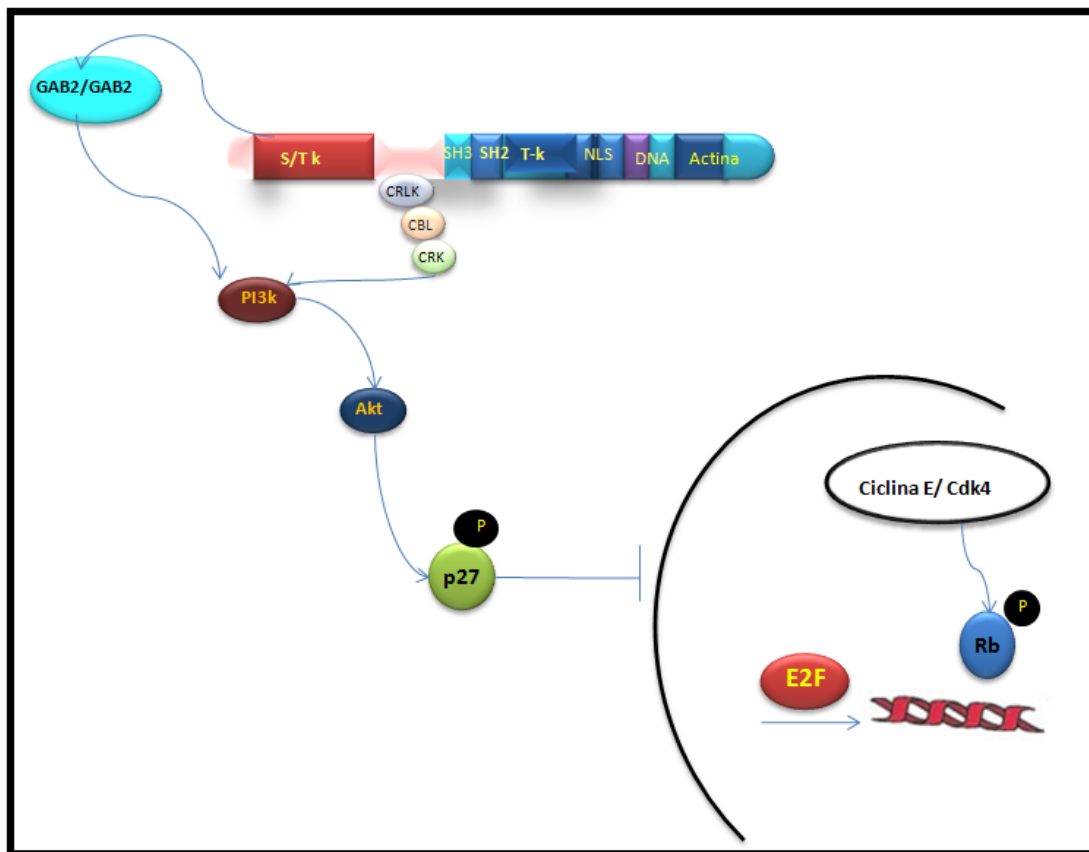


Figura 6. En células CD34⁺ de LMC el regulador p27 se encuentra retenido en citoplasma.

No obstante la información anterior y conociendo que las CTL en la LMC no pueden eliminarse después del tratamiento con los ITK aparentemente por un permanente estado de quiescencia, los mecanismos que regulan dicha permanencia no han sido evaluados por lo que en este trabajo se tiene particular interés en

determinar en qué fase del ciclo celular se encuentran las CTLs en LMC y cuáles son las moléculas relacionadas con la inhibición de la proliferación inducida por imatinib y dasatinib.

JUSTIFICACIÓN

Los inhibidores de la actividad cinasa de Bcr-Abl, Imatinib y Dasatinib son capaces de inhibir la proliferación de CTLs de sujetos con LMC. Sin embargo, eventos celulares relacionados a la quiescencia de las células troncales han limitado la eliminación de la enfermedad desde su origen, razón por la cual, es importante determinar cuáles son las moléculas reguladoras del ciclo celular que se involucran con la permanencia de las células troncales y como es que agentes como Imatinib y Dasatinib las regulan.

En este sentido y conociendo que durante la quiescencia las células permanecen en las fases G_0/G_1 del ciclo celular, los principales candidatos a analizar son los Inhibidores de cinasa dependientes de ciclina que tienen como función principal evitar la formación de los complejos ciclina-cdk, bloqueando con ello el tránsito a través del ciclo.

HIPÓTESIS

En células troncales y progenitoras hematopoyéticas de LMC, los niveles de CDKIs (p21, p27, p57, p18 y p19) que participan en la transición de la fase G_0/G_1 a S del ciclo celular estarán reducidos, y esto se verá reflejado en el incremento del número celular característico de la enfermedad. Sin embargo, al inhibir la actividad tirosina cinasa de Bcr-Abl con Imatinib y/o Dasatinib, se promoverá el aumento en la concentración y/o actividad de dichos inhibidores favoreciendo su localización nuclear y en consecuencia una reducción en la proliferación leucémica.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la participación de los Inhibidores de Cinasas Dependientes de Ciclinas (CDKIs) en la inhibición de la proliferación mediada por fármacos antineoplásicos, Imatinib y Dasatinib, en Células Primitivas Hematopoyéticas provenientes de pacientes con LMC.

OBJETIVOS PARTICULARES

En líneas celulares de LMC, K562 y MEG-01, y en células primitivas (CD34⁺Lin⁻) de sujetos hematológicamente sanos, evaluar el efecto de Imatinib y Dasatinib sobre:

- Proliferación.
- Estado en el ciclo celular.
- Expresión de los Inhibidores de Cinasas Dependientes de Ciclinas (CDKIs).
- Localización celular de cada uno de los Inhibidores de Cinasas Dependientes de Ciclinas (CDKIs).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Pacientes y Obtención de Muestras.

Las muestras de Leucemia Mieloide Crónica (LMC) y de Médula Ósea Normal (MON) fueron colectadas de acuerdo con los lineamientos institucionales aprobados por las comisiones de ética en los Hospitales Centro Médico Nacional La Raza y Hospital General de Zona No. 2 de Villacoapa. Las muestras de MON se obtuvieron de individuos hematológicamente sanos que fueron sometidos a un procedimiento quirúrgico de cadera y con una edad de 50-60 años. Las muestras de LMC sin tratamiento, se obtuvieron de pacientes con diagnóstico reciente en fase crónica de la enfermedad y positivos molecularmente para la translocación Bcr-Abl. En todos en los casos, las muestras fuerin tomadas con previo consentimiento informado del paciente y en estricto apego de la declaración de Helsinki, el código de Nuremberg y al reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación.

2. Obtención de Células Primitivas Hematopoyéticas.

Las células mononucleares de baja densidad fuerin obtenidas mediante gradiente de Ficoll (Pharmacia Biotech), resuspendidas en PBS (Gibco) suplementado al 3% de suero fetal bovino (Gibco), posteriormente se obtuvieron mediante columnas de inmunoselección negativa una población enriquecida en células primitivas hematopoyéticas (CD34⁺ CD38⁺ Lin⁻).

3. Línea Celular.

Dos líneas celulares humanas de leucemia mieloide crónica fueron utilizadas: la línea ceular K562 (eritroblastica) y MEG-01 (Megacrioblástica).

4. Tratamiento *in vitro* de Líneas Celulares de LMC y Células Primitivas Hematopoyéticas.

Las líneas celulares K562 y MEG-01 y Llas células primitivas hematopoyéticas (CD34⁺ CD38⁺ Lin⁻) fueron cultivadas durante 48 horas con diferentes concentraciones de Imatinib o Dasatinib. Las primitivas hematopoyéticas fuerin cultivadas en medio Stem Line suplementado con ocho citocinas: Factor de Células Seminales (SCF, 10 ng/ml), IL-6 (10 ng/ml), IL-3 (10 ng/ml), Eritopoyetina (EPO, 10 ng/ml), Trombopoyetina (TPO, 10 ng/ml), Ligando de Tirosina Fetal 3 (Flt3 L, 10 ng/ml), Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos-Monocitos (GM-CSF, 10 ng/ml), Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos (G-CSF, 10

ng/ml). A partir de estos cultivos se evaluó: proliferación, estado en el ciclo celular, expresión, localización celular e interacción con complejos Ciclina/Cdks.

5. Proliferación

Cada uno de los tipos celulares usados en este trabajo se marcaron con CFSE (Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester), en 1 ml de PBS se adicionaron 10 μ L de CFSE (200 μ M) durante 20 min a 37°C, finalmente se realizaron dos lavados con PBS al 3% de SFB para retirar el excedente de CFSE y se cultivaron en las condiciones antes mencionadas. Después de transcurridas las 48 h de cultivo, serán analizadas por citometría de flujo (BD Calibur).

6. Estado en el Ciclo Celular.

Después de transcurridas las 48 h de cultivo, para determinar el estado en el ciclo celular de las líneas celulares y de las células primitivas hematopoyéticas, se evaluó a través de la incorporación de 7-AAD (BD Bioscience) y la tinción con un anticuerpo anti KI-67Alexsa Fluor 488 (BD Bioscience). Las células se incubarán en una dilución 1:50 a durante 50 min, finalmente se analizaron por citometría de flujo (BD FACS Aria).

7. Analisis de Expresion de los CDKIs.

El análisis de expresión a través de PCR en punto final fue realizado en las líneas celulares después del tratamiento con Imatinib o dasatinib. Se hizo la extracción del ARN total a partir de las células con TriPure (Roche) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. La concentración y pureza del ARN obtenido fue validado a través de espectrofotometría. El ADN complementario fue sintetizado a partir de 1 μ g de ARN, usando M-MLVRT (del inglés Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase). Las condiciones de PCR que se utilizaron son: 96°C durante 5 min, después 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30s; 60°C durante 1 min para el anileamiento, 72°C durante 1 min para la extensión. Los primers utilizados para detectar cada uno de los CDKIs son:

Gene	Secuencia
p18	(+) CATCATGCTGCCTGGTTAGG

	(-) GCTGGCCGTGTGCTTCACCA
p21	(+) AGCTCAATGGACTGGAAGGG (-) GAGCTGGAAGGTGTTTGGGG
p27	(+)CGGGGTATGAAGAGCTTGCTTTGAT (-) AACATTCAAACTCCCAAGCACCTC
p57	(+) GATCAAGAAGCTGTCCGGGC (-) TTGCTGCTACATGAACGGTCC
18s	(+) AAT CCA CGC CAG TAC AAG ATC CCA (-) TTT CTT CTT GGA CAC ACC CAC GGT

Diez microlitros del producto de cada reacción fue separado electroforéticamente en geles de agarosa al 1% para posteriormente realizar el análisis densitométrico con el software Image J.

8. Tinción Intracelular

Para determinar el nivel proteico de cada CDKI (p21, p27, p57, p18 y p19), fue necesario permeabilizar y fijar las células primitivas hematopoyéticas después de las 48h de tratamiento con Imatinib o Dasatinib. Se realizará de acuerdo a una modificación en la técnica de BrdU Flow Kits (BD Bioscience), posteriormente se incubará con anticuerpos contra: p21 (Santa Cruz), p27 (Santa Cruz), p57 (Cell Signaling), p18 (Cell Signaling) y p19 (Cell Signaling), durante 30 min a 4°C y se analizaron por citometría de flujo (BD FACS Calibur).

9. Inmunofluorescencia.

Para evaluar localización celular de cada uno de los CDKIs (p21, p27, p57, p18 y p19) se fijaron 10, 000 células con Paraformaldehído (4%) en laminillas (Sigma Aldrich) . Una vez fijadas las células se permeabilizaron con tritón (0.4%) durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron durante 1h con BSA (0.01 g/mL), para evitar uniones inespecíficas. El anticuerpo primario se incubó durante toda la noche a 4°C (1:100), el excedente de anticuerpo se retiraron con tres lavados de PBS. El anticuerpo secundario se dejará incubando 1h a 4°C (1:100), la contratinción se realizó con DAPI y

finalmente se colocará el cubreobjetos con Vectashield. Las laminillas se analizarán en un microscopio confocal.

RESULTADOS

Desde hace más de una década han sido empleados los inhibidores de tirosina cinsas, dastinib e imatinib, para el tratamiento de la LMC pero, como se mencionó anteriormente, los inhibidores de cinasas no son capaces de eliminar a la población de células troncales leucémicas, responsables del origen y recaídas de la LMC, y posiblemente actúen inhibiendo la proliferación de las CTLs. Este trabajo parte de la hipótesis que al inhibir la actividad tirosina cinasa de BCR-ABL, con imatinib o dasatinib, se modifica la expresión, el nivel proteico y/o la localización subcelular de las moléculas que son posibles candidatas, aquellas que de manera normal regulan negativamente la proliferación celular, los CDKIs y tiene como consecuencia la inhibición, de manera selectiva, de la proliferación celular de las CTLs y su efecto biológico es el restablecimiento de cuentas leucocitarias a valores normales en los pacientes durante el tratamiento con alguno de estos fármacos.

Para demostrar nuestra hipótesis, lo primero que fue necesario corroborar es que los inhibidores de tirosina cinasa inhiben la proliferación específicamente de células de LMC.

1. Los inhibidores de la actividad tirosina cinasa de BCR-ABL reducen la viabilidad y retrasan la proliferación de células leucémicas.

Para evaluar el efecto de los inhibidores de BCR-ABL sobre la viabilidad y proliferación de células leucémicas, se utilizaron dos líneas celulares de LMC, correspondientes a la fase de crisis blástica: K562 (eritroblástica) y MEG-01 (megacarioblástica). Como control normal se utilizaron células primitivas hematopoyéticas (enriquecidas en la fracción CD34⁺ Lin⁻) obtenidas a partir de médula ósea de sujetos hematológicamente sanos (MON).

Con el objetivo de evaluar el efecto *in vitro* de los inhibidores de BCR-ABL, imatinib y dasatinib, sobre la proliferación celular después de 48 horas (48h) y con diferentes concentraciones de cada uno de los fármacos, las células se incubaron con CFDA (del inglés Carboxyfluorescein diacetate succinimidylester), como se describe en la metodología. El CFDA entra por difusión a las células y una vez

dentro de ellas es modificado por esterasas celulares a CFSE (del inglés Carboxyfluorescein succinimidyl ester), es una molécula fluorescente que se une de manera covalente al extremo amino terminal de las proteínas y permanece dentro de la célula. Este colorante permite evaluar la proliferación de las células porque durante la división celular los componentes celulares se distribuyen entre las dos células hijas, incluyendo aquellas proteínas marcadas con CFSE, es decir, las células que proliferan pierden fluorescencia (Qeah BJC and Parish CR, 2010). Después de la tinción con CFSE, las células fueron cultivadas en una densidad de 200, 000 células/pozo durante 48h con diferentes concentraciones de dasatinib (5, 10, 50, 100 y 150 nM) e imatinib (0.5, 1, 2.5, 5 y 10 μ M). Después de este tiempo, las células se tiñeron con 7-AAD (7-Actinomicina D) para evaluar su viabilidad y finalmente se analizaron mediante citometría de flujo.

En la Fig. 7 se muestra un dot plot representativo del análisis de viabilidad realizado para cada tipo celular, marcando en un recuadro la población positiva para 7-AAD, es decir células no-viables. Los resultados indican que en células CD34⁺ Lin⁻ de sujetos hematológicamente sanos se incrementa el porcentaje de células no-viables de 5% (SEM \pm 3) en el control, sin tratamiento, a 17% (SEM \pm 10) con la concentración máxima de dasatinib (150nM) (Fig. 7A), y al 9% (SEM \pm 7) con la concentración máxima de imatinib (10 μ M) (Fig. 7B), mientras que la fracción de células no-viables en la línea celular K562 se incrementa del 6% (SEM \pm 4) en el control, al 33.5% (SEM \pm 5) con tres de las concentraciones de cada uno de los inhibidores; 2.5, 5 y 10 μ M de imatinib y 50, 100 y 150nM. En el caso de la línea celular MEG-01, el porcentaje de células no-viables se incrementó del 2% (SEM \pm 4) en el control al 22.5% (SEM \pm 6) con tres de las concentraciones de cada uno de los inhibidores; 2.5, 5 y 10 μ M de imatinib y 50, 100 y 150nM de dasatinib.

El incremento en el porcentaje de la población no-viable, en ambas líneas celulares, llega a su nivel máximo con la concentración de 2.5 μ M de imatinib y de 50nM de dasatinib y no incrementa con concentraciones mayores, evento que posiblemente se asocie con un desbalance entre la salida y entrada de los fármacos a la célula, ya que se ha reportado que en células CD34⁺ de pacientes con LMC y en líneas celulares de LMC, incluyendo la K562 y MEG01, se sobreexpresan los transportadores ABCB1 y ABCG2 (del inglés ATP-binding transporters) que participan en la salida de imatinib y dasatinib del interior de la célula, además de que existe una disminución en la expresión del transportador que participa en la entrada de los fármacos a la célula, OCT1 (del inglés Organic CationTransporter 1). Sin embargo, este

transportador no es el único que participa en este evento, ya que se ha reportado que las células CD34⁺ de pacientes con LMC expresan, al menos, 20 miembros de la familia de transportadores SCL (del inglés solute carrier) (Giannoudis A, et al., 2008; Dohse M, et al., 2010).

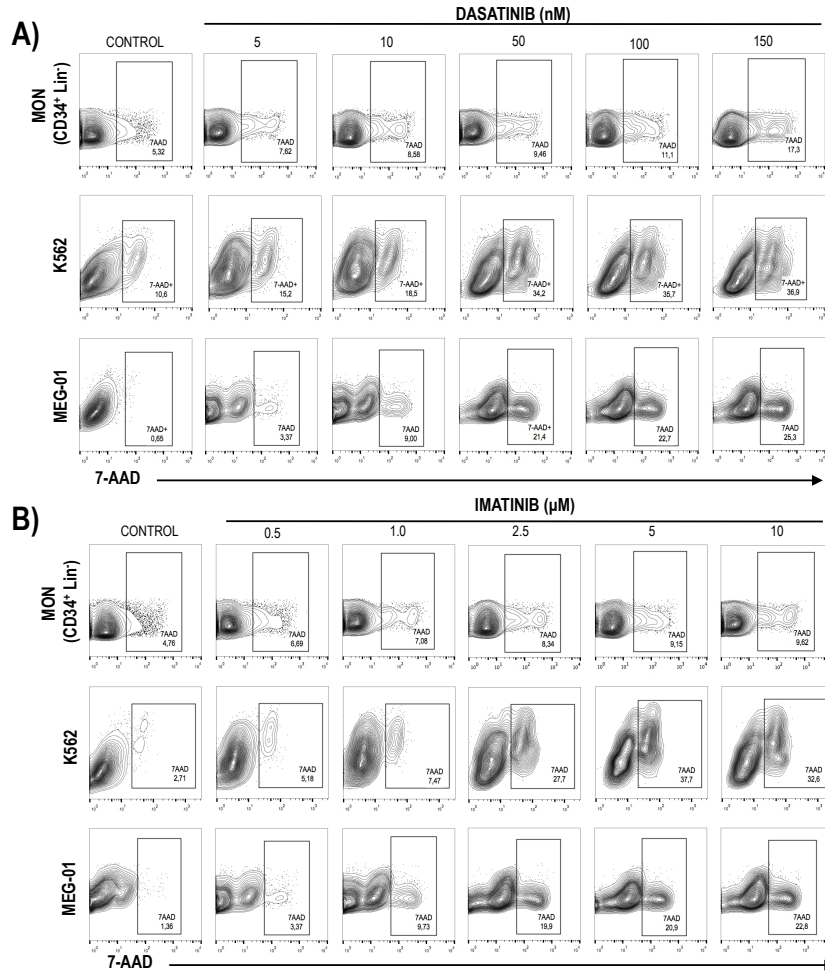


Figura 7. Imatinib y Dasatinib reducen la viabilidad celular en líneas celulares de LMC. Líneas celulares de LMC: K562 y MEG01 así como células primitivas CD34⁺ Lin⁻ de MON fueron cultivadas por 48 horas en ausencia (Control) o presencia de (A) Dasatinib (5, 10, 50, 100 y 150 nM) o Imatinib (0.5, 1, 2.5, 5 y 10 μM). Posterior a este tiempo se evaluó la viabilidad celular a través de la incorporación de 7-AAD mediante citometría de flujo y el resultado muestra una figura representativa del análisis.

Considerando el total de muestras normales procesadas (n=8) y experimentos realizados por duplicado, el análisis estadístico (ANOVA de una vía, $p=0.01$) demostró que no hay cambio significativo en el porcentaje de células viables cuando se cultivan con dasatinib (Fig. 8A) o imatinib (Fig. 8B), por lo contrario células leucémicas, considerando el total de experimento independientes (n=5) realizados por duplicado y el análisis estadístico correspondiente (ANOVA de una vía, $p=0.01$), demostró que existe una reducción significativa en el porcentaje de células viables cuando se cultivan presencia de dasatinib (Figura 8A) o imatinib (Figura 8B).

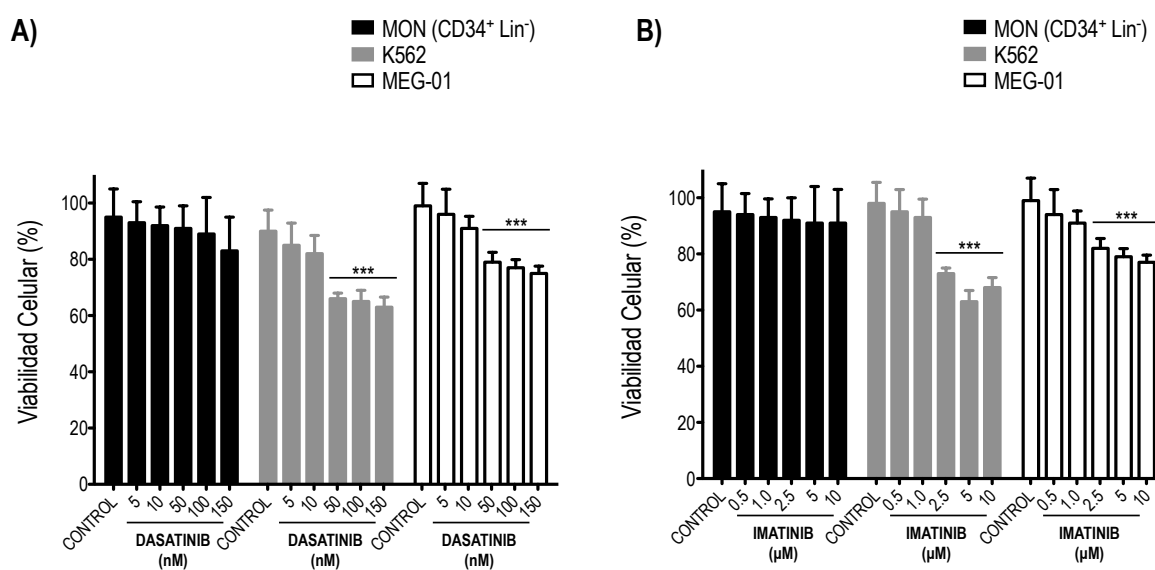


Figura 8. Imatinib y Dasatinib reducen la viabilidad celular en líneas celulares de LMC. Líneas celulares de LMC: K562 (n=5) y MEG01 (n=5) así como células primitivas CD34⁺ Lin⁻ de MON (n=8) fueron cultivadas por 48 horas en ausencia (Control) o presencia de (A) Dasatinib (5, 10, 50, 100 y 150 nM) o Imatinib (0.5, 1, 2.5, 5 y 10 μM) para posteriormente evaluar la viabilidad celular a través de la incorporación de 7-AAD mediante citometría de flujo y calcular el porcentaje de viabilidad con relación a su respectivo control sin tratamiento. El resultado representa el promedio ± SEM de los diferentes experimentos. (ANOVA de una vía, *** $p=0.01$).

Para el análisis de proliferación celular, evaluado como una medida de retención de CFSE, en respuesta a ambos inhibidores, se analizó únicamente la población que permaneció viable, 7-AAD negativa, y en la Fig. 9 se muestra un histograma representativo de cada uno de los tipos celulares analizados después de 48h de cultivo con dasatinib (Fig. 9A) o imatinib (Fig. 9B). El resultado

demuestra que las células CD34⁺ Lin⁻ de MON, no tienen cambio estadísticamente significativo en su proliferación, de tal manera que las concentraciones que se utilizaron fueron ideales para inhibir exclusivamente la actividad tirosina cinasa de BCR-ABL y no de otras cinasas, que también son blanco de dasatinib o imatinib y que son esenciales en el mantenimiento de la hematopoyesis normal como: c-kit y PDGF-R (del inglés Platelet-derived growth factor receptor). En cambio, en las células leucémicas, K562 y MEG-01, hay una notable reducción en su proliferación desde la concentración de 50nM de dasatinib y 2.5 μ M de imatinib misma que se mantiene con concentraciones mayores de cada uno de los fármacos.

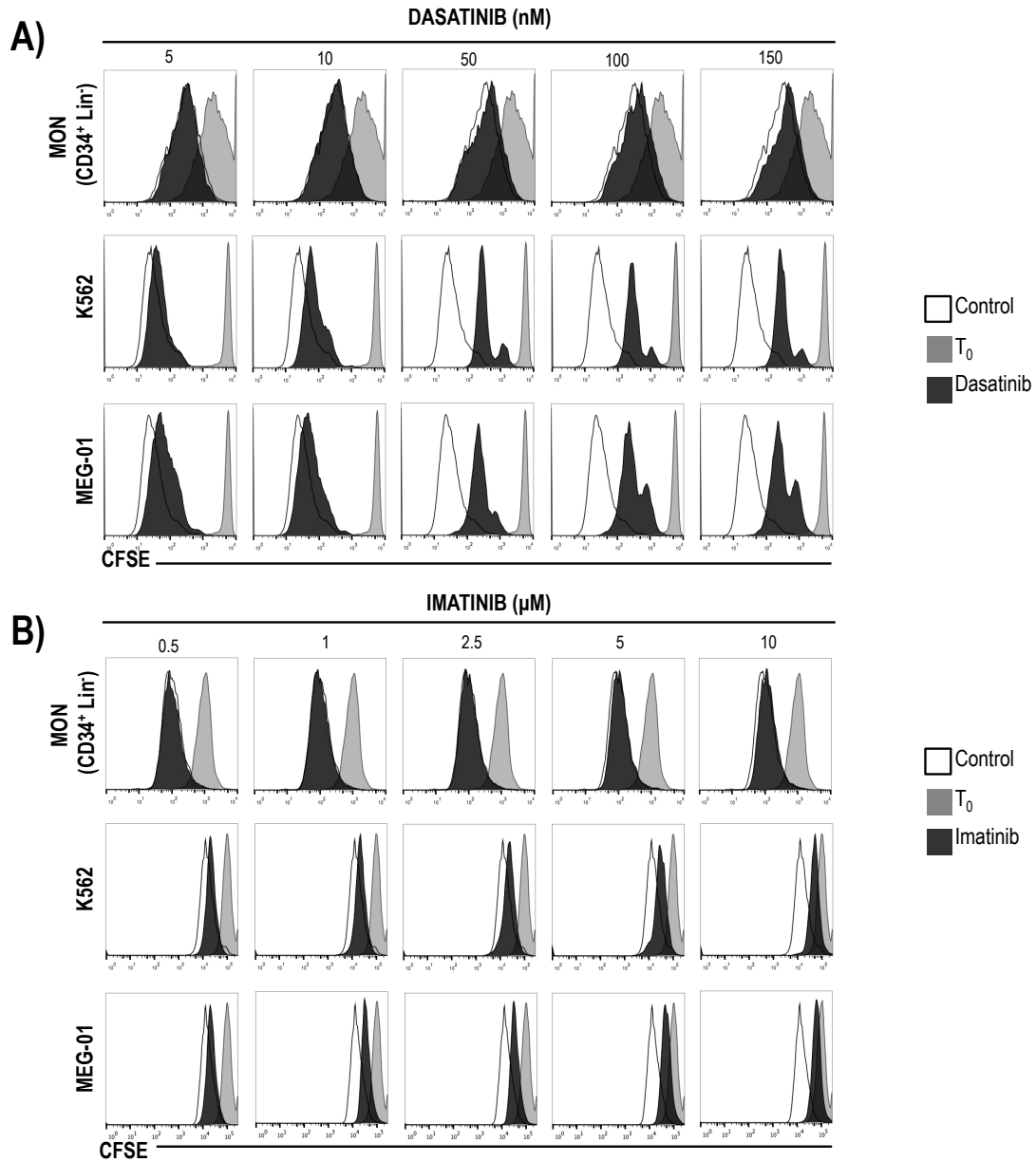


Figura 9. Imatinib y Dasatinib reducen la proliferación en líneas celulares de LMC. Líneas celulares de LMC: K562 y MEG01 así como células primitivas CD34⁺ Lin⁻ de MON fueron cultivadas por 48 horas en ausencia (Control) o presencia de (A) Dasatinib (5, 10, 50, 100 y 150 nM) o Imatinib (0.5, 1, 2.5, 5 y 10 μM). Posterior a este tiempo las células viables (7AAD negativas) fueron analizadas de acuerdo a su contenido de CFSE y comparadas con su correspondiente control en tiempo cero. El resultado muestra una figura representativa del análisis.

De la misma manera, al considerar el total de experimentos realizados para cada uno de los tipos celulares y evaluar el índice de proliferación, que representa la relación entre el número total de divisiones celulares y el número de células que se dividieron (Flowjo 10.6), se observa que no hay una diferencia significativa en las células CD34⁺ Lin⁻ de MON cultivadas con dasatinib (Fig. 10A) o imatinib (Fig. 10B), mientras que en las líneas celulares de LMC, K562 y MEG01, sí hay una reducción significativa, detectando que con dasatinib en el índice de proliferación de K562 se reduce de 1.8 (SEM±0.3) en el control a 1.0 (SEM±0.09) y en MEG-01 de 2.3 (SEM±0.3) en el control a 1 (SEM±0.2). Así mismo, el tratamiento con imatinib conduce a una reducción en índice de de 1.8 (SEM±0.25) en el control a 1.3 (SEM±0.3) en K562 y de 2.3 (SEM±0.3) a 1.3 (SEM±0.15) en MEG-01. La reducción en el índice de proliferación tiene una tendencia a ser mayor con dasatinib que con imatinib y esto puede asociarse a que dasatinib es un inhibidor dual, porque no sólo inhibe la actividad tirosina cinasa de BCR-ABL sino también la actividad tirosina cinasa de miembros de la familia de SCR, que previamente han mostrado tener actividad incrementada en LMC, por lo que la inhibición de la actividad de miembros de esta familia con dasatinib también puede estar contribuyendo al retraso en la proliferación celular de células leucémicas.

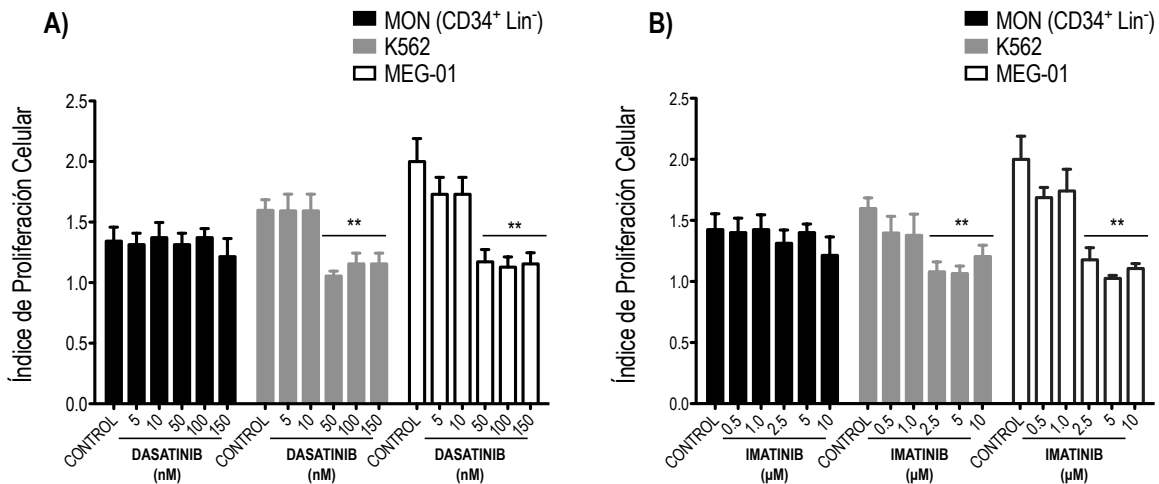


Figura 10. Imatinib y Dasatinib reducen la proliferación en líneas celulares de LMC. Líneas celulares de LMC: K562 (n=5) y MEG01 (n=5) así como células primitivas CD34⁺ Lin⁻ de MO (n=8) fueron cultivadas por 48 horas en ausencia (Control) o presencia de (A) Dasatinib (5, 10, 50, 100 y 150 nM) o Imatinib (0.5, 1, 2.5, 5 y 10 μM). Posterior a este tiempo las células viables (7AAD negativas) fueron analizadas de acuerdo a su contenido de CFSE y comparadas con su correspondiente control en tiempo cero. El resultado muestra el promedio ± SEM del índice de proliferación (número total de divisiones celulares/número de células que se dividieron) de los diferentes experimentos. (ANOVA de una vía, ***p=0.01)

Estos resultados demuestran que inhibir la actividad tirosina de BCR-ABL *in vitro* con dasatinib o imatinib, reduce la viabilidad celular de manera significativa y exclusiva en células leucémicas y no en su contraparte normal y aunque en estos experimentos fueron empleadas líneas celulares de LMC en donde existe una gran heterogeneidad en la población y no se ha descrito una población troncal leucémica, si existe una fracción de la población que es dependiente de la actividad tirosina cinasa de BCR-ABL y muere durante el tratamiento *in vitro* con dasatinib o imatinib. Por otro lado, se encuentra una fracción de la población que es independiente de la actividad tirosina cinasa de BCR-ABL en donde el tratamiento con dasatinib o imatinib tiene como efecto biológico la inhibición de su proliferación, por lo que el siguiente punto de análisis fue determinar en qué fase del ciclo celular dicha población leucémica se encontraba arrestada.

2. Los inhibidores de la actividad tirosina cinasa de BCR-ABL arrestan en las fases G_0/G_1 a las células leucémicas.

A partir de los resultados anteriores de los ensayos de viabilidad y proliferación *in vitro* se observó cambios estadísticamente significativos para estos parámetros a partir de la concentración de $2.5\mu\text{M}$ de imatinib y 100nM de dasatinib, se consideró trabajar únicamente con estas concentraciones para experimentos posteriores.

Para evaluar en qué fase del ciclo celular se arrestaban la población de células leucémicas después del tratamiento *in vitro* con dasatinib o imatinib, las células cultivadas fueron sometidas a un gradiente de ficoll para descarta células muertas y/o restos celulares. Las células recuperadas, se fijaron, permeabilizaron e incubaron con el anticuerpo anti KI-67 Alexa Fluor 488 y 7-AAD, como se especifica en la metodología, y finalmente se analizaron en el citometro de flujo. KI-67 es una proteína que, de acuerdo al contenido de ADN, se utiliza como marcador de proliferación porque se expresa en las fases activas del ciclo celular; G_1 , S, G_2 y M. Durante la interfase (G_1 , S y G_2), KI-67 se localiza en el núcleo y durante la mitosis se asocia a los cromosomas.

Las células primitivas de MON que fueron tratadas *in vitro* con dasatinib o imatinib (Fig 11), hay un cambio en la distribución en las fases del ciclo celular comparadas con el control. Se reduce el porcentaje de células de las fases G_0/G_1 de 22% (SEM \pm 8) a 12% (SEM \pm 5) con dasatinib o imatinib, y se incrementa el porcentaje de células en fase S y G_2 , de 72% (SEM \pm 6) a 84% (SEM \pm 5). En contraste, las células leucémicas tratadas *in vitro* con dasatinib o imatinib, mostraron un incremento en el porcentaje de células en fase G_0/G_1 : en K562 hubo un incremento del 14% (SEM \pm 3) en el control, al 60% (SEM \pm 8) y en MEG-01 del 50% (SEM \pm 8) en el control, al 80% (SEM \pm 6).

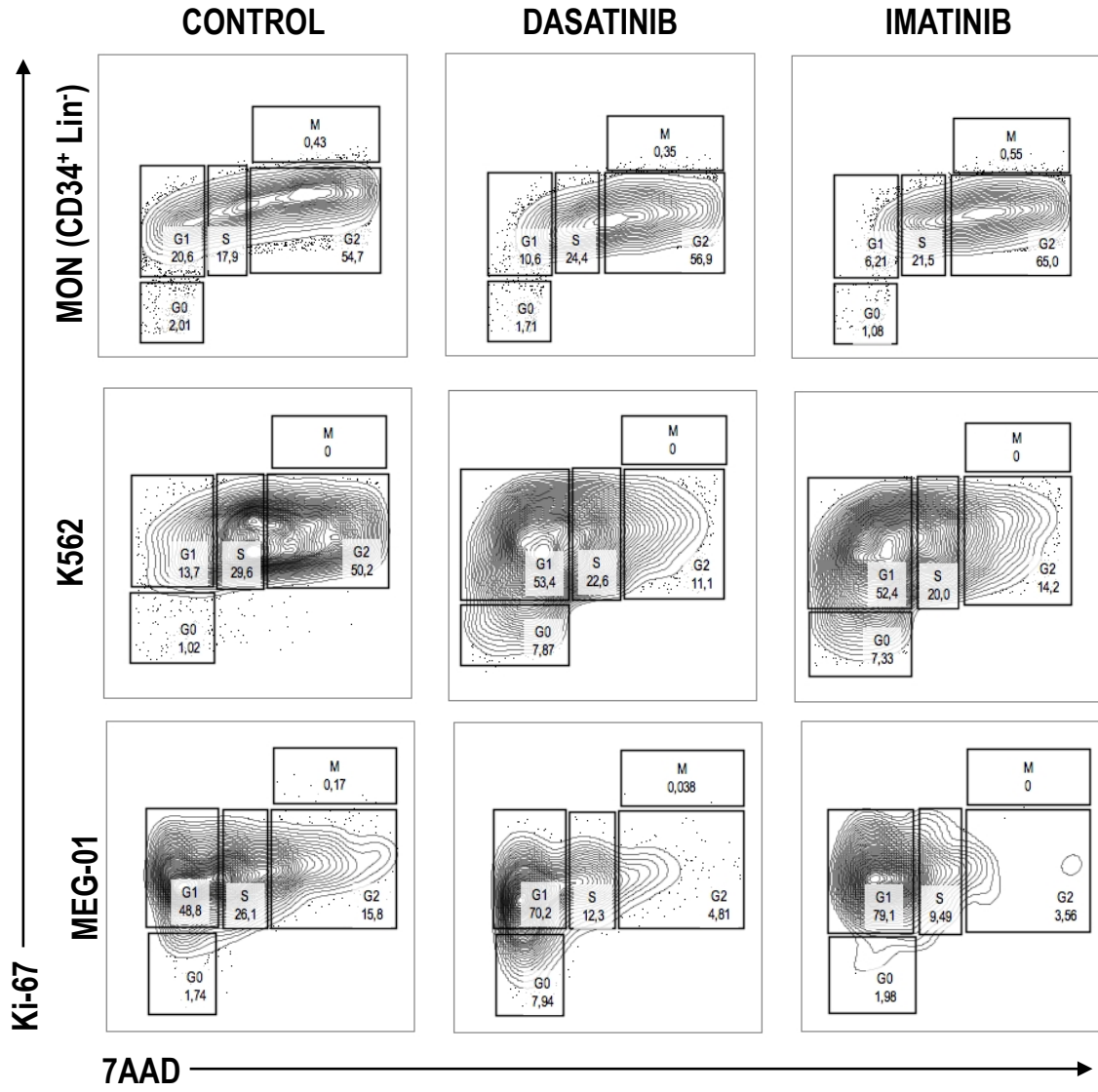


Figura 11. Imatinib y Dasatinib arrestan en la fase G₀/G₁ del ciclo celular a células leucémicas. Líneas celulares de LMC: K562 y MEG01, así como células primitivas CD34⁺ Lin⁻ de MON fueron cultivadas por 48 horas en ausencia (Control) o presencia de Dasatinib (100nM) o Imatinib (2.5μM), después de ese tiempo se evaluó el estado en el ciclo celular mediante el análisis del nivel proteico de KI-67 versus el contenido de ADN (7-AAD). El resultado muestra una figura representativa del respectivo análisis.

Cuando se analizó estadísticamente el total de muestra procesadas (n=3) y experimentos independientes (ANOVA de dos vías, $p=0.1$), el cambio en la distribución en las fases del ciclo celular para células normales no es significativo, mientras que para las células leucémicas existe un incremento

significativo de la fase G_0/G_1 a expensas de la reducción del porcentaje de células que están en la fase G_2 (Fig.12A).

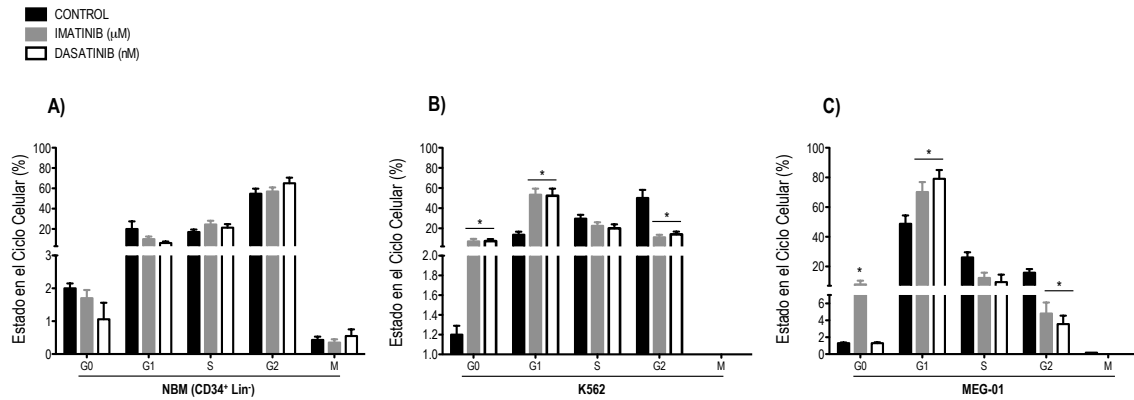


Figura 12. Imatinib y Dasatinib arrestan en la fase G_0/G_1 del ciclo celular a células de LMC. Líneas celulares de LMC: A) K562 (n=3) y B) MEG01 (n=3) así como C) células primitivas $CD34^+$ Lin⁻ de MON (n=3) fueron cultivadas por 48 horas en ausencia (Control) o presencia de Dasatinib (100nM) o Imatinib (2.5μM), después de ese tiempo se evaluó el estado en el ciclo celular mediante el análisis del nivel proteico de KI-67 versus el contenido de ADN (7-AAD). El resultado muestra el promedio \pm SEM del porcentaje de las diferentes fases del ciclo celular de los respectivos experimentos. (ANOVA de una vía, * $p=0.1$).

Estos resultados demuestran que el tratamiento *in vitro* con imatinib y dasatinib, inhiben la proliferación de la población celular que no es dependiente de la actividad de BCR-ABL y la arresta en las fases G_0/G_1 del ciclo celular, por lo que nuestro siguiente punto de interés fue conocer qué moléculas podrían estar mediando este arresto. Las principales moléculas candidatas fueron los CDKIs, ya que de manera normal regulan negativamente la progresión a lo largo del ciclo celular y posiblemente alguno de los efectos de inhibir la actividad de BCR-ABL es; incremento en su expresión, incremento en su nivel proteico y/o cambio en su localización subcelular. Considerando que el arresto en células leucémicas es en las fases G_0/G_1 , que de manera normal miembros de ambas familias de CDKIs: INK4a y WAF/KIP, bloquean la progresión en esta fase al inhibir la actividad del complejo Ciclina D/Cdk 4 o 6, fue necesario evaluar algún cambio en la expresión (ARNm) y/o en el nivel proteico de algunos miembros de ambas familias de CDKIs.

3. Los inhibidores de la actividad tirosina cinasa de BCR-ABL reducen los niveles proteicos de p18 y p57.

El análisis de la expresión de los CDKIs se realizó de manera semicuantitativa, se evaluó los productos de PCR en punto final para cada CDKI, después de 48h de tratamiento *in vitro* con imatinib o dasatinib. Las células obtenidas después de los cultivos, fueron lavadas y la extracción, RT-PCR y PCR se realizaron como se describe en la metodología. Los miembros de cada una de las familias que se analizaron se eligieron con base en lo reportado previamente en malignidades hematológicas, incluyendo líneas celulares de LMC y en células mononucleares de pacientes con LMC, entre las diversas alteraciones cromosómicas que se han reportado se encuentran la pérdida del brazo corto del cromosoma 9, región en donde se localizan los genes *p16* y *p15*. Además, también se ha reportado la pérdida de la expresión de *p53* debido a la pérdida del brazo corto del cromosoma 17, región donde se encuentra este gen, o debido a la hipermetilación de su promotor; *p53* es el factor de transcripción que tiene un papel principal en regular positivamente la expresión de *p21* en respuesta del daño al ADN, pero a pesar de esto se ha reportado que sí hay expresión de *p21* en células leucémicas (Taniguchi T, et al., 1999).

Considerando lo anterior, en este trabajo se analizó la expresión de: *p18*, *p19*, *p21*, *p27* y *p57*. En la Fig. 13A se muestra una imagen representativa (n=3) de los productos de PCR correspondientes a de cada uno de los genes analizados en las líneas celulares, MEG-01 y K562, después de tratamiento *in vitro* con imatinib o dasatinib, donde se observa que no hay un cambio aparente en los niveles de ARN mensajero comparado con el control. Cuando el resultado de la expresión de cada CDKI se normalizó con respecto a la expresión de la subunidad ribosomal 18 (18s) y se realizó el correspondiente análisis semicuantitativo y estadístico (ANOVA de dos vías, $p=0.01$), se demostró que la expresión relativa de los dos miembros de la familia de los INK4 analizados, *p18* y *p19*, no se modifica y mantiene valores cercanos a 1 (SEM \pm 0.25) para *p18* y en 1.5 (SEM \pm 0.3) para *p19*. En el caso de los miembros de la familia WAF/KIP: *p21*, *p27* y *p57*, tampoco se detectó algún cambio estadísticamente significativo y la expresión relativa es de para *p21* se mantiene en 1 (SEM \pm 0.35), para *p57* es de 1.3 (SEM \pm 0.25) y para *p27* es de 1 (SEM \pm 0.09).

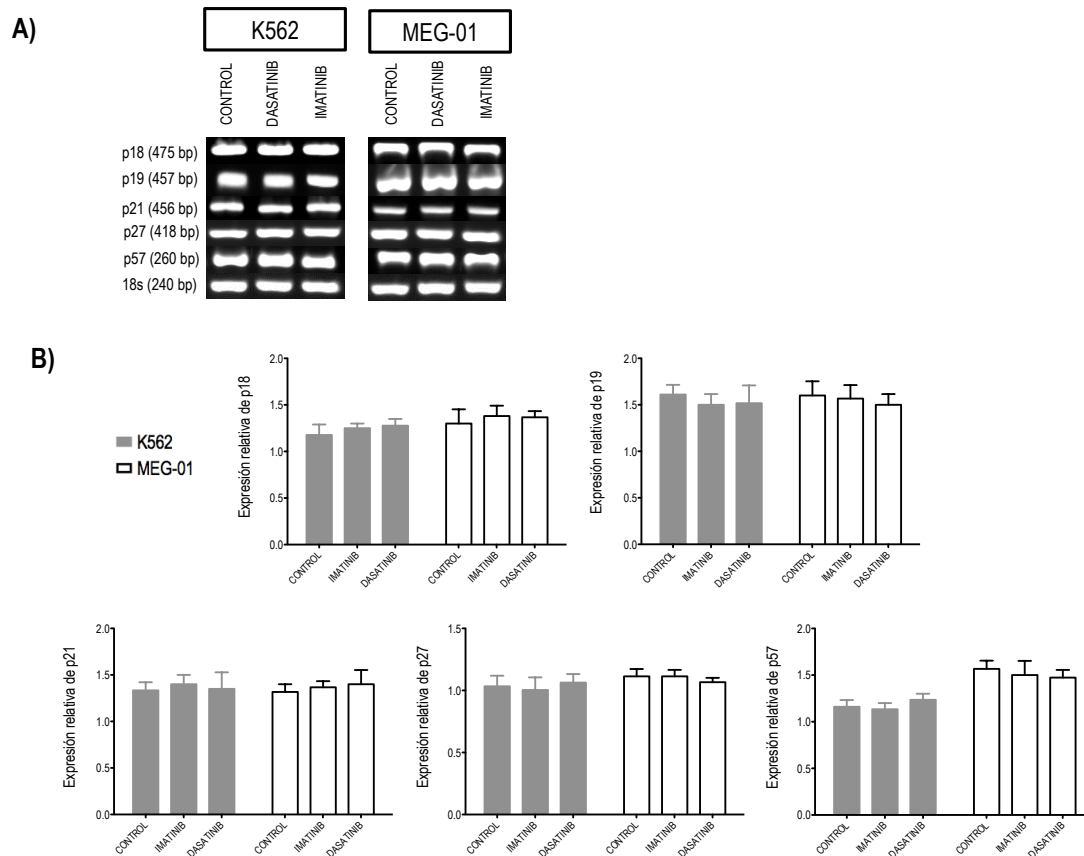


Figura 13. Imatinib y Dasatinib no modifican la expresión de CDKIs en células de LMC. Las líneas celulares de LMC K562 (n=3) y MEG01 (n=3) fueron cultivadas por 48 horas en ausencia (Control) o presencia de Dasatinib (100nM) o Imatinib (2.5 μ M), después de ese tiempo se analizó la expresión de los genes: p18, p19, p21, p27, p57 y 18s mediante PCR en punto final. Del total de experimentos realizados se realizó el análisis densitométrico (ImageJ) para cada uno de los genes y la expresión se normalizó con respecto al control de carga. El resultado muestra A) una figura representativa y B) el promedio \pm SEM de las diferentes evaluaciones. (ANOVA de dos vías, * $p=0.01$)

Por otro lado, también se analizó el nivel proteico de la mayoría de los CDKIs por citometria de flujo después de 48h de tratamiento *in vitro* con dasatinib o imatinib. Después de 48h de cultivo con cada uno de los fármacos las células fueron fijadas, permeabilizadas e incubadas con anticuerpos específicos para cada uno de los CDKIs, como se describe en la metodología, y finalmente analizadas en el citometro de flujo. En la Figura 14 se muestra un histograma representativo de cada uno de los CDKIs analizados en las tres diferentes poblaciones celulares después del tratamiento *in vitro* con dasatinib (Fig. 14A) o imatinib (Fig.

14B), el caso de MON no hay cambio significativo en el nivel proteico de los CDKIs, mientras que en el caso de los histogramas representativos para las líneas celulares K562 y MEG01 se observa que el tratamiento *in vitro* con imatinib y dasatinib generó una reducción en la IMF, y por lo tanto en el nivel proteico, de p18 y p57, esta reducción es estadísticamente significativa (ANOVA de dos vías, $\rho=0.01$) cuando se comparan con la IMF normalizada con respecto al control (Figura 15).

Cabe mencionar que previamente no se había evaluado si los inhibidores de BCR-ABL generaban cambio alguno en los niveles proteicos de los CDKIs en células primitivas hematopoyéticas de sujetos sanos, en este trabajo se encontró que ninguno de los fármacos modifican el nivel de proteína de alguno de los CDKIS, lo anterior sugiere que los miembros de la familia de los CDKIs que regulan la proliferación de células hematopoyéticas normales son diferentes a los participan en la inhibición de la proliferación causada por la inhibición de la actividad de BCR-ABL

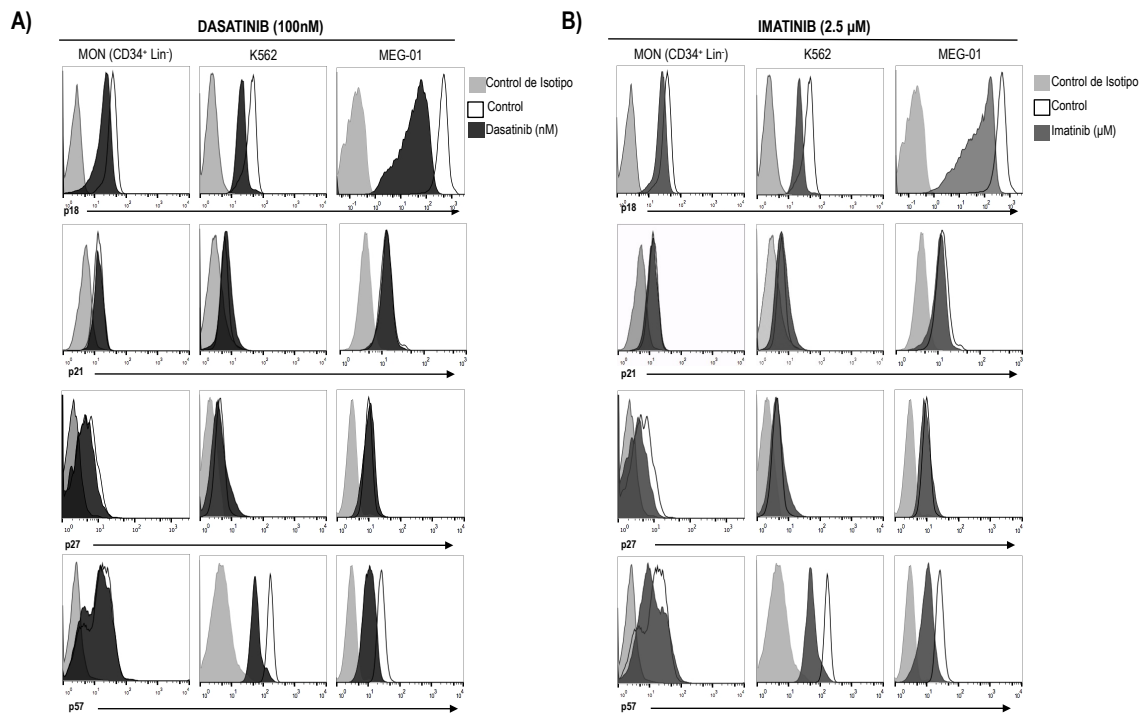


Figura 14. Imatinib y Dasatinib modifican el nivel proteico de CDKIs en células de LMC. Las líneas celulares de LMC K562 y MEG01 así como células CD34⁺ Lin⁻ de MON, fueron cultivadas en ausencia (Control) o presencia de Dasatinib (100nM) o Imatinib (2.5μM) por 48 horas, después de ese tiempo se analizó el nivel de proteína para p18, p21, p27 p57, mediante citometría de flujo utilizando el correspondiente control de isotipo. El resultado muestra una figura representativa del análisis.

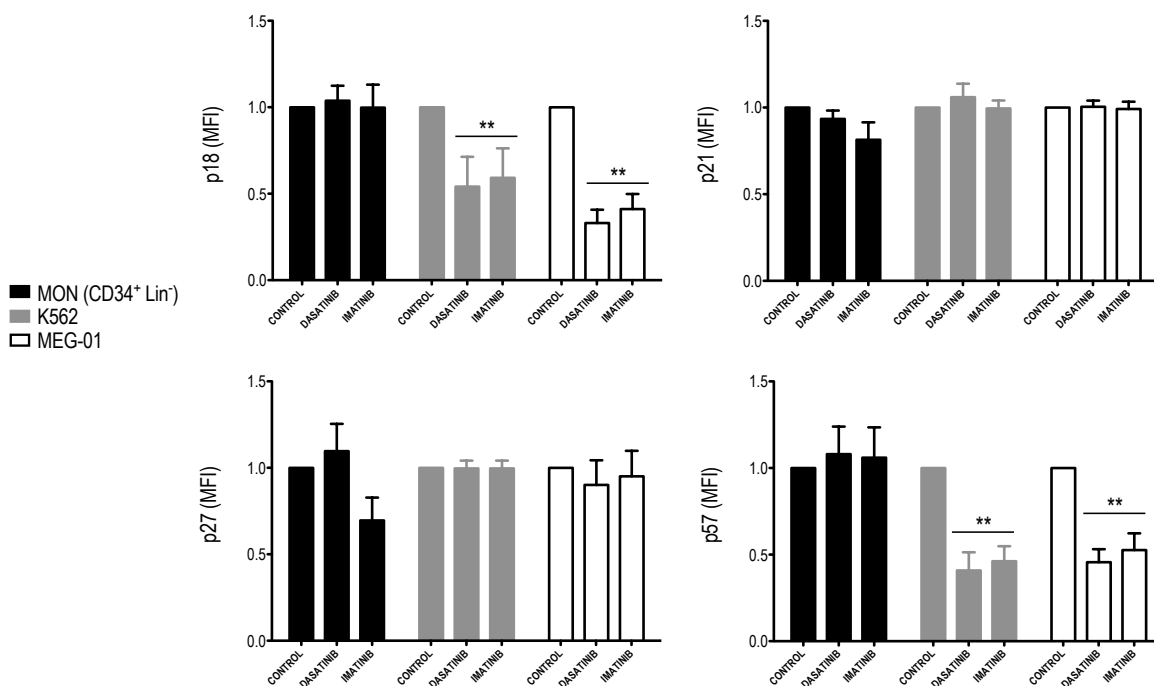


Figura 15. Imatinib y Dasatinib modifican el nivel proteico de CDKIs en células de LMC. Las líneas celulares de LMC K562 (n=3) y MEG01 (n=3) así como células CD34⁺ Lin⁻ de MON, fueron cultivadas en ausencia (Control) o presencia de Dasatinib (100nM) o Imatinib (2.5μM) por 48 horas. Después de ese tiempo se analizó el nivel de proteína para p18, p21, p27 y p57 mediante citometría de flujo y utilizando el correspondiente control de isotipo. El resultado muestra el promedio ± SEM de la Intensidad Media de Fluorescencia normalizada con respecto a su correspondiente control de cada una de las proteínas analizadas (ANOVA de dos vías, **p=0.01).

Los resultados anteriores demuestran que el tratamiento *in vitro*, con imatinib o dasatinib, no generan cambio alguno en la regulación de la transcripción de los CDKIs, pero sí se asocian con una reducción en los niveles proteicos de p18 y p57, probablemente debida a una disminución en la tasa traducción de los ARN mensajeros o en la vida media de las proteínas. De manera normal, los genes de los CDKIs tiene una expresión basal que puede ser modificada bajo algunos estímulos, por ejemplo; TGF-β, a través de la activación del factor de transcripción FOXO, lo que favorece un incremento en la expresión de p27; o bien,

por daño al ADN activando al factor de transcripción p53 que regula positivamente la expresión de p21. Sin embargo, el incremento en la expresión de los CDKIs no necesariamente está directamente asociado con su función en la inhibición del ciclo celular, otro factor que influye en su actividad es la localización subcelular, es exclusivamente en el núcleo donde los CDKI se asocian e inhiben los complejos Ciclina/cinasa. Considerando esto, el siguiente objetivo fue elucidar si la arresto en las fases G₀/G₁ del ciclo celular generado por el tratamiento *in vitro* con dasatinib o imatinib en células leucémicas era consecuencia de un incremento de p18 y p57 en el núcleo.

4. Los inhibidores de la actividad tirosina cinasa de BCR-ABL incrementan la concentración de p18 y p57 en el núcleo.

La inhibición de BCR-ABL con dasatinib o imatinib generan una reducción de los niveles proteicos de p18 y p57, exclusivamente, en células leucémicas y ya que un aspecto fundamental que regula la función de los CDKIs es su localización subcelular, en este trabajo se analizó, con dos diferentes estrategias experimentales la distribución subcelular de p18 y p57 en la línea celular K562 después del tratamiento *in vitro* con dasatinib o imatinib.

La primera estrategia fue cualitativa a través de ensayos de inmunofluorescencia. Después del tratamiento *in vitro* con imatinib o dasatinib, las células K562 fueron sometidas a un gradiente de ficoll para descartar células muertas y/o restos celulares, las células recuperadas se tiñeron con los respectivos anticuerpos, como se describe en la metodología. En la Fig. 16A se muestra una fotografía representativa de la inmunofluorescencia para detectar la proteína p18 y en la Fig. 16B para detectar la proteína p57. En las fotografías correspondientes al control se observa mayor densidad de proteína p18 o p57 (rojo) en la periferia del núcleo (DAPI-azul), es decir en el citoplasma (merge), mientras que después del tratamiento *in vitro* con dasatinib o imatinib, la localización de ambas proteínas se invierte y es más abundante en núcleo, en donde incluso se observa un color magenta en las fotografías correspondientes al merge.

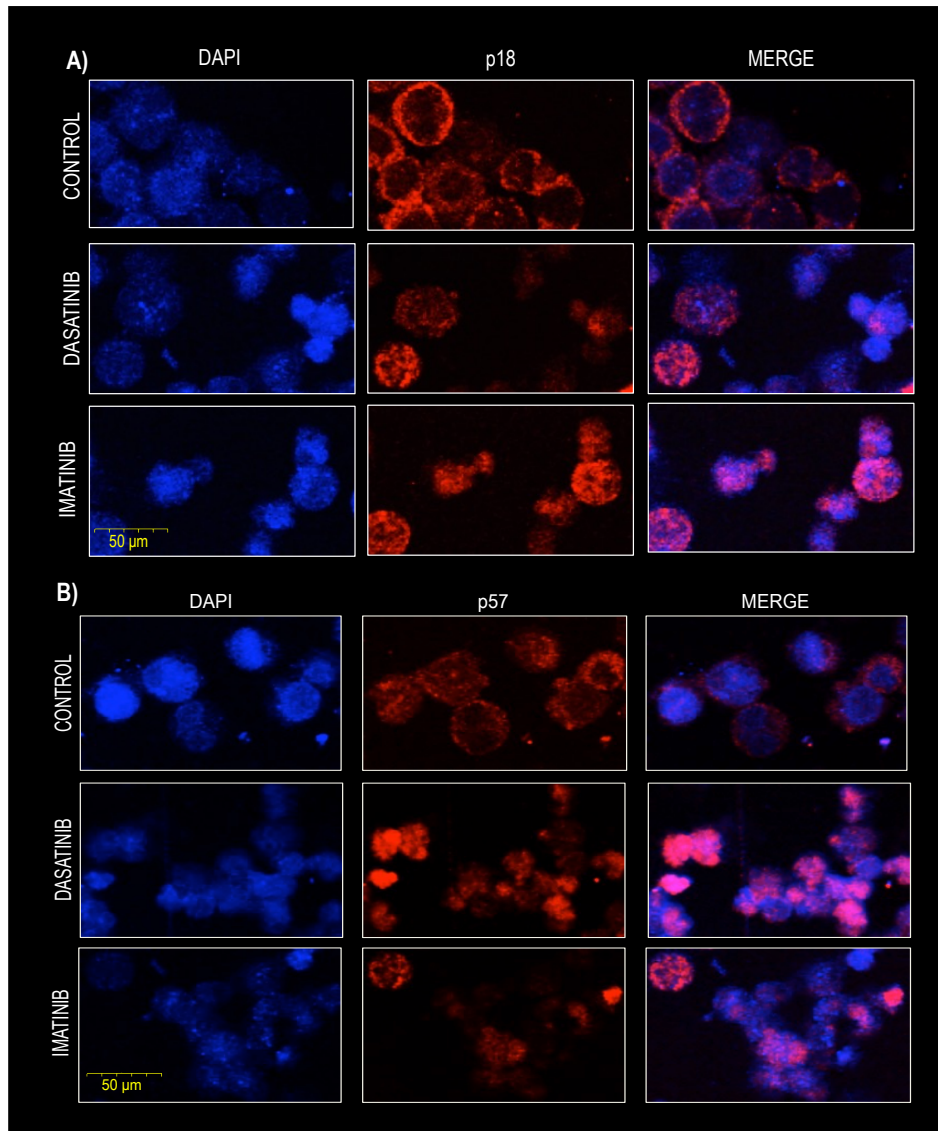


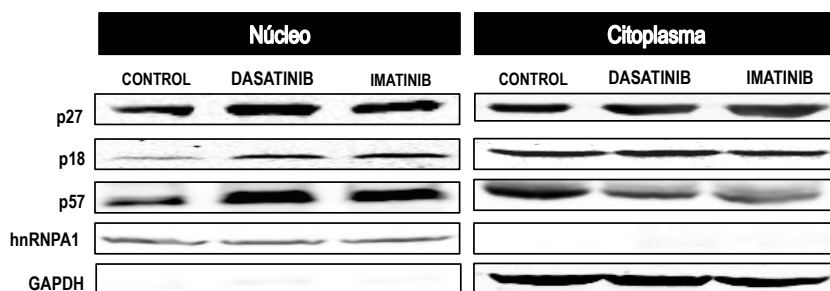
Figura 16. Imatinib y Dasatinib modifican la localización subcelular de p18 y p57 en la línea celular K562. La línea celular de LMC K562 (n=2) fue cultivada en ausencia (Control) o presencia de Dasatinib (100nM) o Imatinib (2.5μM) por 48 horas. Después de ese tiempo las células fueron analizadas por inmunofluorescencia para detectar la localización de las proteínas A) p18 y B) p57. El resultado muestra una fotografía (40x) representativa de la tinción nuclear (azul -DAPI) y el respectivo anti-CDKI (Rojo), así como el sobrelape de cada una de las tinciones (merge- Rosa).

La segunda estrategia experimental que se utilizó fue western blot, mismo que permitió realizar un análisis cuantitativo de la expresión de las proteínas. Después de 48h de tratamiento *in vitro* con imatinib o

dasatinib se realizó el fraccionamiento celular y western blot como se describe en la metodología. La Fig. 17 muestra un experimento representativo (n=3) del nivel proteico para p18, p57 y p21, en la fracción de proteínas nucleares y citoplasmáticas así como los controles de carga para la fracción nuclear, proteína HNRNPA1 (del inglés heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1) y para la fracción citoplasmática, proteína GAPDH (del inglés Glyceraldehyde-3- Phosphate Dehydrogenase).

El resultado demuestra que existe un incremento de la concentración proteica de p18 y p57 en el núcleo, incremento que es paralelo con la disminución de la concentración de las mismas proteínas en el citoplasma después del tratamiento *in vitro* con dasatinib o imatinib; en cambio, no hay una modificación aparente en la distribución subcelular de p21 (Figura 17A). El correspondiente análisis densitométrico del total de experimentos realizados, demuestra que el incremento nuclear de p18 y p57 después del tratamiento con los inhibidores es significativo y además indica, como ya se había detectado en los estudios de citometria de flujo, el nivel proteico total de estas moléculas también se reduce en respuesta al tratamiento *in vitro* con imatinib o dasatinib.

A)



B)

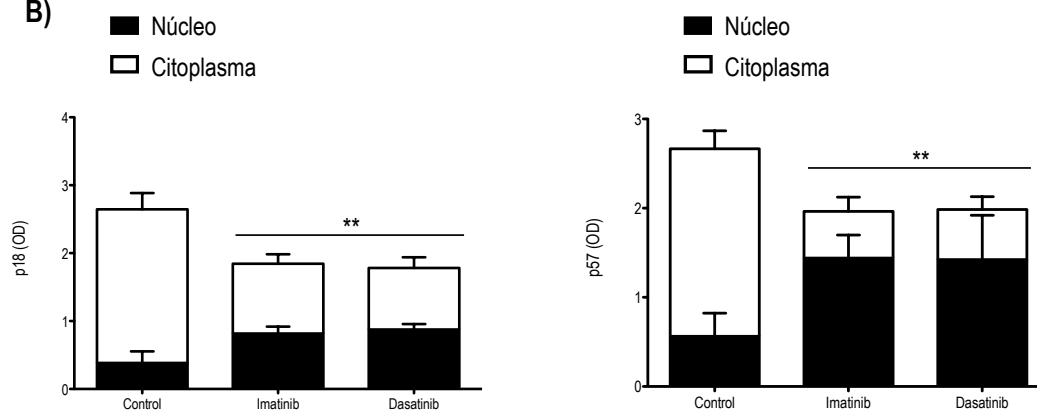


Figura 17. Imatinib y Dasatinib modifican la localización subcelular de p18 y p57 en la línea celular K562. La línea celular de LMC K562 (n=3) fue cultivada en ausencia (Control) o presencia de Dasatinib (100nM) o Imatinib (2.5 μ M) por 48 horas. Después de ese tiempo se realizó la extracción de proteínas de la fracción nuclear y citoplasmática. El resultado muestra A) un experimento representativo del western blot realizado para cada una de las fracciones en donde se utilizó como control la proteína HNRNPA1 para la fracción nuclear y para la fracción citoplasmática la proteína GAPDH. La figura B) muestra el promedio \pm SEM del análisis densitométrico (Image Studio) del total de experimentos analizados (ANOVA de dos vías, ** $p=0.01$)

Los inhibidores de la actividad tirosina cinasa de BCR-ABL, de primera y segunda generación, imatinib y dasatinib, respectivamente, son capaces de eliminar aquella población celular que es dependiente de su actividad, sin embargo existe otra población que es independiente de su actividad, en esta población, de acuerdo a los resultados recabados en este trabajo, sugerimos que BCR-ABL, a través de alguna de las diferentes vías de señalización que activa o de manera directa tiene como blanco a p18 y p57, y puede

cambiar sus modificaciones postranscripcionales de tal manera que son secuestradas en el citoplasma, inhibir *in vitro* la actividad de BCR-ABL con alguno de los dos fármacos se revierten estas modificaciones postranscripcionales y las señales de localización nucleares son expuestas y reconocidas por las importinas que llevan a cabo su translocación al núcleo, dentro del núcleo p57 se asocia e inhibe la actividad del complejo Ciclina D/Cdk4(6) y p18 se asocia al Cdk4 y/o 6, de tal manera evita que se asocie a la Ciclina D, esto arresta a esta población en las fases G₀/G₁ del ciclo celular.

La fase clínica más larga de la enfermedad es la fase crónica, dura de 4 a 6 años, y en esta fase la mayoría de los pacientes son diagnosticados y la principal alteración genética es la presencia del gen Bcr-Abl, pero no es el la única y el perfil de alteraciones genéticas puede variar de un paciente a otro, considerando esto fue necesario evaluar, después del tratamiento *in vitro* con dasatinib o imatinib, algún cambio la distribución en las fases del ciclo celular y/o en el nivel proteico de p18 y p57 en células CD34⁺ Lin⁻, donde co-existen CTHs y CTLs, de aspirados de médula ósea de pacientes con LMC en fase crónica y al momento del diagnóstico, es decir, sin tratamiento.

5. El tratamiento *in vitro* con dasatinib o imatinib arresta a las células CD34⁺ CD38⁻ Lin⁻ de pacientes con leucemia mieloide crónica en las fases G₀/G₁ y reduce los niveles proteicos totales de p18 y p57.

Para abordar este último punto, las muestras fueron procesadas, cultivadas como se describe en la metodología, y teñidas después de 48h de cultivo con dasatinib (100nM) o imatinib (2.5μM) para ser analizadas en el citómetro de flujo. En la Fig. 18 se muestra un panel representativo del análisis de citometría de flujo que se realizó para evaluar estado en el ciclo celular y nivel proteico de p18 y p57, este análisis se realizó en la población con inmunofenotipo CD34⁺ 38⁻ y, al igual que en las líneas celulares K562 y MEG-01, tratamiento *in vitro* con dasatinib o imatinib incrementa el porcentaje de células en las fases G₀/G₁, como se observa en el histograma representativo del total de muestras procesadas (n=4) (Fig. 18A), se evaluó el estado en el ciclo celular a través del contenido de ADN (DAPI, eje X) y se observó un incremento estadísticamente significativo (ANOVA de dos vías, $p=0.01$) en el porcentaje de células en las fases G₀/G₁ del 62% (SEM±3) en el control al 88% (SEM±4) en las células tratadas con dasatinib y al

87% (SEM±5) en las células tratadas con imatinib, y de manera paralela se reduce el porcentaje de células en fases activas del ciclo celular; S, G₂ y M.

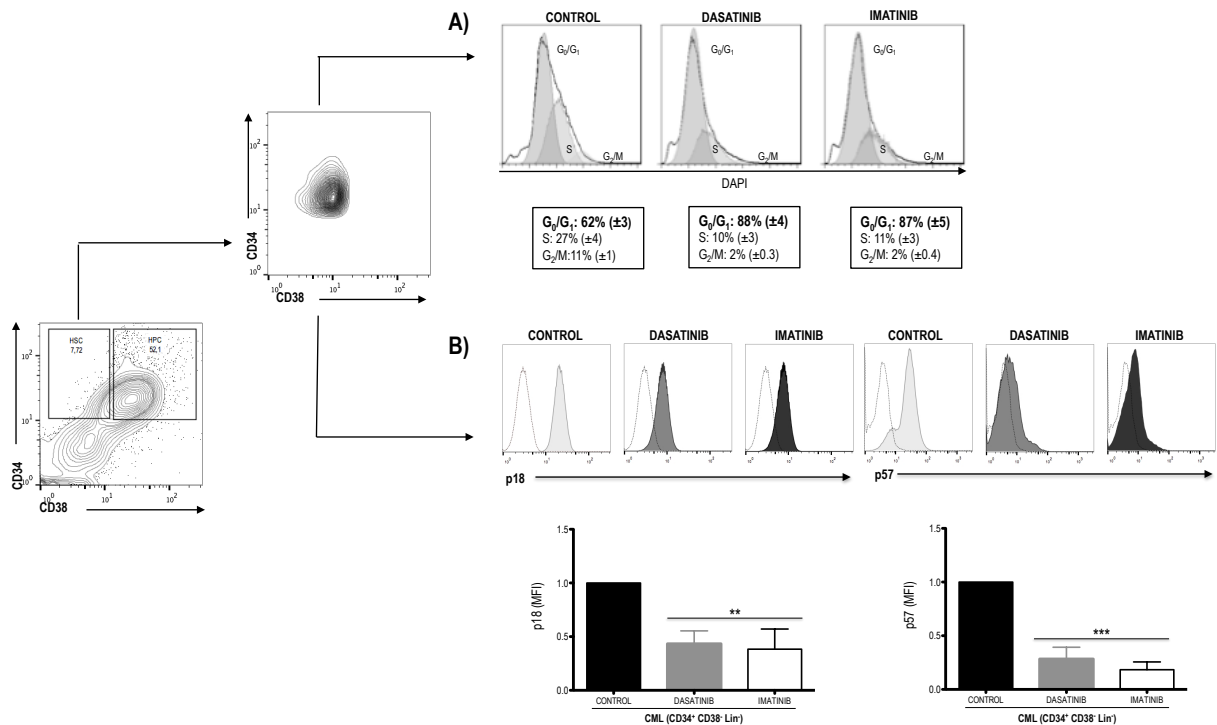


Figura 18. Imatinib y Dasatinib modifican el estado del ciclo celular y niveles proteicos de p18 y p57 en células troncales primarias de LMCI. Muestras primarias de LMC (n=4) fueron enriquecidas en la fracción CD34⁺ Lin⁻ y cultivadas en ausencia o presencia de Dasatinib (100nM) o Imatinib (2.5µM) por 48 horas. Después de ese tiempo se enriqueció la población con fenotipo troncal (CD34⁺ CD38⁻ Lin⁻) y en ella se determinó el estado del ciclo celular (A) y el nivel proteico de los CDKIs p18 y p57 (B). El resultado muestra histogramas representativos, así como los correspondientes promedios ± SEM de los respectivos experimentos (ANOVA de dos vías, **p=0.01)

En la misma población, también se analizó por citometría de flujo (Fig. 18B) los niveles proteicos de p18 y p57 después del tratamiento *in vitro* con imatinib y dasatinib, y de la misma manera que en K562 y MEG-01, hay una disminución en los niveles totales de p18 y p57, como se observa en los histogramas representativos. El análisis estadístico de los datos obtenidos del total de muestras procesadas (n=4) en el que

se compararon las IMF normalizadas con respecto al control, demostró que el nivel proteico total de p18 se reduce a 0.5 (SEM±0.06) y a 0.4 (SEM±0.09), después del tratamiento *in vitro* con dasatinib e imatinib, respectivamente, y esta reducción es estadísticamente significativo (ANOVA de dos vías, $\rho=0.01$). De la misma manera se analizó los datos obtenidos de la tinción para p57, el nivel proteico total después del tratamiento *in vitro* con dasatinib se reduce a 0.3 (SEM±0.09) y con imatinib se reduce a 0.2 (SEM±0.07), este cambio es estadísticamente significativa (ANOVA de dos vías, $\rho=0.01$).

La disminución del nivel proteico total de p18 y p57 y el arresto de las células en las fases G_0/G_1 son dos cambios que son consecuencia de inhibir *in vitro* la actividad tirosina cinasa de BCR-ABL, algo importante de resaltar es que ambos cambios se observan en dos diferentes fases de la enfermedad; fase crónica y crisis blástica, lo que sugiere que ambas moléculas están participando de manera activa en el la inhibición de la proliferación, a pesar de que los contextos celulares son distintos, es decir que el perfil de alteraciones citogenéticas es distinto y más amplio en la fase de crisis blástica de la enfermedad.

DISCUSIÓN

La Leucemia Mieloide Crónica (LMC) es una enfermedad mieloproliferativa que tiene su origen en una población con fenotipo troncal CD34⁺CD38⁻Lin⁻, que ha adquirido el cromosoma Philadelphia (Ph⁺) así como la expresión de su producto oncogénico *bcr-abl* y dadas su capacidad de auto renovación, alta proliferación y diferenciación multilinaje, recibe el nombre de Células Troncales Leucémicas (CTLs). La oncoproteína tirosina cinasa BCR-ABL, marcador característico de la enfermedad, es una oncoproteína que resulta de la transcripción del gen de fusión *bcr-abl*, producto de la translocación recíproca de los brazos cortos de los cromosomas 9 y 22. Dicha alteración genética se presenta entre el 95-98% de los casos de LMC y aunque es la principal causa asociada a la enfermedad, se ha descrito la presencia de algunas otras anomalías cromosómicas, mismas que se adquieren conforme la enfermedad progresa. (Quintás-Cardama A and Cortes J, 2008).

Desde hace más de una década, el uso de inhibidores de la actividad tirosina cinasa de BCR-ABL se ha usado como principal agente de tratamiento de la LMC. De éstos, han sido desarrolladas dos generaciones y el Imatinib pertenece a la primera, mientras que Dasatinib y Nilotinib constituyen la segunda. Desde el punto de vista clínico, el 65% de los pacientes tratados con imatinib tienen una respuesta exitosa ya que presentan remisión hematológica completa (CHR), respuesta citogenética mayor (MMR) o completa (CCR) y respuesta molecular completa (CMR). El restante 35% de los pacientes que son resistentes al tratamiento con imatinib, son tratados con Dasatinib o Nilotinib, y aunque todos ellos son capaces de inducir apoptosis en poblaciones de progenitores y precursores hematopoyéticos leucémicos, ninguno es capaz de eliminar a las células troncales leucémicas responsables del mantenimiento de la enfermedad, tal y como se ha demostrado en estudios *in vitro* e *in vivo* (Drucker *et al.* 2000; Wassmann *et al.*, 2001; O'Brien *et al.*, 2003).

Algunos grupos de trabajo -incluido en ellos el nuestro-, demostraron que células primitivas provenientes de sujetos con LMC que habían recibido tratamiento *in vivo* y que se habían mantenido en cultivo *in vitro*, tenían niveles detectables del transcrito *Bcr-Abl*, a pesar de haber sido obtenidas de sujetos con CMR, CHR y CCR al inicio del cultivo (Chávez-González A, *et al.*, 2005), evento que demostraba la falta de actividad de Imatinib, Nilotinib y Dasatinib en algunas poblaciones hematopoyéticas. Aunado a ello, estudios clínicos prospectivos y multicéntricos realizados de manera independiente: STIM (del inglés Stop Imatinib) en Francia en el 2010 (Mahon FX, *et al.*, 2011) y TWISTER (Ross DM, *et al.*, 2013) en Australia

en el 2013 (CITA), demostraron que al detener el tratamiento con imatinib en un grupo de pacientes que habían mantenido CMR, CHR y CCR durante 2 años ininterrumpidos, el 61% de los pacientes presentaban recaída dentro de los 12 primeros meses posteriores a la suspensión del tratamiento mientras que el restante 39%, mantenían sus correspondientes CMR, CHR y CCR. Sin embargo, el estudio TWISTER también demostró la presencia de *bcr-abl*, en el ADN genómico de los pacientes que no tuvieron recaída después de más de dos años de haber suspendido el tratamiento, demostrando con ello que aún estaba presente la clona leucémica, misma que al ser secuenciada en años subsecuentes, también mostraba acumulación de mutaciones (Ross DM, *et al.*, 2013).

Estos hallazgos, condujeron a proponer que el efecto principal de los inhibidores de la actividad tirosina cinasa de BCR-ABL es inhibir la proliferación de las CTLs, de manera que cuando es retirado el tratamiento, la enfermedad se restablece provocando con ello recaídas, en la mayoría de los pacientes, así como la persistencia de la clona leucémica. A la fecha, y a pesar de la amplia descripción de la actividad de Imatinib y Dasatinib, no hay resultados contundentes sobre las moléculas que pudieran participar en la inhibición de la proliferación celular mediada por los inhibidores de la actividad tirosina cinasa de BCR-ABL, pero es muy claro que las principales moléculas candidatas son aquellas que de manera normal regulan negativamente la progresión del ciclo celular, es decir, los inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (CDKIs), de las que se distingue las familias INK4 y WAF/KIP.

Considerando lo anterior, el principal interés de nuestro trabajo fue determinar en qué fase del ciclo celular se encuentran las CTLs de LMC después de haber recibido tratamiento con los inhibidores y qué miembros de las familias de CDKIs están relacionados con la inhibición de la proliferación.

La manera en que se abordaron estas interrogantes, fue inhibiendo *in vitro* la actividad tirosina cinasa de BCR-ABL, con imatinib o dasatinib en líneas celulares de LMC (K562 y MEG01), utilizando como control normal células primitivas hematopoyéticas (CD34⁺ Lin⁻) provenientes de médula ósea de sujetos hematológicamente sanos (MON). En los ensayos realizados para evaluar viabilidad (Fig. 7 y 8) se encontró que las concentraciones utilizadas de imatinib y dasatinib reducen significativa y selectivamente, la viabilidad de las células leucémicas. Además, se pudo detectar que las líneas celulares de LMC presentan una alta heterogeneidad en la población y aunque no se ha descrito la presencia de una población troncal leucémica en K562 ni en MEG-01, si se detectó la presencia de una población dependiente de la actividad tirosina cinasa de BCR-ABL misma que muere durante el tratamiento *in vitro*

con dasatinib o imatinib y otra población celular que parece ser independiente de la actividad tirosina cinasa de BCR-ABL y en la cual la presencia de los inhibidores conduce a la inhibición de su proliferación (Fig. 9 y 10). Esta última población, podría ser el equivalente (dentro de las líneas celulares), a la población que permanece aún después del tratamiento en todos los pacientes y que es la responsable de las recaídas antes mencionadas.

Esta última propuesta es sustentada con las figuras 11 y 12, que muestran que la inhibición de la proliferación se asocia con un arresto en las fases G_0/G_1 del ciclo celular, tal y como ha sido sugerido previamente por otros autores (CITA).

De manera normal, la transición de la fase G_1 a la fase S, está regulada positivamente por los complejos Ciclina D/Cdk4 o 6 y Ciclina E/Cdk2, mismos que de manera general actúan hiperfosforilando e inactivando a miembros de la familia de proteínas Rb, que inhiben a factores de transcripción de la familia E2F, los cuales una vez que son liberados, participan en la expresión de genes involucrados en replicación del ADN (fase S) y el consecuente tránsito en el ciclo celular. No obstante, si las condiciones no son las ideales para que se lleva a cabo la división celular, miembros de las familias de CDKIs regulan negativamente la actividad de los complejos Ciclina/Cdk y bloquean el tránsito a través del ciclo. En este punto, la actividad de los CDKI puede realizarse de dos diferentes maneras: los miembros de la familia INK4, (p15, p16, p18 y p19) se asocian directamente al Cdk 4 o 6 y evitan que forme complejo con la Ciclina D y los miembros de la familia de los WAF/KIP (p21, p27 y p57) se asocian e inhiben la actividad de los complejos Ciclina/Cdk ya formados, pero en ambos casos, el resultado es la detención del ciclo celular (Bathia R, *et al.*, 2010).

Considerando esto y conociendo que las células leucémicas K562 y MEG01 se arrestan en las fases G_0/G_1 del ciclo celular después del tratamiento *in vitro* con dasatinib o imatinib, era alta la probabilidad de que miembros de las dos familias de CDKIs estuviesen participando de este arresto. Los miembros de cada una de las familias analizados se eligieron con base en lo reportado previamente en líneas celulares de LMC y en células mononucleares de pacientes con LMC, omitiendo así el análisis de p15 y p16 ya que se ha reportado que la pérdida del brazo corto del cromosoma 9, involucra los sitios donde se localizan los genes *p16* y *p15*. Además, también se ha reportado la pérdida de la expresión de *p53*, evento que se asocia principalmente con la pérdida del brazo corto del cromosoma 17, región donde se encuentra este gen, o debido a cambios epigenéticos en su promotor. p53 es el factor de transcripción

que tiene un papel principal en regular positivamente la expresión de *p21* en respuesta del daño al ADN, pero a pesar de esto se ha reportado que sí hay expresión de *p21* en células leucémicas (Taniguchi T, et al., 1999), así que los CDKIs analizados en este trabajo fueron: p18 y p19, de la familia INK4 y p21, p27 y p57, de la familia WAF/KIP.

El análisis de expresión realizado en las líneas de LMC demostró que el tratamiento con imatinib o dasatinib no modifica la expresión basal (ARNm) de los CDKIs (Figura 13), pero dicho tratamiento si se asocia con un cambio en el nivel proteico de p18 y p57 (Figura 14), sugiriendo entonces que el tratamiento *in vitro*, con imatinib o dasatinib, no generan cambio en la regulación de la transcripción de los CDKIs, pero sí se tienen efecto en la reducción traduccional de p18 y p57, probablemente involucrada con una disminución en la tasa traducción de los ARN mensajeros o en la vida media de las proteínas.

En el caso de células primitivas (CD34⁺ Lin⁻) de MON, no se había evaluado previamente sí los inhibidores de BCR-ABL generaban cambio alguno en los niveles proteicos de los CDKIs y en este trabajo se demuestra por primera vez que ni Imatinib, ni Dasatinib modifican el nivel transcripcional o traduccional de los CDKIS, sugiriendo con ello que los miembros de la familia de los CDKIs que regulan la proliferación de células hematopoyéticas normales son diferentes a los participan en la inhibición de la proliferación causada por la inhibición de la actividad de BCR-ABL. En ese sentido, los CDKIs que han sido reportados como moléculas esenciales en el mantenimiento de células troncales y progenitoras hematopoyéticas son p21 y p27, respectivamente (Chávez González M A y Moreno-Lorenzana D. 2011), y ninguna de estas moléculas se modifica durante el tratamiento *in vitro* con dasatinib o imatinib en células leucémicas.

Aunado a lo anterior, ha sido reportado que el nivel proteico de los CDKIs no es un evento celular que este directamente relacionado con su función en la inhibición de la proliferación ya que para este efecto es de particular importancia la localización subcelular de los CDKI, la cual esta directamente regulada por cambios postraduccionales, específicamente fosforilación y ubiquitinación de residuos de aminoácidos. Por ejemplo: en la normalidad el CDKI p57 es fosforilado en los residuos Ser282 o T310 a través de la vía de PI3k/AKT y/o por el complejo Ciclina E/Cdk2, estas fosforilaciones favorecen su localización citoplasmática (Borrielo A, et al., 2011) , así mismo, p18 se localiza en núcleo cuando se asocia a Cdk6 o 4, pero cuando existe un estímulo con factores de crecimiento y en consecuencia un incremento en la expresión de Ciclina D, se conduce a la disociación de los complejos p18/Cdk 4 o 6 y en

consecuencia p18 es translocado al citoplasma, ubiquitinado en los residuos Lys46 y Lys112 y finalmente degradado (Tokumoto Y, *et al.*, 2002).

En relación a este punto y para determinar si la localización celular de p18 y/o p57 participaban en la inhibición de la proliferación de células leucémicas mediada por dasatinib o imatinib se realizaron análisis de inmunofluorescencia (Figura 17) y western blot (Figura 18), demostrando así que ambos fármacos favorecen la localización nuclear de p18 y p57, por lo que se sugiere que BCR-ABL (a través de alguna de las diferentes vías de señalización que activa o de manera directa), tiene como blanco a p18 y p57, y puede cambiar sus modificaciones postranscripcionales de tal manera que mantiene a ambas proteínas secuestradas en el citoplasma, pero una vez que la actividad de BCR-ABL se inhibe (con alguno de los dos fármacos aquí utilizados), dichas modificaciones postranscripcionales se revierten de manera que las señales de localización nucleares son expuestas y reconocidas por las importinas, mismas que podrían participar en la translocación al núcleo, lugar en donde p57 podría inhibir la actividad del complejo Ciclina D/Cdk4(6) y p18 se podría asociar con Cdk4 y/o 6, evitando la formación del complejo con Ciclina D, y provocando en consecuencia el esto arresto de en las fases G₀/G₁ del ciclo celular.

Los resultados hasta aquí mostrados corresponden al análisis en las líneas celulares K562 y MEG-01 que como se mencionó anteriormente, corresponden a la fase de crisis blástica de la enfermedad. Sin embargo, considerando que más del 90% de los pacientes con LMC son diagnosticados en la fase crónica y que a la fecha no existen líneas celulares que representen esta fase de la enfermedad, consideramos necesario evaluar el estado en el ciclo celular y niveles proteicos de p18 y p57 en células CD34⁺Lin⁻ provenientes de sujetos con LMC en fase crónica y que no han recibido tratamiento.

Los resultados de la Figura 18, demuestran que células con fenotipo troncal (CD34⁺ CD38⁻ Lin⁻) provenientes de muestras primarias también son arrestadas en las fases G₀/G₁ del ciclo celular después del tratamiento *in vitro* con Imatinib o Dasatinib, y que al igual que en las líneas celulares, este efecto se asocia con la reducción en los niveles proteicos de p18 y p57, por lo que muy seguramente estas moléculas también muestran un cambio en la localización subcelular posterior al tratamiento. Sin embargo, estas evaluaciones quedan aún pendientes ya que como era de esperarse, el número celular obtenido en la fracción troncal a partir de muestras primarias es muy reducido y limita la realización de estudios de Western Blot y de inmunofluorescencia en donde particularmente las células quedan muy frágiles después del proceso de selección y se pierden a lo largo de las tinciones. No obstante, para subsanar este punto,

actualmente se trabaja en la obtención de muestras de pacientes tratados in vivo con cada uno de los agentes de manera que se evite el proceso de cultivo y se realice en un menor número de procedimientos la evaluación de localización subcelular de los CDKI.

Una observación importante de resaltar, es que los efectos en los CDKI, son detectados en dos diferentes fases de la LMC: fase crónica y crisis blástica; lo que sugiere que ambas moléculas están participando de manera activa en la inhibición de la proliferación a pesar de que los contextos celulares son distintos, es decir, que el perfil de alteraciones citogenéticas es distinto y más amplio en la fase de crisis blástica de la enfermedad.

Durante el transcurso de este trabajo se reportó en la literatura la identificación de dos marcadores de superficie exclusivos de CTLs, IL1-RAP y CD26 (Gerber JM, *et al.*, 2013), en pacientes en fase crónica, por lo que sería muy importante analizar en una población con fenotipo CD34+ CD38- IL1-RAP+ CD26+ y proveniente de LMC, cómo se afectará el estado en el ciclo celular y los niveles proteicos durante el tratamiento in vitro o mejor aún in vivo (en muestras provenientes de sujetos que se encuentran recibiendo tratamiento) con los inhibidores de la actividad tirosina cinasa de BCR-ABL.

Los resultados aquí mostrados generan información sobre dos moléculas específicamente involucradas en la quiescencia y en consecuencia falta de efecto de los ITK en células leucémicas (tanto línea celulares como células primitivas), en dos diferentes estados de la enfermedad, sugiriendo que a pesar de la heterogeneidad de la enfermedad y de las características particulares de cada fase, existen moléculas que tienen actividades comunes y que incluso podrían ser blancos de nuevos agentes que permitan eliminar selectivamente a las células leucémicas teniendo efecto mínimo en la normalidad, ya que como se mostro en este trabajo, la hematopoyesis primitiva normal es mínimamente afectada por los ITK y no necesariamente requiere los mismos CDKI para regular mecanismos de quiescencia y autorrenovación.

CONCLUSIÓN

En células leucémicas la actividad de BCR-ABL, a través de alguna de las diferentes vías de señalización que activa o de manera directa, tiene como blanco a p18 y p57, y puede cambiar sus modificaciones postranscripcionales de tal manera que mantiene a ambas proteínas secuestradas en el citoplasma, pero una vez que la actividad de BCR-ABL se inhibe, con Imatinib o Dasatinib, dichas modificaciones postranscripcionales se revierten de manera que las señales de localización nucleares son expuestas y reconocidas por las importinas, que participan en la translocación al núcleo, lugar en donde p57 podría inhibir la actividad del complejo Ciclina D/Cdk4(6) y p18 se podría asociar con Cdk4 y/o 6, evitando la formación del complejo con Ciclina D, y provocando en consecuencia el esto arresto de en las fases G₀/G₁ del ciclo celular.

PERSPECTIVAS

Considerando los resultados recabados en este trabajo consideramos que las siguientes estrategias experimentales contribuirán a comprender mejor el mecanismo a través del cual Imatinib y Dasatinib inhiben la proliferación de Células Troncales Leucémicas:

- Determinar en líneas celulares de LMC si el tratamiento *in vitro* con dasatinib o imatinib favorece la inhibición y asociación de p57 con el complejo Ciclina D/ Cdk4 o Cdk6, además de la inhibición y asociación con Cdk4 y/o Cdk6.
- Evaluar si el tratamiento *in vitro* con dasatinib o imatinib reduce los niveles proteicos de p18 y p57 en una población de células troncales leucémicas CD34⁺ CD38⁻ IL1RAP⁺ CD26⁺ y/o en su distribución subcelular.
- Evaluar si el tratamiento *in vivo* con dasatinib o imatinib reduce los niveles proteicos de p18 y p57 en una población de células troncales leucémicas CD34⁺ CD38⁻ IL1RAP⁺ CD26⁺ y/o en su distribución subcelular.

REFERENCIAS

- Arico M, Biondi A. Myelodysplastic Syndromes and Chronic Myeloproliferative Disorders. In: Ching-Hon P (ed.). *Childhood Leukemias*. Cambridge University Press; 1999, p. 345-7.
- Barnett MJ, Eaves CJ. In: Leukemia Henderson ES, Lister TA, Graves MF, editors. *Chronic Myeloid Leukemia*. Philadelphia, USA: Saunders; 1996. P. 535-53.
- Bonifazi F, de Vivo A, Rosti G, Guilhot F, Guilhot J, Trabacchi E, Hehlmann R, Hochhaus A, Shepherd PC, Steegmann JL, et al. Chronic myeloid leukemia and interferon-alpha: a study of complete cytogenetic responders. *Blood*. 2001; **98**: 3074-3081.
- Boyer MJ and Cheng T. The CDK inhibitors: potential targets for therapeutic stem cell manipulations? *Gene Therapy*. 2008; **15**: 117-125.
- Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H, Meyer T, Muller M, Drucker BJ, and Lyndon NB. Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res*. 1996; **56**: 100-104.
- Chávez-González A, Rosas-Cabral A, Vela-Ojeda J, González JC and Mayani H. Severe functional alterations in vitro in CD34⁺ cell populations from patients with chronic myeloid leukemia. *Leukemia Research*. 2004; **28**: 639-647.
- Chávez-González A, Ayala-Sánchez M, Sánchez-Valle E, Ruiz-Sánchez E, Arana-Trejo RM, Vela-Ojeda J and Mayani H. Functional integrity in vitro of hematopoietic progenitor cells from patients with chronic myeloid leukemia that have achieved hematological remission after different therapeutic procedures. *Leukemia Research*. 2006; **30**: 286-295.
- Chávez González M A y Moreno-Lorenzana D. 2011. Células Troncales Tumorales: El modelo de leucemias mieloides. p 210-238. *Células Troncales y Medicina regenerativa*. 2011. Universidad Nacional Autónoma de México. D.F., México. 357 pp.
- Cheng T, Rodrigues N, Shen H, Yang Y, Dombkowski D, Sykes and Scadden DT. Hematopoietic Stem Cell Quiescence Maintained by p21^{Cip1/waf1}. *Science*. 2000; **287**:1804-1808.
- Cheng T, Rodrigues N, Dombkowski D, Stier S and Scadden DT. Stem cell repopulation but not pool size is governed by p27^{kip1}. *Nature Med*. 2000; **11**: 1235-1240.
- Chen Y and Li S. Molecular signatures of chronic myeloid leukemia stem cells. *Biomark Res*. 2013; 1(1): 21.

- Copland M, Pellicano F, Richmond L, et al. BMS-214662 potently induces apoptosis of chronic myeloid leukemia stem and progenitor cells and synergizes with tyrosine kinase inhibitors. *Blood*. 2008; **111**: 2843-2854.
- Cortes J. Dasatinib induces complete hematologic and cytogenetic responses in patients with imatinib-resistant or -intolerant chronic myeloid leukemia in blast crisis. *Blood*. 2006.
- Dening M, Goldman J, Melo J. The molecular biology of Chronic Myelogenous Leukemia. *Blood*. 2000; **96**: 3343-56.
- Dowding C, Gordon M, Gou AP, Maison D, Osterholz J, Siczkowski M and Goldman J. Potential mechanisms of action of interferon-alpha in CML. *Leuk Lymphoma*. 1993; **11**: 185-91.
- Djaldeti M, Padeh B, Pinkhas Y, and De Vries A. Prolonged remission in chronic myeloid leukemia after one course of busulfan. *Blood*. 1966; **27**: 103-109.
- Dohse M, Scharenberg C, Shukla S, et al. Comparison of ATP-Binding Cassette Transporter Interactions with the Tyrosine Kinase Inhibitors Imatinib, Nilotinib, and Dasatinib. *Drug Metabolism and Disposition*. 2010; **38**(8):1371-1380.
- Drucker B and Lyod N. Lesson learned from the development of an Abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. *J. of Clin. Inv.* 2000; **105**: 3-7.
- Drucker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, Resta DJ, Reese SF, Ford JM, Capdeville R, and Talpaz M. Activity of a specific inhibitor of the Bcr-Abl tyrosine kinase in the blas crisis of the chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2001; **344**: 1038-1042.
- Eaves CJ and Eaves AC. Progenitor cell dynamics in Chronic Myeloid Leukemia: Biology and Treatment. 2001, pp. 73-100.
- Furukawa Y, Kikuchi J, Nakamura M, Iwasw S, Yamada H, Matsuda M. Lineage specific regulation of cell cycle control gene expression during haematopoyetic cell differentiation. *Br J Haematol*. 2000; **110**: 663-673.
- Giannoudis A, Davies A, Lucas CM, Harris RJ, Pirmohamed M, Clark RE. Effective dasatinib uptake may occur without human organic cation transporter 1 (hOCT1): implications for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2008 **15**;112(8):3348-54.
- Gutiérrez-Castellanos S, Cruz M, Rabelo L, Godinez R, Reyes E and Riebeling C. Differences in BCL-XL expression and STAT 5 phosphorylation in chronic myeloid leukaemia patients. *Eur. J Haematol*. 2004; **72**: 231-238.

- Hochhaus A, Kantarjian H, Baccarani M, Lipton J, Apperley J, Drucker B, Facon T, Goldergerg S, Cervantes F, Silver R, Stone R, Hughes T, Muller M, Ezzeddine R, Countouriotis A and Shah N. Dasatinib induces notable hematologic and cytogenetic response in chronic-phase chronic myeloid leukemia after failure of Imatinib therapy. *Blood*. 2007; **109**: 2303-2309.
- Holyoake TL, Jiang X, Eaves CA and Eaves CJ. Isolation of a Highly Quiescent Subpopulation of Primitive Leukemic Cells in Chronic Myeloid Leukemia. *Blood*. 1999; **94**: 2056-2064.
- Horita M, Andrew E, Benito A, Arbona C, Sans C, Beet I, Prosper F and Luna JL. Bocklade of the BCR/ABL kinase activity induces apoptosis of chronic myelogenous leukemia cells by suppressing signal transducer and activator of transcription 5-dependent expression of Bcl-XL. *J. Exp. Med.* 2000; **191**: 977-984.
- Huntly BJ, Gilliland DG. Leukaemia stem cells and the evolution of cancer stem-cell research. *Nature Reviews Cancer*. 2005; **5**: 311-320.
- Jabbour E, Kantarjian HM, Saglio G, et al. Early response with dasatinib or imatinib in chronic myeloid leukemia: 3-year follow-up from a randomized phase 3 trial (DASISION). *Blood*. 2014; **123**(4): 494-500.
- Jorgensen H and Holyoake T. A comparison of normal and leukemic stem cell biology in chronic myeloid leukemia. *Hematological Oncology*. 2001; **19**: 89-106.
- Kurzrock R, Gutterman JU, Talpaz M. The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N. Engl. J. Med.* 1999; **341**:164-72.
- La Rosse P, Johnson K, O'Dwyer ME, and Drucker BJ. In vitro studies of the combination of imatinib mesylate (Gleevec) and arsenic trioxide (Trisenox) in chronic myelogenous leukemia. *Exp Hematol (Copenh)*. 2002; **30**: 729-737.
- Laurent E, Talpaz M, Kantarjian H and Kurzrock R. The BCR gene and Philadelphia Chromosome-positive Leukemogenesis. *Cancer Research*. 2001; **61**: 2343-2355.
- Litzow MR. Imatinib resistance: obstacles and opportunities. *Arch Pathol Lab Med*. 2006; **130**(5):669-679.
- Lugo TG, Pendergas AM, Muller AJ, Witte ON. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science*. 1990; **247**: 1079-82.
- Mahon FX, Rea D, Guilhot J, Guilhot F, Huguet F, Nicolini F, et al. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at

least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. *Lancet Oncol.* 2010; 11(11): 1029–35.

- Martín-Henao GA, Quiroga R, Sureda A, González JR, Moreno V and García J. L-selectin expression is low on CD34+ cells from patients with chronic myeloid leukemia and interferon- α up-regulates this expression. *Haematologica.* 2000; **85** (2): 139-46.
- Mayani H, Flores-Figueroa E, Pelayo R, et al. Hematopoiesis. *Cancerología.* 2007; **2**; 95-107.
- Mayani H, Flores-Figueroa E and Chávez-González A. In vitro biology of human myeloid leukemia. *Leukemia Research.* 2009; **33**: 624-637.
- O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, Gathmann I, Baccarini M, Cervantes F, Cornelissen JJ, Fischer T, Hochhaus A, Hughes T, et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2003; **348**: 994-1004.
- Quah BJC, Parish CR. The Use of Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester (CFSE) to Monitor Lymphocyte Proliferation. *Journal of Visualized Experiments : JoVE.* 2010;(44):2259.
- Quintás-Cardama A and Cortes J. Molecular biology of bcr-abl1 positive chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2008; **113**: 1619-1630.
- Rauter J, Reuther G, Cortez D, Pendergast A and Baldwin A. A requirement for NF- κ B activation in BCR-ABL mediated transformation. *Genes Dev.* 1998; **12**: 961-968.
- Rohrbacher M., Hasford J. Epidemiology of chronic myeloid leukaemia (CML) Best Practice and Research: Clinical Haematology. 2009;22:295–302.
- Ross DM, Branford S, Seymour JF, Schwarzer AP, Arthur C, Yeung DT, et al. Safety and efficacy of imatinib cessation for CML patients with stable undetectable minimal residual disease: results from the TWISTER study. *Blood* (2013) 122:515–22.
- Savage DG and Goldman JM. Allografting for chronic myeloid leukemia. *Curr Opin Hematol.* 1997; **4**: 369-376.
- Sattler M and Griffin JD. Mechanism of Transformation by the BCR/ABL Oncogene. *Inter J Hematol.* 2001; **73**: 278-291.
- Sawyers CL. Chronic Myeloid Leukemia. *New Engl. J. Med.* 1999; **340**:1330-40.
- Sawyers C, Mc Laughlin J, Witte O. Genetic requirement for Ras in the transformation of fibroblast and hematopoietic cells by the BCR-ABL oncogene. *J. Exp. Med.* 1995. **181**: 307-313.

- Shaoguang L. Src-family kinases in the development and therapy of Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia and Lymphoma*. 2008; **49**: 19-26.
- Chu S, Mc Donald and Bathia R. Role of BCR-ABL-Y177-mediated p27kip1 phosphorylation and cytoplasmic localization in enhanced proliferation of chronic myeloid leukemia progenitors. *Leukemia*. 2010; **24**: 779-787
- Steinman R, Yaroslavzkiy B, Goff JP, Albers SM and Watkins SC. Cdk-inhibitors and exit from quiescence in primitive haematopoietic cell subsets. *Br. J. Haematol*. 2004. **3**: 358-65.
- Sweet K and Oehler V. Discontinuation of tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia: when is this a safe option to consider? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2013:184-8.
- Talpaz M. Interferon-alfa-based treatment of chronic myeloid leukemia and implications of signal transduction inhibition. *Semin Hematol*. 2001; **38**: 22-7.
- Talpaz M, Silver RT, Drucker BJ, Goldman JM, Gambacorti-Passerini C, Guilhot F, Schieffer CA, et al. Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic response in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia: results of a phase 2 study. *Blood*. 2002; **99**: 1928-1937.
- Talpaz M, Shah NP, Kantarjian H et al. Dasatinib in imatinib-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemias. *New Engl J Med* 2006; **354**(24): 2531–2541.
- Tkachuk DC, Westbrook CA, Andreff M, Talpaz M. Detection of bcr-abl fusion in chronic myelogenous leukemia by in situ hybridization. *Science*. 1990; **250**: 559-62.
- Tomoda K, Kato JY, Tatsumi E, Takahashi T, Matsuo Y, Yoneda-Kato N. The Jab1/COP9 signalosome subcomplex is a downstream mediator of Bcr-Abl kinase activity and facilitates cell-cycle progression. *Blood*. 2005; **105**: 775–783.
- Wassmann B, Klein SA, Scheuring U, Pfeifer H, Martin H, Gschaidmeier H, Hoelzer D, and Ottmann OG. Hematologic and cytogenetic remission by STI571 (Glivec) in a patient relapsing with accelerated phase CML after second allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2001; **28**: 721-724.
- Zhao RC, Jiang Y and Verfaillie CM. A model of human p210bcr/ABL-mediated chronic myelogenous leukemia by transduction of primary normal human CD34+ cells with a BCR/ABL-containing retroviral vector. *Blood*. 2001; **97**: 2406-2412.