

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa



Casa abierta al tiempo

TÍTULO

Caracterización del efecto de ISM1 sobre células leucémicas humanas

TESIS

**Que para obtener el grado de
Maestro en Biología Experimental**

Presenta:

Biol. Exp. William Alejandro Aguirre Guillén

Comité tutorial:

Codirector interno: Dr. Héctor Fernando Serrano

Codirector externo: Dr. Ricardo Valle Rios

Asesora: Dra. Paula Licon Limón

Febrero 2018

“El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”

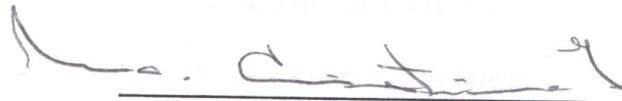
La presente investigación se realizó con el apoyo de CONACYT a través de la beca con número de registro 426295 y los Fondos Sectoriales (FOSISS) 261227.

Miembros del Jurado

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada: Caracterización del efecto de ISM1 sobre células leucémicas humanas, que presentó:

William Alejandro Aguirre Guillén

El día 8 de febrero del año 2018



Presidenta

Dra. María Cristina González Torres
Depto. de Ciencias de la Salud, UAM-I



Secretario

Dr. Oscar Medina Contreras
Hospital Infantil de México Federico Gómez



Vocal

Dra. en C. Irlanda Olvera Gómez
Hospital Nacional Homeopático



Vocal

Dra. Paula Licona Limón
Instituto de Fisiología Celular, UNAM



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00185

Matricula: 2153803815

CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE ISMI SOBRE CÉLULAS LEUCÉMICAS HUMANAS

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:00 horas del día 8 del mes de febrero del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. MARIA CRISTINA GONZALEZ TORRES
 DRA. IRLANDA OLVERA GOMEZ
 DRA. PAULA LICONA LIMON
 DR. OSCAR MEDINA CONTRERAS

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: WILLIAM ALEJANDRO AGUIRRE GUILLEN

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

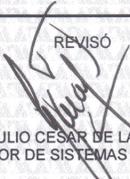
APROBAR

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



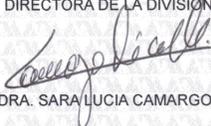

WILLIAM ALEJANDRO AGUIRRE GUILLEN
ALUMNO

REVISÓ



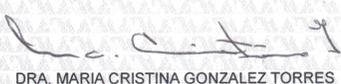
LIC. JULIO CÉSAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS



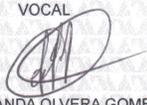
DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA



DRA. MARIA CRISTINA GONZALEZ TORRES

VOCAL



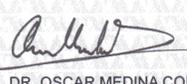
DRA. IRLANDA OLVERA GOMEZ

VOCAL



DRA. PAULA LICONA LIMON

SECRETARIO



DR. OSCAR MEDINA CONTRERAS

Comité tutorial

Codirector Interno

Dr. Héctor Fernando Serrano

Profesor titular

Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa

Email: hser@xanum.uam.mx

Codirector Externo

Dr. Ricardo Valle Rios

Profesor Asociado C TC

División de Investigación de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Unidad Periférica de Investigación en Cáncer e Inmunología. Hospital Infantil de

México Federico Gómez

Email vallerios@gmail.com

Asesora

Dra. Paula Licona Limón

Investigador Titular A de TC

Departamento de Biología celular y del Desarrollo

Instituto de Fisiología Celular UNAM

Email plicona@ifc.unam.mx

Dedicatorias

El presente trabajo se lo dedico a mi mamá Irene Guillén Mondragón, papá César Aguirre Hernández, tía Lourdes Guillén Mondragón y hermano Eduardo Aguirre Guillén por todo el apoyo que me han dado a través de mi vida académica y personal. Espero que sigamos apoyándonos para cultivar más éxitos y seguir creciendo con las experiencias que la vida nos proporcione. Los amo.

Aunque sé que no podrán leer éste trabajo, quiero dedicarlo a mis perrijos Horus, Fara y al nuevo integrante de la familia Dalí, que me han enseñado muchas cosas el tiempo que he convivido con ellos y siento su amor incondicional

Por último, quiero dedicar el trabajo a Blanca Patricia López por apoyarme durante todo el periodo de posgrado y animarme a cumplir todos mis objetivos. Te amo.

Agradecimientos

Al Dr. Ricardo Valle Rios, por todo su apoyo y enseñanzas para la realización del presente trabajo.

Al Dr. Héctor Fernando Serrano por sus consejos para la realización del proyecto.

A la Dra. Paula Licona Limón por sus valiosas aportaciones al proyecto durante las evaluaciones trimestrales.

A todos los investigadores del Laboratorio de Investigación en Inmunología y Proteómica del Hospital Infantil de México por sus aportes durante los seminarios para mejorar el proyecto.

A todos los estudiantes del grupo del Dr. Ricardo Valle Ríos por su apoyo dentro del laboratorio.

Resumen

Introducción

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es el tipo de leucemia más frecuente en individuos pediátricos, siendo la LLA-B la más común (80%-85%) en comparación a la LLA-T (10-15%). La tasa de supervivencia a 5 años de LLA infantil en países desarrollados es del 90%, mientras que, en México, es de aproximadamente 67%. El desarrollo de nuevos tratamientos contra nuevos blancos terapéuticos es necesario para reducir los efectos secundarios y mejorar la calidad de vida. En este sentido, la proteína de choque térmico GRP78, regulador de la vía UPR, ha demostrado relocalizarse hacia la membrana plasmática preferentemente en células cancerosas, donde actúa como receptor para un número creciente de ligandos promoviendo proliferación o muerte celular dependiendo del ligando. Bajo este contexto, se ha reportado que ISM1, una proteína de secreción de 60 kDa, interacciona con GRP78 en la superficie celular provocando una disfunción mitocondrial que lleva a la muerte celular por apoptosis en células cancerosas.

Material y Métodos

Con el fin de elucidar si ISM1 promueve un efecto proapoptótico en células de LLA que relocalizan GRP78 hacia la membrana plasmática, primero se determinó, a través de citometría de flujo, la presencia de la proteína en la superficie celular de líneas celulares de LLA- B, LLA- T y muestras de pacientes pediátricos al momento del diagnóstico con LLA. Una vez identificada la población GRP78+ en los modelos de estudio, se estimuló la población total de la línea RS4:11 y células leucémicas de individuos pediátricos con 1µg/mL y 5µg/mL de ISM1 recombinante de ratón

respectivamente. Para poder observar el efecto de ISM1 únicamente sobre las células leucémicas GRP78+, se purificaron a través de FACS o columnas inmunomagnéticas.

Resultados

La línea celular RS4;11 de LLA-B, tuvo la mayor frecuencia de células que relocalizan GRP78 con un $0.56\% \pm 0.041$ de la población en comparación a la línea celular Reh ($0.18\% \pm 0.069$) y que sus contrapartes de LLA-T; Jurkat ($0.16\% \pm 0.076$) y CCRF ($0.16\% \pm 0.063$). Las células de individuos pediátricos al diagnóstico con LLA, presentaron una mayor frecuencia de células GRP78⁺ en células de médula ósea $3.95\% \pm 1.38$ (n=7) comparadas con las obtenidas de sangre periférica $0.93\% \pm 0.69$ (n=3). Por su parte las células de individuo pediátrico sano tuvieron una frecuencia del 0.57%. El efecto proapoptótico de ISM1, sobre células RS4;11 y células de individuos pediátricos al momento de diagnóstico con LLA, no se logró correlacionar con la frecuencia inicial de células GRP78+ en la población total, sin embargo, en las últimas se observó una reducción en la frecuencia de células GRP78+ bajo el estímulo con ISM1 (11.58%) en comparación al control negativo (15.21%). Finalmente, la purificación de células GRP78+ a través de FACS y columnas inmunomagnéticas en ambos modelos de estudio no fue factible.

Conclusiones

El estudio determinó que, en frecuencias variables, las células leucémicas humanas relocalizan GRP78 hacia la membrana plasmática, teniendo una mayor frecuencia aquellas de médula ósea. El efecto proapoptótico de ISM1 sobre células leucémicas

GRP78+ no se logró determinar utilizando la población celular total, sin embargo, la reducción en la frecuencia de células GRP78+ en muestras de individuos pediátricos bajo el tratamiento con ISM1 sugiere la interacción ISM1-GRP78.

Abstract

Background

Acute lymphoblastic leukemia is the most common cancer among children. ALL-B accounts for about 80-85% whereas ALL-T represents about 10-15% of cancer diagnoses. The 5-year survival rate in developed countries is around 90% while in Mexico is about 67%. Development of innovative treatments against novel therapeutic targets is necessary to reduce side effects and improve quality of life. In this context, GRP78, an important molecular chaperone in UPR signaling, can relocate preferably to the cell surface of cancer cells where it complexes with specific proteins triggering proliferation or cell death. In this sense, it was reported that ISM1, a secreted 60-kDa protein, upon binding GRP78 on the cell surface of cancer cells triggers apoptosis by inducing mitochondrial dysfunction.

Materials and methods

In order to elucidate if ISM1 induces apoptosis on leukemic cells that express GRP78 on the cell surface, the presence of this protein on human leukemia cell lines in both ALL- B and in ALL-T was determined by flow cytometry. In addition, GRP78 was determined on leukemia cells from bone marrow and peripheral blood obtained of ALL patients at the time of initial diagnosis. Once identified, GRP78⁺ total cell populations in both cell lines and ALL patients were treated with 1µg/mL y 5µg/mL of rISM1, respectively. Finally, with the purpose of providing a clear effect, GRP78⁺ leukemic cells were isolated by FACS or MACS.

Results

The B-lineage ALL cell line RS4:11 showed the higher cell frequency, between cell lines, that relocalize GRP78 to the cell surface ($0.56\% \pm 0.041$) in comparison with cell line Reh ($0.18\% \pm 0.069$), Jurkat ($0.16\% \pm 0.076$) and CCRF ($0.16\% \pm 0.063$). On the other hand, primary leukemic cells from bone marrow of ALL patients at the time of initial diagnosis had a GRP78⁺ cell frequency about $3.95\% \pm 1.38$ (n=7) which is higher than peripheral blood $0.93\% \pm 0.69$ (n=3). Additionally, bone marrow cells from a healthy donor had a GRP78⁺ cell frequency about 0.57%. The proapoptotic effect of ISM1 on GRP78⁺ leukemic cells from the RS4;11 cell line and childhood ALL patients could not be correlated with initial frequency of cells expressing GRP78 on the plasma membrane, however, there was a decrease in GRP78 positive cells around 11.58% under treatment with ISM1 around when compared with control (15.21%). Finally, purification of GRP78⁺ leukemic cells by FACS or MACS involving both models was not feasible.

Conclusions

The present study determined that acute lymphoblastic leukemia cells can relocalize GRP78 to the cell surface at different frequencies, being the highest expression in bone marrow leukemic cells. The proapoptotic effect of ISM1 on GRP78⁺ cells could not be determined, however, a decrease in GRP78 positive cells after treatment suggests an ISM1-GRP78 interaction.

Índice

1	Introducción	1
1.1	Hematopoyesis	1
1.2	Microambiente hematopoyético	1
1.3	Trastornos hematológicos	2
1.4	Leucemias	3
1.5	Leucemia linfoblástica aguda	3
1.6	Biología de la leucemia linfoblástica aguda	4
1.7	Tratamiento para la leucemia linfoblástica aguda	6
1.8	Blancos terapéuticos	7
1.9	Respuesta celular al estrés UPR y la proteína regulada por glucosa de 78kDa (GRP78)	8
2	Antecedentes	14
2.1	Isthmin 1	14
2.2	Efecto proapoptótico de Isthmin 1	15
3	Justificación	17
4	Hipótesis	18
5	Objetivo General	19
6	Objetivos Particulares	19
7	Material y métodos	19
8	Resultados	26
9	Discusión	49

10 Conclusiones	58
11 Perspectivas	58
12 Bibliografía	59

1. Introducción

1.1 Hematopoyesis

La hematopoyesis es el proceso a través del cual todos los linajes celulares de la sangre son formados a partir de las células troncales hematopoyéticas (CTHs)(Kawahara and Shiozawa, 2015). El sistema hematopoyético puede ser dividido en cuatro compartimentos con base en el grado de madurez de las células que lo conforman. El primer compartimento lo forman las CTHs (quiescentes, con capacidad de auto-renovación y multipotentes). El segundo compartimento lo conforman las células progenitoras hematopoyéticas (CPHs), que han perdido su capacidad de auto-renovación, pero conservan su potencial proliferativo. Dentro de este grupo encontramos a las células progenitoras mieloides comunes (CPM) y las células progenitoras linfoides comunes (CPL). Las primeras dan origen a eritrocitos, monocitos, megacariocitos y granulocitos, mientras que las CPL dan lugar a linfocitos T, linfocitos B, células NK y células dendríticas. Las CPHs se diferencian a células precursoras, conformando el tercer compartimento, mientras que el último compartimento lo conforman las células sanguíneas maduras circulantes (Mayani H, 2007, Liu et al., 2007a).

1.2 Microambiente hematopoyético

En la vida postnatal, la formación de las células de la sangre tiene lugar principalmente en la médula ósea (Mayani, 2003). La estructura de este tejido consiste de una corteza rígida de hueso que encierra una cavidad conteniendo un sistema vascular arterial, un sistema sinusoidal complejo, células hematopoyéticas y el estroma (Nair et al., 2010). Las células del estroma derivan de células troncales

multipotentes llamadas células troncales mesenquimales (CTM) que se diferencian a osteoblastos, fibroblastos, adipocitos y condrocitos (Seke Etet et al., 2013).

El nicho de las células troncales hematopoyéticas regula las funciones de las CTHs a través del contacto directo célula-célula y/o por secreción de citocinas y factores de crecimiento (Kawahara and Shiozawa, 2015). La viabilidad, auto-renovación, proliferación, compromiso y diferenciación de las CTHs dependen tanto de elementos intrínsecos (factores de transcripción, reguladores del ciclo celular) como extrínsecos, que incluyen factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas secretadas por células accesorias hematopoyéticas (fibroblastos, células endoteliales, macrófagos y osteoblastos), órganos no hematopoyéticos (hígado y riñón) y linfocitos T normales (Janowska-Wieczorek et al., 2001).

1.3 Trastornos hematológicos

La médula ósea no solamente tiene que generar un extraordinario número de células, sino también, debe de producirlas en proporciones adecuadas (Wertheim and Bagg, 2014). Dado que la sangre es uno de los tejidos con una alta tasa de regeneración (aproximadamente 10^{12} de células son generadas diariamente en la médula ósea humana adulta), alteraciones en algunos de los compartimentos celulares del sistema hematopoyético, sobre todo en los más primitivos, llevan a modificaciones en la producción de células circulantes normales, abatiéndola o incrementándola (Doulatov et al., 2012, Mayani H, 2007). Los trastornos hematológicos están típicamente agrupados en dos categorías; trastornos no malignos tales como anemias, inmunodeficiencias primarias, síndromes

mielodisplásicos/mieloproliferativos y malignos como son la Leucemia mieloblástica aguda (LMA) y Leucemia linfoblástica aguda (LLA)(Doulatov et al., 2012)

1.4 Leucemias

Las leucemias son un grupo clínica y biológicamente heterogéneo de neoplasias malignas que se manifiestan como una proliferación clonal de una sola célula hematopoyética en diferente estado de diferenciación (mieloide o linfoide). Las células transformadas adquieren una capacidad ilimitada para auto-renovarse y, en el caso de leucemias de tipo agudo, pierden la capacidad de diferenciarse en células maduras debido a que presentan una alteración en los mecanismos de diferenciación, resultando en un exceso de células inmaduras que tiene como consecuencia un fallo funcional de la médula ósea(Brown et al., 2012). Las leucemias se clasifican en cuatro subgrupos de acuerdo con criterios clínicos y de linaje celular: leucemia mieloide crónica (LMC), leucemia linfoide crónica (LLC), leucemia mieloide aguda (LMA) y leucemia linfoblástica aguda (LLA)(Brown et al., 2012).

1.5 Leucemia linfoblástica aguda

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) comprende una heterogeneidad de trastornos hematológicos malignos que se derivan, tanto de células progenitoras B (LLA-B) como de células progenitoras T (LLA-T). Las células más comunes presentes en pacientes con LLA son precursores de tipo B que representan el 80%-85% de casos de LLA, afectando principalmente a niños con un pico de incidencia de 2-5 años de edad. La LLA de tipo T, es el segundo tipo más común con alrededor del 10-15% de

casos en niños y está frecuentemente asociado con mal pronóstico(Dorantes-Acosta et al., 2012a, Rivera-Luna et al., 2014, Chiarini et al., 2016).

El cáncer infantil a nivel global representa entre el 0.5% y 4.6% del número total de casos en la población, siendo la leucemia linfoblástica aguda el cáncer más común y la causa de muerte más frecuente en niños menores de veinte años, contando con una incidencia estimada de 20 a 30 casos por millón de habitantes al año. En México, el cáncer infantil es la segunda causa de muerte en niños entre 4 y 15 años de edad, teniendo una incidencia de 49.5 casos nuevos por millón de habitantes al año(Dorantes-Acosta et al., 2012a, Rivera-Luna et al., 2014, Mario Enrique Rendón-Macías, 2012). La tasa de sobrevivencia de LLA infantil ha mejorado significativamente en los últimos años, destacando el 90% de sobrevivencia a 5 años en países desarrollados. En México, la sobrevivencia es de aproximadamente 67%, permaneciendo un gran porcentaje de pacientes pediátricos que mueren a consecuencia de la resistencia de la enfermedad al tratamiento y de las complicaciones derivadas del mismo(Miguel Angel Villasís Kever, 2012). En los últimos años ha existido un avance importante en el tratamiento de los niños con LLA, principalmente por la incorporación de nuevos medicamentos de quimioterapia y la eficiencia del manejo integral de diagnóstico y apoyo terapéutico(Dorantes-Acosta et al., 2012a, Rivera-Luna et al., 2014, Dorantes-Acosta et al., 2012b).

1.6 Biología de la leucemia linfoblástica aguda.

Los eventos patogénicos precisos que llevan al desarrollo de la LLA son desconocidos, sin embargo, exposiciones endógenas (ej. inflamación), exógenas (ej. infección) y susceptibilidad genética (ej. Síndrome de Down), son las probables

causas para el desarrollo de esta neoplasia. El desafío en este contexto es identificar las exposiciones y las variantes genéticas heredadas para descifrar cómo y cuándo estos factores contribuyen a la LLA desde el inicio (usualmente en útero) y a través de la evolución de la enfermedad (Pui et al., 2008) (Inaba et al., 2013).

Los perfiles de alta resolución de alteraciones genéticas han transformado la comprensión de las bases genéticas que modulan la LLA. En la gran mayoría de los casos de LLA en niños, se albergan graves alteraciones cromosómicas. Por ejemplo, en la LLA de tipo B, estas alteraciones incluyen alta hiperdiploidía con ganancia aleatoria de por lo menos cinco cromosomas (incluyen los cromosomas 4, 6, 10, 14, 17, 18 y 21), hipodiploidía (< 44 cromosomas) y translocaciones cromosómicas recurrentes tales como: t(12;21)(p13;q22) que resulta en el gen de fusión ETV6–RUNX1, t(1;19)(q23;p13) dando origen a TCF3–PBX1, t(9;22)(q34;q11) que da lugar al gen de fusión BCR–ABL1, reordenamientos del gen MLL en 11q23 con amplio catálogo de genes asociados y reordenamientos de MYC hacia el gen del receptor de antígeno (Inaba et al., 2013). También, las translocaciones cromosómicas están presentes en aproximadamente 50% de los pacientes con LLA-T, derivando en la yuxtaposición de oncogenes hacia los genes del receptor de células T (TCR), que lleva a la sobreexpresión del oncogén en células progenitoras de células T (ej. TLX1-TCRdelta), mientras que otras, resultan en la fusión de dos oncogenes factores de transcripción (ej. STIL-TAL1). Estudios de expresión génica han identificado cuatro principales subtipos de LLA-T con base en la activación de la vía oncogénica dominante reconociendo a los subtipos: TLX1, LYL1, TAL/LMO2 y TLX3. Adicionalmente, la activación constitutiva de la vía de señalización NOTCH está

presente en más del 50% de los pacientes con T-ALL y no está restringido a subtipos específicos de LLA-T (Bhojwani et al., 2015).

Muchos reordenamientos cromosómicos alteran genes que regulan la hematopoyesis normal, encienden oncogenes o activan proteínas tirosina-cinasa constitutivamente. Sin embargo, muchas de estas alteraciones por sí solas no inducen leucemia en modelos experimentales, sugiriendo que alteraciones genéticas adicionales contribuyen al desarrollo de la leucemia. (Inaba et al., 2013). Algunas de estas lesiones genéticas complementarias tienen significancia terapéutica y valor pronóstico, pudiendo ser utilizadas para refinar esquemas de estratificación de riesgo en el futuro; por ejemplo, supresión de IKZF1 predice un mal pronóstico en niños con LLA-B. En adición, el reconocimiento de lesiones moleculares específicas y vías oncogénicas críticas, guiará el camino para el desarrollo de nuevos blancos terapéuticos (Bhojwani et al., 2015).

1.7 Tratamiento para la leucemia linfoblástica aguda.

El tratamiento para la leucemia linfoblástica aguda típicamente consiste en tres fases: 1) fase de inducción-remisión, 2) fase de intensificación y 3) terapia de continuación para disminuir la reincidencia. El objetivo principal de la primera fase es eliminar más del 99% de células leucémicas con la administración de prednisona o dexametasona, vincristina o asparaginasa y restaurar la hematopoyesis normal. La etapa de intensificación generalmente se lleva a cabo para erradicar las células leucémicas residuales resistentes y consiste en la administración de altas dosis de metotrexato, mercaptopurina y pulsos de los medicamentos utilizados en la primera etapa, todo esto de acuerdo con el tipo de LLA. Por último y por razones que

permanecen aún por descubrir, pacientes con LLA necesitan un tratamiento de continuación para prevenir la reincidencia, recibiendo quimioterapia por 2 a 2.5 años. Mercaptopurina y metotrexato constituyen la base de los regímenes de continuación (Pui et al., 2008).

1.8 Blancos terapéuticos

Los protocolos para el tratamiento de la LLA en pacientes pediátricos son efectivos en un 80-90%, sin embargo, la eficacia de éstos debe ser mejorada debido a que los efectos adversos relacionados con el tratamiento sustancialmente alteran la calidad de vida del paciente. Debido a esto, el desarrollo de nuevos tratamientos que tengan como blanco específico a las células leucémicas son necesarios con el fin reducir los efectos secundarios y mejorar la sobrevida de los pacientes con LLA. Imatinib ha revolucionado el tratamiento de la LLA positiva para BCR-ABL1 ya que inhibe la tirosina cinasa ABL1 y que, combinada con quimioterapia, mejoran la calidad de la remisión (Szczepański et al., 2010). Estudios genómicos recientes han identificado nuevas alteraciones genéticas dentro de la LLA, algunas de las cuales tienen relevancia clínica y otras podrían servir como blancos terapéuticos en la LLA infantil. Identificación de mutaciones activadoras de las cinasas Janus en LLA de alto riesgo ha llevado al desarrollo de inhibidores de proteínas Jak (Ruxolitinib) que, aunado con inhibidores de Flt3 (Sorafenib, Crenolanib) e inhibidores de DNA metiltransferasas/histona desacetilasas podrían formar parte de los nuevos blancos terapéuticos contra la progresión de la LLA (Pui et al., 2012).

La comprensión del perfil de proteínas expresado en la membrana plasmática de las células, provee un mejor entendimiento de la manera en la cual el proteoma de la

membrana celular es regulado y cómo éste responde a una gran variedad de señales tanto intracelulares como extracelulares. En cáncer, las proteínas de la superficie celular que están restringidas a ciertos tipos de cáncer o que experimentan modificaciones en su configuración podrían ser utilizadas para las terapias basadas en el uso de anticuerpos. Por otro lado, vías de señalización reguladas por proteínas de superficie celular o receptores, podrían también ser blancos para terapias basadas en fármacos (Shin et al., 2003).

1.9 Respuesta celular al estrés UPR (Unfolded Protein Response; Respuesta a Proteínas mal plegadas) y la proteína regulada por glucosa de 78kDa (GRP78).

Las células cancerosas se caracterizan por tener un metabolismo de glucosa elevado y, en el caso de tumores sólidos, un microambiente tumoral caracterizado por privación de glucosa, acidosis y una severa hipoxia. Combinación de estos factores estresantes llevan a la acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo endoplásmico, desencadenando la respuesta UPR, cuya función es promover principalmente la sobrevivencia celular (Lee, 2007). La vía UPR es un mecanismo conservado evolutivamente por el cual las células responden a condiciones de estrés que tienen como blanco el retículo endoplásmico teniendo amplios efectos celulares que incluyen; reducción de síntesis de proteínas global y arresto del ciclo celular, activación de genes involucrados en la UPR (GRP78, GRP94, CHOP, Nrf2), inhibición de apoptosis si el estrés es leve y reversible o la iniciación de vías apoptóticas si el estrés es severo o prolongado (Baumeister et al., 2005, Fulda et al., 2010, Scriven et al., 2009, Lee, 2007). La UPR está mediada por tres sensores moleculares presentes en la membrana del retículo endoplásmico; PERK (protein

kinase RNA-like ER kinase), ATF6 (activated transcription factor 6) e IRE1 α (inositol-requiring enzyme 1 alpha)(Ojha and Amaravadi, 2017). Bajo condiciones de homeostasis, PERK está asociado con GRP78 en forma de monómero, sin embargo, cuando hay un estímulo estresante, PERK se autofosforila y se disocia de GRP78 permitiendo su oligomerización y activación. Una vez activa, PERK fosforila a eIF2 α reduciendo la síntesis de proteínas e incrementando la transcripción selectiva y traducción del factor de transcripción ATF4 resultando en la activación de genes involucrados en la biosíntesis y transporte de aminoácidos, autofagia, enzimas antioxidantes (a través de Nrf2) y supervivencia a través de NF κ B. Al igual que PERK, la activación de ATF6 depende de su disociación con GRP78 en el retículo endoplásmico y su subsecuente escisión por las proteasas SP-1 y SP-2 resultando en la liberación de su fragmento N-terminal que actúa como factor de transcripción para genes de la UPR. Por último, después de la disociación con GRP78, IRE1 se autofosforila y dimeriza para catalizar la reacción de splicing del mRNA que codifica para el factor de transcripción XBP1 el cual actúa como factor de transcripción para genes relacionados con la maquinaria de degradación de proteínas asociadas al RE, componentes del tráfico intracelular de proteínas, glicosilasas, oxidoreductasas para la adecuada homeostasis del RE entre otros.(Cubillos-Ruiz et al., 2017, Ojha and Amaravadi, 2017, Fulda et al., 2010). Se ha demostrado que la vía de señalización UPR está activa en células cancerosas en distintos modelos de cáncer desempeñando funciones citoprotectoras que tienen que ver con la supervivencia, proliferación y quimioresistencia. En modelos de cáncer de mama, la expresión de

moléculas referentes a la UPR como son GRP78 y XBP1 demostraron estar presentes en más del 76% y 90% de muestras de cáncer de mama respectivamente. Además, la activación *In vitro* de la UPR en este modelo indujo resistencia a fármacos como la Doxorubicina y el 5-fluorouracil(Scriven et al., 2009). En modelos de hepatocarcinoma, la activación de la UPR, medida por la sobreexpresión de GRP78, estuvo presente en 66% del total de las muestras analizadas, que al igual que en cáncer de mama, hubo una quimioresistencia al inducir farmacológicamente la UPR(AI-Rawashdeh et al., 2010). Con respecto a neoplasias hematológicas, se observó que hay una sobreexpresión a nivel de mRNA de GRP78 y XBP1 en células leucémicas Bcr-Abl positivas y que la inhibición de proteínas como IRE1 α o ATF6 en células mutantes disminuyó la capacidad de las células de recuperarse de la apoptosis inducida por Imatinib, sugiriendo que la UPR juega un papel anti-apoptótico en células leucémicas Ph⁺(Tanimura et al., 2009). Aunado a esto, estudios utilizando muestras de pacientes con LLA al tiempo de diagnóstico, tanto de adultos (LLA Ph⁺) como de individuos pediátricos con LLA de alto riesgo, mostraron una alta expresión del mRNA de XBP1, correlacionando con un mal resultado clínico(Kharabi Masouleh et al., 2014). Complementando el papel de la UPR en leucemias, se ha revelado que células de pacientes pediátricos (18 de 27 pacientes) con LLA-B en su primera recaída muestran un incremento de 2.6 ± 0.7 veces en la expresión del gen GRP78 en comparación a las clonas leucémicas de los mismos pacientes al tiempo de su diagnóstico inicial. Estos resultados sugieren que la UPR, específicamente

GRP78, podría ser un nuevo blanco terapéutico para el tratamiento de leucemias(Uckun et al., 2011, Wey et al., 2012b).

La proteína regulada por glucosa de 78kDa (GRP78), también referida como proteína de unión a inmunoglobulina (Bip), es una proteína que se expresa constitutivamente en el retículo endoplásmico y participa en muchos procesos celulares tales como: apropiado doblaje y ensamblaje de proteínas, transporte de polipéptidos a través del RE, marcado de proteínas mal plegadas para el sistema de degradación asociado al RE, regulación de la homeostasis del Ca^{2+} y actúa como el regulador maestro de la vía de señalización UPR(Zhang et al., 2010, Zhang et al., 2013b). Bajo condiciones normales, GRP78 se une constitutivamente a los sensores UPR: PERK, IRE1 y ATF6 manteniéndolos en su forma inactiva, sin embargo, en condiciones de estrés, GRP78 se libera de los sensores provocando la activación de los mismos y desencadenando señales anti-apoptóticas. Es importante hacer notar que, si la homeostasis en el retículo endoplásmico no se restablece, la respuesta UPR es capaz de inducir apoptosis (Pfaffenbach and Lee, 2011). La inducción de GRP78 en células cancerosas como se describió anteriormente favorece la supervivencia celular, progresión del tumor y confiere resistencia a fármacos tanto en células en proliferación como quiescentes(Zhang et al., 2013b).

GRP78 es una proteína altamente conservada de 654 aminoácidos que incluye un péptido señal en la región N-terminal, un dominio ATPasa, un dominio de unión a péptidos y un motivo KDEL en su extremo C-terminal. Tradicionalmente GRP78 ha sido considerada como una proteína luminal del RE debido a su región KDEL, empero, se ha observado que puede localizarse particularmente en la membrana

plasmática de células cancerosas(Zhang et al., 2013b). El descubrimiento de que GRP78 puede encontrarse en la membrana plasmática de células cancerosas pero no en células normales, abre la excitante oportunidad de utilizarlo como un marcador neoplásico, ya que la proteína está constitutivamente localizada en la superficie celular en poblaciones variantes en frecuencia entre diversos modelos de cáncer. Así lo demostró un estudio proteómico revelando la presencia de GRP78 en la superficie celular en diversas líneas celulares de distintos tipos de cáncer; SH-SY5Y (neuroblastoma), Lo Vo (cáncer de colon), A549 (cáncer de pulmón), Sup-B15 (LLA-B) entre otras(Shin et al., 2003, Arap et al., 2004, Burikhanov et al., 2009, Zhang et al., 2013a, Liu et al., 2007b, Davidson et al., 2005, Scriven et al., 2009). El mecanismo por el cual GRP78 se dirige hacia la superficie celular de células cancerosas no ha sido completamente establecido. Estudios utilizando la línea celular HeLa demostraron que, la relocalización depende de la integridad de la TGN (trans-Golgi network), sin embargo, en células de la línea HCT-116 se observó que la relocalización de GRP78 es independiente de la red TGN, sugiriendo un mecanismo alternativo no esclarecido(Tsai et al., 2015).

Aunque la función fisiológica de GRP78 en la superficie celular dista de ser totalmente comprendida, se ha obtenido evidencia de que GRP78 puede formar complejos con proteínas específicas en la membrana plasmática desencadenando señales involucradas en procesos oncogénicos como son: sobrevivencia, proliferación, invasión, metástasis y quimioresistencia(Zhao et al., 2015, Tsai et al., 2015). La unión de la forma activa de la proteína inhibidora de proteasas α_2 Macroglobulina a GRP78 en la membrana plasmática en la línea celular de cáncer

de próstata 1-LN desencadena la proliferación y supervivencia de las células cancerosas a través de la activación de la vía PI3K/AKT , NF- κ B y UPR(Misra et al., 2006). De igual forma, la proteína Cripto (oncoproteína involucrada con el desarrollo embrionario, función de células troncales y progresión de cáncer) promueve la proliferación de células cancerosas a través de la unión con GRP78 y la modulación de la inhibición de la vía TGF β /Smad2/3 y la activación de la vía MAPK/PI3K (Kelber et al., 2009). Por otro lado, la interacción de GRP78 con otros ligandos desencadena respuestas proapoptóticas, tal es el caso de Par-4 y Kringle 5. Investigaciones han demostrado que Par-4 (Prostate apoptosis response-4), proteína proapoptótica secretada por células cancerosas en cultivo, interacciona con GRP78 en la membrana plasmática de la línea celular PC-3 desencadenando un proceso apoptótico extrínseco a través de la activación de la vía FAAD/caspasa-8/caspasa-3(Burikhanov et al., 2009). Kringle 5 (K5), un potente inhibidor angiogénico, demostró interaccionar con GRP78 expuesto en la superficie celular de células tumorales en estrés (hipóxico y citotóxico) y células endoteliales en proliferación desencadenando muerte celular por apoptosis. El mecanismo por el cual K5 tiene su efecto sugiere la activación de la caspasa 7 como resultado de la interacción GRP78-K5 y su subsecuente internalización(Davidson et al., 2005). Actualmente, se han desarrollado diferentes protocolos experimentales contra diferentes tipos de cáncer que tienen como blanco GRP78 en superficie celular, implicando el uso de nanopartículas acopladas con anticuerpos monoclonales contra GRP78 para la liberación específica de fármacos como el 5-fluorouracilo u oligopéptidos como Pep42 el cual se une

específicamente a GRP78 de superficie celular para decargar moléculas anticancerígenas (proteínas, oligopéptidos, siRNAs, liposomas) en células cancerosas(Liu et al., 2007b, Zhao et al., 2015).

2. Antecedentes

2.1. Isthmin

Isthmin (ISM1) es una proteína de secreción de 60 kDa originalmente identificada durante el desarrollo embrionario de *Xenopus laevis*, específicamente en la región MHB (midbrain-hindbrain boundary) u organizador isthmus. Se han identificado genes ortólogos de Isthmin en otros vertebrados incluyendo humano y ratón cuyos locus se encuentran en el cromosoma 20 y 2 respectivamente(Pera et al., 2002). Análisis de secuencia han indicado que ISM1 tiene en su estructura un péptido señal en la región N-terminal, un dominio central Trombospondina (TSR) tipo 1 y un dominio C-terminal llamado dominio asociado a la adhesión en MUC4 y otras proteínas o AMOP. El dominio TSR entre humano y ratón está altamente conservado, teniendo un 98% de identidad y un 87-88% entre ratón y pez cebra o ratón y *Xenopus*. También, el dominio AMOP está altamente conservado con un 99% de identidad entre ratón y humano; 91% entre ratón y *Xenopus* y un 85% entre ratón y pez cebra. La región N-terminal es más divergente con un 85% de identidad entre humano y ratón y un 62% entre ratón y *Xenopus*(Xiang et al., 2011). Se ha demostrado que ISM1 actúa como un inhibidor angiogénico; así lo indicaron experimentos en donde ISM1 recombinante de ratón inhibe la formación de la red capilar de células endoteliales (HUVECs) a través de la inducción de apoptosis dependiente de caspasa 8, resultado de la interacción de su dominio AMOP con la

integrina $\alpha V\beta 5$. Asimismo, se observó que la sobreexpresión ectópica de ISM1 en células B16 de melanoma, significativamente redujo el crecimiento del tumor a través de la inhibición del proceso angiogénico en un modelo *in vivo*. Inhibición del proceso angiogénico y su subsecuente reducción en el crecimiento de tumor por parte de ISM1 se ha demostrado también en modelos de gliomas (Xiang et al., 2011, Zhang et al., 2011, Yuan et al., 2012). Análisis de una base de datos de expresión génica humana (body index of gene expression (BIGE)) reveló la producción de ISM1 en poblaciones de linfocitos. Se encontró que linfocitos T $CD4^+$ activados tanto de humano como de ratón producen ISM1, siendo mayor su producción en linfocitos T $CD4^+$ cooperadores polarizados hacia el linaje Th17 *in vitro*. Además, se determinó que células NK y tipo NKT localizadas en pulmón de ratón también producen ISM1. Los tipos celulares productores de ISM1 sugieren que la proteína podría tener participación en respuestas inmunes innatas y adquiridas. Otro de los sitios donde se observó una fuerte producción de ISM1 fue en piel y mucosas; como el pulmón y el intestino, sugiriendo que ISM1 tiene un papel importante en las funciones de barrera de los epitelios contra patógenos (Valle-Rios et al., 2014).

2.2 Efecto proapoptótico de Isthmin 1

Como se mencionó anteriormente, estudios han reportado que ISM1 actúa como un inhibidor de la angiogénesis y promueve apoptosis a través de su interacción con la integrina $\alpha v\beta 5$ que funciona como un receptor de baja afinidad ($K_d \approx 40 \mu M$) en la superficie de células endoteliales. Sin embargo, los mecanismos responsables de

estos procesos aún no se han elucidado por completo(Chen et al., 2014, Zhang et al., 2011).

Estudios posteriores utilizando células HUVEC y técnicas de co-inmunoprecipitación, demostraron que GRP78 en la superficie celular es el receptor de alta afinidad ($K_d \approx 8.6$ nM) de ISM1 recombinante. El resultado de la interacción ISM1-GRP78 resultó en la inhibición de la formación de la red capilar a través de la inducción de apoptosis de las células HUVEC, disminuyendo sus efectos con la presencia de anti-GRP78 de una forma dosis-dependiente. Por otro lado, la sobreexpresión transitoria de GRP78 y subsecuente relocalización hacia la membrana plasmática en la línea celular LS174T sensibilizó a las células al proceso apoptótico inducido por ISM1 y no así en células que presentan bajos o nulos niveles de GRP78 en la superficie celular(Chen et al., 2014). Experimentos de fraccionamiento celular con tritón en células HUVEC tratadas con ISM1 demostraron que el proceso proapoptótico mediado por ISM1 involucra la internalización dependiente de clatrina del complejo ISM1-GRP78, además, la neutralización con anti-GRP78 redujo la internalización de una forma dosis dependiente. Una vez endocitado, el complejo se dirige hacia la membrana interna de la mitocondria, sin embargo, el mecanismo por el cual el complejo apunta hacia este organelo no está caracterizado. Ensayos de co-inmunoprecipitación revelaron que el complejo ISM1-GRP78 interacciona con transportadores mitocondriales de ADP/ATP (AAC2 y AAC3) en la membrana interna mitocondrial bloqueando el intercambio de ADP citosólico contra ATP mitocondrial. La disfunción mitocondrial inducida por ISM1-GRP78 disminuye la concentración de ATP citosólico

causando apoptosis(Chen et al., 2014). De manera interesante, administración sistémica de ISM1 recombinante en ratones BALB/C con xenotrasplante de células 4T1(cáncer de mama) y B16 (melanoma) mostró la significativa reducción del crecimiento y vascularización del tumor a través de la inducción de apoptosis vía ISM1-GRP78. Estos experimentos sugieren que ISM1 podría tener un efecto antitumoral específico hacia células cancerosas (Chen et al., 2014). Investigaciones recientes han determinado que ISM1 actúa como un inductor de la permeabilidad vascular pulmonar, demostrándose que la interacción ISM1-GRP78 lleva a la interacción directa de GRP78 con la cinasa Src citoplasmática desencadenado su activación(Venugopal et al., 2015).

El uso de ISM1 como molécula antitumoral, representaría una alternativa viable a los tratamientos que existen contra diferentes tipos de neoplasias, así como también, en procesos aún por explorar como lo es la permeabilidad vascular, que es crítica para procesos como: inmunovigilancia, inflamación, arterioesclerosis u otras condiciones patológicas(Venugopal et al., 2015).

3 Justificación

El cáncer es la segunda causa de muerte en niños de 1-4 años y la LLA tiene un impacto importante sobre la mortalidad en niños mexicanos, ya que ocupa el primer lugar entre todos los padecimientos oncológicos. Gracias a las mejoras en las herramientas de diagnóstico y a los protocolos de tratamiento, se ha alcanzado una supervivencia superior al 80% en países desarrollados, sin embargo, aún existe alrededor del 10% de pacientes pediátricos que mueren a consecuencia de la resistencia de la enfermedad al tratamiento y de las complicaciones derivadas del

mismo. Bajo este contexto, la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos y el desarrollo de nuevas moléculas con capacidad antitumoral contra la LLA, deben de considerarse para implementar nuevas alternativas de terapia que tengan menos efectos secundarios y una mayor efectividad para que los pacientes con LLA tengan una mejor calidad de vida. En este sentido, se ha observado que el receptor GRP78, una proteína que normalmente se localiza en el retículo endoplásmico, se relocaliza hacia la membrana plasmática de células cancerosas convirtiéndola así, en un posible biomarcador y/o blanco terapéutico contra la LLA. Adicionalmente, se sabe que ISM1, una proteína que se expresa de manera constitutiva en células capaces de eliminar tumores, interacciona con la proteína GRP78 relocalizada hacia la membrana plasmática de células cancerosas, desencadenando un efecto proapoptótico. Por lo tanto, la evaluación de la capacidad de ISM1 para inducir apoptosis en células de LLA permitirá obtener información relevante acerca de la función biológica de la misma, así como su posible uso como agente antitumoral natural. La caracterización de los efectos que ISM1 pudiera tener sobre células de LLA no se ha reportado, es por esto que en el presente trabajo se planea caracterizar el efecto de la interacción ISM1-GRP78 en células leucémicas de individuos pediátricos.

4 Hipótesis

La interacción ISM1-GRP78 induce un efecto proapoptótico en células leucémicas de individuos pediátricos.

5 Objetivo general

Caracterizar el efecto de ISM1 sobre células leucémicas purificadas, que relocalizan GRP78 hacia la membrana plasmática, de individuos pediátricos al momento de diagnóstico con LLA.

6 Objetivos particulares

- Determinar la relocalización de GRP78 hacia la membrana plasmática en líneas celulares de LLA.
- Determinar la presencia de GRP78 en la membrana plasmática de células leucémicas de individuos pediátricos al momento del diagnóstico con LLA.
- Determinar el efecto proapoptótico que ISM1 tiene sobre células leucémicas que relocalizan GRP78 hacia la membrana plasmática de individuos pediátricos al diagnóstico con LLA.

7 Material y métodos

- **Proteína recombinante ISM1**

La proteína ISM1 recombinante de ratón utilizada para los experimentos de estimulación fue adquirida de la marca BioLegend (577502)

- **Líneas celulares y condiciones de cultivo**

Se utilizaron líneas celulares originadas a partir de células de individuos con leucemia linfoblástica aguda de tipo B (RS4;11 y Reh) y LLA de tipo T (CCRF y Jurkat). Las células fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (SIGMA-ALDRICH) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino, 1mM de Piruvato de Sodio (GIBCO) y

1% de Penicilina/estreptomicina(Gibco), manteniéndose a 37°C en una atmósfera húmeda al 5% de CO₂.

- **Tinción de superficie para citometría y microscopía de flujo de la proteína GRP78 en líneas celulares de LLA**

Las líneas celulares utilizadas para los experimentos fueron cultivadas y mantenidas a una densidad de 1×10^5 - 1×10^6 células/mL (lineamientos de la ATCC). Para cada experimento, las células fueron contabilizadas con azul de tripano utilizando la Cámara de Neubauer y fueron colocadas 1×10^6 células para las tinciones de superficie. Las células fueron centrifugadas a 1500 rpm 5 minutos a 4°C y resuspendidas en un volumen de 100µL de PBS al 2% de suero fetal bovino (solución de tinción). A cada tubo se le agregó 1µg de Gammaglobulinas para asegurar el bloqueo de los receptores Fc y se dejaron incubar por 10 minutos en hielo. Terminado el tiempo, 1×10^6 células fueron adicionadas con 500ng de IgG2b Alexa Flúor 488 (eBioscience), 1×10^6 células con 500ng de Anti-human GRP78 Alexa Fluor 488 (eBioscience) y 1×10^6 células se mantuvieron sin teñir para después dejarlas incubar en oscuridad y hielo por 30 minutos. A continuación, las células fueron lavadas con 3mL de solución de tinción para eliminar el exceso de anticuerpo y se centrifugaron a 1500rpm por 5 minutos a 4°C. Finalmente, una vez retirado el sobrenadante, se fijaron con 500µL de formaldehído al 4% y se almacenaron en oscuridad a 4°C para su posterior lectura en el citómetro de flujo Flow Cytometer System Moflo Astrios (Beckman Coulter). La tinción de superficie para la microscopía de flujo se realizó en la línea celular RS4 siguiendo el protocolo de tinción antes

mencionado, tiñendo 1×10^6 células con $1.5 \mu\text{g}$ de Anti-human GRP78 Alexa Fluor 488 y $100 \mu\text{L}$ de Zombie NIR (1:1000). Finalmente, los datos se adquirieron en un microscopio de flujo ImageStream X Mark II Imaging Flow Cytometer.

- **Recolección de las muestras de individuos pediátricos con LLA**

Las muestras de sangre periférica y médula ósea de individuos pediátricos al momento del diagnóstico con LLA se recolectaron como parte del protocolo clínico efectuado en el Hospital Infantil de México Federico Gómez. Los remanentes fueron utilizados para la investigación propuesta en este escrito.

Criterios de inclusión

Pacientes con leucemia linfoblástica aguda: individuos menores de 18 años de reciente diagnóstico con LLA, sexo indistinto y cuyos padres o tutores legales firmen un formato de consentimiento informado.

Pacientes sin leucemias: individuos menores de 18 años que se presenten al sistema de consulta por causas ajenas a la LLA o algún tipo de afección hematológica, que deseen incorporarse al estudio y cuyos padres o tutores legales firmen una carta de consentimiento informado.

Criterios de exclusión

Pacientes con leucemia linfoblástica aguda: que al momento del diagnóstico estén bajo algún tratamiento con inmunosupresores o que sufran alguna de las siguientes urgencias oncológicas: hemorragia intracraneal, síndrome de lisis tumoral, insuficiencia renal y aquellos que no presenten formato de consentimiento informado.

Pacientes sin leucemias: individuos que tengan infecciones agudas o crónicas, que presenten frecuencias de eosinófilos mayores a las del rango de referencia normal (0-6%), que no presenten formato de consentimiento informado.

Criterios de eliminación

Pacientes con leucemia linfoblástica aguda: que después del diagnóstico inicial se confirmara la presencia de otro trastorno hematológico ajeno a la LLA, que la cantidad total de células viables en la muestra sea menor a 1×10^6 células o que el tiempo de recolección de muestra exceda más de 24 horas.

Pacientes sin leucemia: que se confirme alguna enfermedad hematológica después de su valoración médica o que las muestras excedan 24 horas después de haber sido tomadas.

- **Procesamiento de las muestras**

Las muestras de sangre periférica y médula ósea se centrifugaron a 1500 rpm por 5 min a 4°C para recolectar el plasma y almacenarlo a -70°C. Una vez extraído el plasma, las células se resuspendieron en solución de lisis de eritrocitos y se incubaron por 10 min a 37°C. Concluido el tiempo, se centrifugaron a 1500 rpm 5 min a 4°C para eliminar la solución de lisis. Las células se resuspendieron en RPMI suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino, 1mM de Piruvato de Sodio y 1% de Penicilina/estreptomicina y se contabilizaron con la Cámara de Neubauer y azul de tripano.

- **Tinción de superficie para citometría de flujo de la proteína GRP78 en células de individuos pediátricos con LLA y sanos.**

Una vez obtenida la fracción celular de las muestras de pacientes, se tomaron tres alícuotas de 1×10^6 células y se resuspendieron en 100 μ L de solución de tinción durante 10 minutos a 4°C; una de ellas se tomó como autofluorescencia. A continuación, 1×10^6 células fueron teñidas con 500ng de IgG2b Alexa Fluor 488, otro número igual con 500ng de anti GRP78 (Alexa Fluor 488), 100 μ l de Zombie Violet (1:1000) o 5 μ l 7AAD (7-Aminoactinomycin D) y se incubaron por 30 min a 4°C y oscuridad. Transcurrido el tiempo, las células se lavaron con 3mL de solución de tinción para después ser centrifugadas a 1500 rpm, 4°C por 5 min. Finalmente, se eliminó el sobrenadante, se agregaron 400 μ L de Formaldehído 4% y se almacenaron a 4°C en oscuridad para su posterior lectura. La adquisición de los datos se llevó a cabo en un citómetro de flujo Flow Cytometer System Moflo Astrios y analizados con el software Summit 6.3.

- **Purificación de células GRP78 positivas**

La tinción para Fluorescence-activated cell sorting (FACS) se realizó conforme al protocolo de tinción de superficie arriba mostrado con la especificación de utilizar 100 μ l de solución de tinción, 100 μ l de Zombie Violet (1:1000) y 500ng de anti GRP78 (Alexa Fluor 488) por cada 1×10^6 células. Una vez lavadas del exceso de anticuerpo, las células se resuspendieron en RPMI 10% SFB 2% Penicilina/Estreptomicina ocupando 1mL por cada 1×10^6 células leucémicas. La purificación se realizó en el citómetro de flujo Flow Cytometer System Moflo Astrios recuperando las células en medio RPMI 10% SFB 2% Penicilina/Estreptomicina. Con respecto a la purificación utilizando columnas y

perlas magnéticas, la tinción de superficie de células leucémicas se realizó de acuerdo al protocolo mencionado. Después de la incubación, las células fueron lavadas del exceso de anticuerpo con 2mL de PBS 0.5% BSA 2mM EDTA (buffer de tinción) y centrifugadas a 1500rpm por 10 min para retirar el sobrenadante y resuspenderlas nuevamente en 80µl de buffer de tinción. Después, se añadieron 20µl de Anti-Mouse IgG MicroBeads (130-048-402, Miltenyi Biotec) con un tiempo de incubación de 15 minutos a 4°C. Se lavaron nuevamente con 2mL de buffer de tinción, se centrifugaron a 1500rpm por 10 minutos y se eliminó el sobrenadante para añadir 500µl de buffer de tinción e iniciar la separación magnética. La columna magnética (130-041-301, Miltenyi Biotec) se colocó en el magneto y se hidrató con 500µl de buffer de tinción. Una vez hecho esto, se añadieron las células en suspensión adicionando 1.5mL extras de buffer de tinción para después coleccionar la fracción negativa en un tubo FACS con medio de cultivo RPMI suplementado. La columna se retiró del magneto, rápidamente se colocó en un tubo FACS y se agregó 1mL de buffer de tinción el cual se hizo pasar a través de la columna con la ayuda de un émbolo con la finalidad de lavar la columna y obtener todas las células marcadas con el anticuerpo anti GRP78 (Alexa Fluor 488). La recolección de células GRP78 positivas se hizo en RPMI suplementado.

- **Estimulación con ISM1 recombinante**

La línea celular utilizada para los experimentos de estimulación fue la RS4;11 de LLA-B. Previamente las células fueron contadas con azul de tripano utilizando la Cámara de Neubauer y se sembraron 5×10^5 células (población total) en una placa de 96 pozos conservando una densidad de 1×10^5 células por pozo. Tres condiciones fueron establecidas; control negativo en donde las células fueron cultivadas en

100µL/pozo de RPMI sin suplementar, control positivo colocando las células en 100µL/pozo de RPMI sin suplementar al 10% de DMSO y por último el tratamiento con ISM1 en el cual las células se cultivaron en 100 µL/pozo de RPMI libre de suero con ISM1 recombinante a una concentración de 1µg/mL. Las células se dejaron incubar por 24 horas a 37°C en una atmósfera húmeda al 5% de CO₂. En torno a las células leucémicas de pacientes pediátricos, se descongelaron viales almacenados (-80°C) en baño maría vertiendo las células en medio RPMI suplementado y se dejaron reposar por 3 horas a 37°C en una atmósfera húmeda al 5%CO₂. Una vez terminado el tiempo de reposo, las células fueron centrifugadas a 1500rpm, se decantó el sobrenadante y se resuspendieron en 1-2mL de RPMI suplementado. A continuación, las células se colocaron en un tubo FACS previamente adicionado con 1.5mL de Lymphocyte Separation Medium (25-072-CI, CORNING) y se centrifugaron por 20 min, 2000rpm a 21°C. Formado el anillo, se recolectaron las células mononucleares y se cultivaron en medio RPMI suplementado por 18 horas a 37°C, 5%CO₂. Transcurrido el tiempo las células fueron contabilizadas para proceder a la estimulación colocando tres condiciones diferentes: control negativo, tratamiento con BSA y tratamiento con ISM1, ambas a una concentración de 5µg/mL. Al igual que en la línea celular se utilizaron 5x10⁵ células en cada condición colocándolas a una concentración de 1x10⁵ células por pozo en 100µL de RPMI al 5% de SFB suplementado con 1mM de Piruvato de Sodio y 1% de Penicilina/estreptomicina. Finalmente, las células bajo los tratamientos se incubaron por 24 horas a 37°C y una atmósfera húmeda al 5% de CO₂.

- **Determinación de Apoptosis**

Concluido el tiempo de incubación con los tratamientos, las células RS4;11 de LLA-B fueron colectadas en medio RPMI suplementado y centrifugadas a 1500 rpm por 5 min. Descartado el sobrenadante, se añadieron 100µL de buffer de unión de Anexina V, 5µL Anexina V-APC y 5µL de 7-AAD (APC Annexin V Apoptosis Detection Kit with 7-AAD). Se resuspendieron ligeramente las células en suspensión y se incubaron en oscuridad por 15 min a temperatura ambiente. Finalmente se añadieron 400µL más de buffer de unión de Anexina V y se procedió a la adquisición de datos a través del citómetro de flujo Flow Cytometer System Moflo Astrios. Para la determinación de apoptosis en células leucémicas de pacientes pediátricos se aplicó el mismo protocolo de tinción, reemplazando la administración de 7-AAD por 100µL de Zombie Violet, adición de Anti-human CD45 (Alexa Fluor 700) y Anti-human GRP78 Alexa Fluor 488. Una vez fijadas las células, se procedió a su lectura en el citómetro de flujo CytoFLEX (Beckman Coulter).

8 Resultados

- **Líneas celulares de LLA relocalizan GRP78 hacia la membrana plasmática.**

Para investigar acerca de la relocalización de la proteína GRP78 en la membrana plasmática de células leucémicas, se inició con la exploración de líneas celulares originadas a partir de células de individuos con leucemia linfoblástica aguda de tipo B y de tipo T. Para este propósito, se realizaron tinciones de superficie de las líneas celulares de LLA-B; RS4;11, Reh, así como también, de LLA-T; Jurkat y CCRF

buscando la presencia de la proteína GRP78 en la superficie celular. La citometría de flujo demostró que todas las líneas celulares evaluadas tienen una población celular que relocaliza GRP78 hacia la membrana plasmática. La línea RS4;11, originada a partir de células de médula ósea de un individuo con LLA-B, presentó una frecuencia promedio y error estándar del $0.56\% \pm 0.041$. En la Figura 1 se muestran los *dot plots* de la tinción de superficie donde se puede apreciar la formación de la población positiva para GRP78 en comparación al control de isotipo y autofluorescencia.

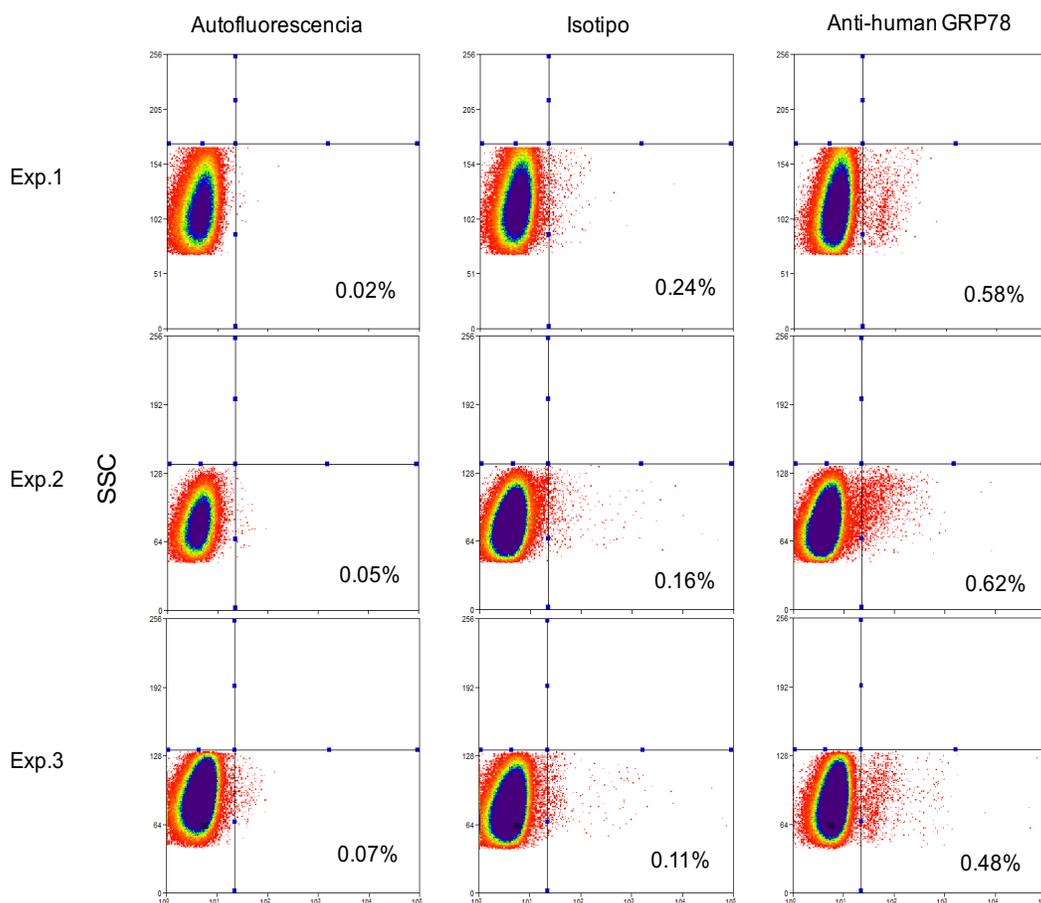


Figura 1. *Dot plots* de las tinciones de superficie de la línea celular RS4. Se muestra el porcentaje de células positivas para GRP78, control de isotipo y autofluorescencia de tres experimentos

independientes. Los datos mostrados corresponden a la población de células individuales definidas por los parámetros FSC vs SSC con el siguiente número promedio de eventos: autofluorescencia (169712 eventos), isotipo (244104 eventos) y GRP78 (251919 eventos). El análisis se realizó con el software Summit 6.3.

Por su parte, la línea celular Reh originada a partir de células de sangre periférica de un individuo con LLA de tipo B, tuvo una frecuencia media y error estándar del $0.18\% \pm 0.069$. En los *dot plots* de la Figura 2, pertenecientes al análisis de ésta línea celular, se puede observar una menor frecuencia con respecto a su contraparte de médula ósea de LLA-B.

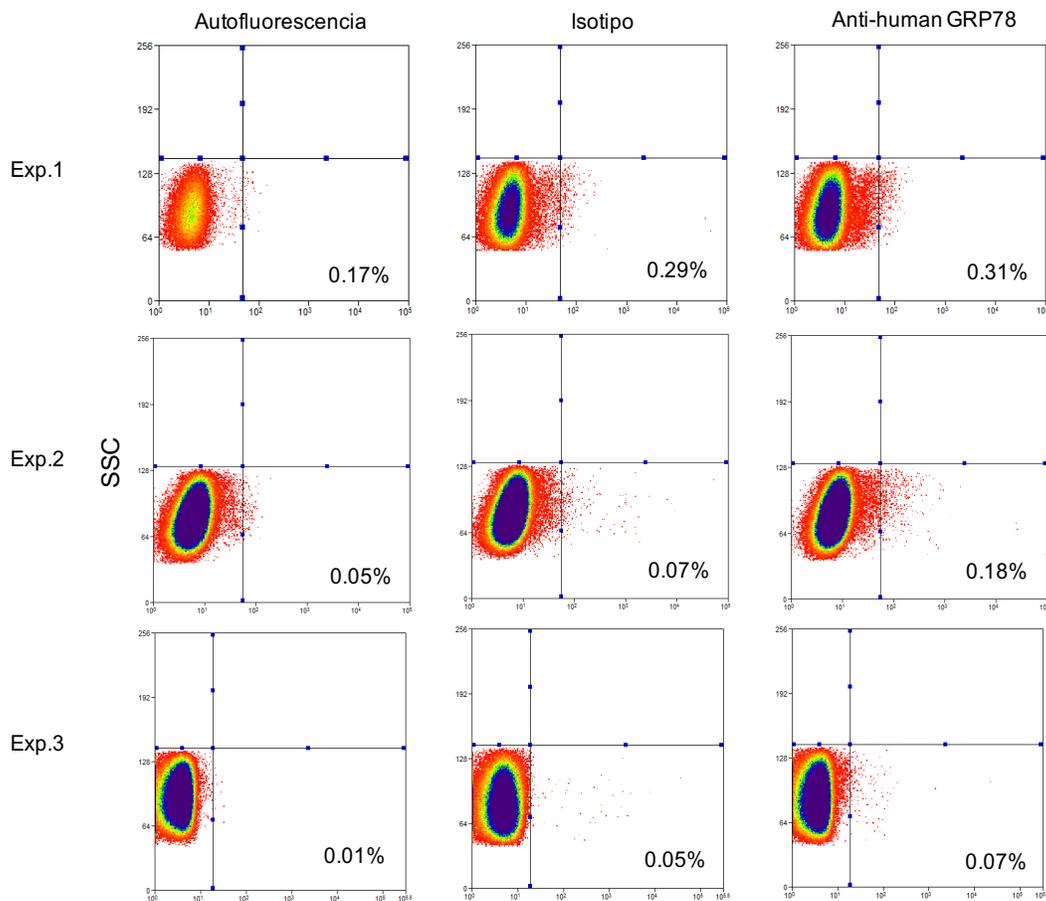


Figura 2. Dot plots de las tinciones de superficie de la línea celular Reh. Se muestra el porcentaje de células positivas para GRP78, control de isotipo y autofluorescencia de tres experimentos independientes. Los datos mostrados corresponden a la población de células individuales definidas por los parámetros FSC vs SSC con el siguiente número promedio de eventos: autofluorescencia (177761 eventos), isotipo (202634 eventos) y GRP78 (217392 eventos). El análisis se realizó con el software Summit 6.3.

El tipo de leucemia más común en individuos pediátricos es la LLA-B, sin embargo, también se puede llegar a presentar LLA-T. Por esta razón, se realizaron tinciones de superficie buscando GRP78 en líneas celulares originadas a partir de células leucémicas de sangre periférica de individuos con LLA de tipo T; Jurkat y CCRF. Con respecto a las células Jurkat, la frecuencia media y error estándar de células que relocalizan GRP78 fue de $0.16\% \pm 0.076$, así lo demuestra la citometría de flujo en la Figura 3, resaltando el hecho de que, per se, la autofluorescencia de las células en los dos primeros experimentos es mayor que las otras líneas utilizadas.

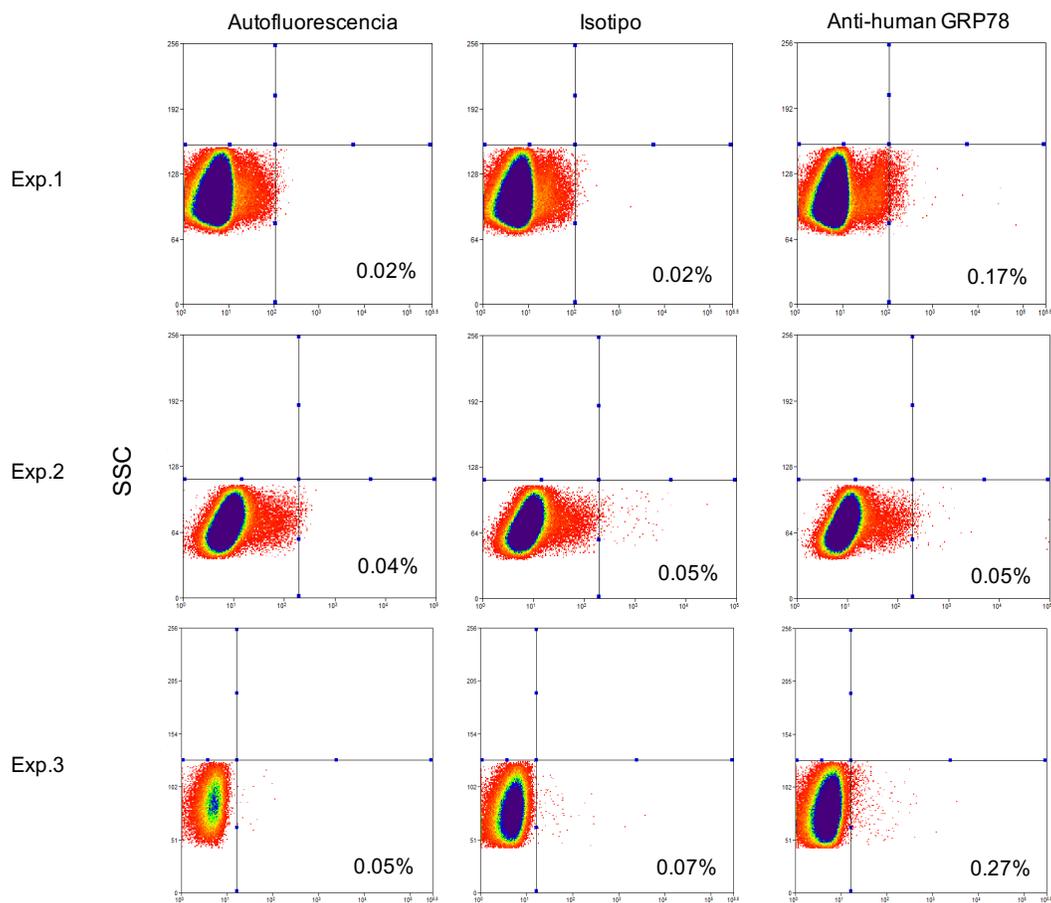


Figura 3. Dot plots de las tinciones de superficie de la línea celular Jurkat. Se muestra el porcentaje de células positivas para GRP78, control de isotipo y autofluorescencia de tres experimentos independientes. Los datos mostrados corresponden a la población de células individuales definidas por los parámetros FSC vs SSC con el siguiente número promedio de eventos: autofluorescencia (296681 eventos), isotipo (305207 eventos) y GRP78 (349520 eventos). El análisis se realizó con el software Summit 6.3.

Finalmente se exploró la línea CCRF, en donde se observó que una media y error estándar del $0.16\% \pm 0.063$ de la población total relocaliza GRP78 hacia la membrana plasmática. Al igual que sucedió con la línea Jurkat, la citometría de la

línea CCRF que aparece en la Figura 4 no muestra la formación de una población totalmente definida para GRP78.

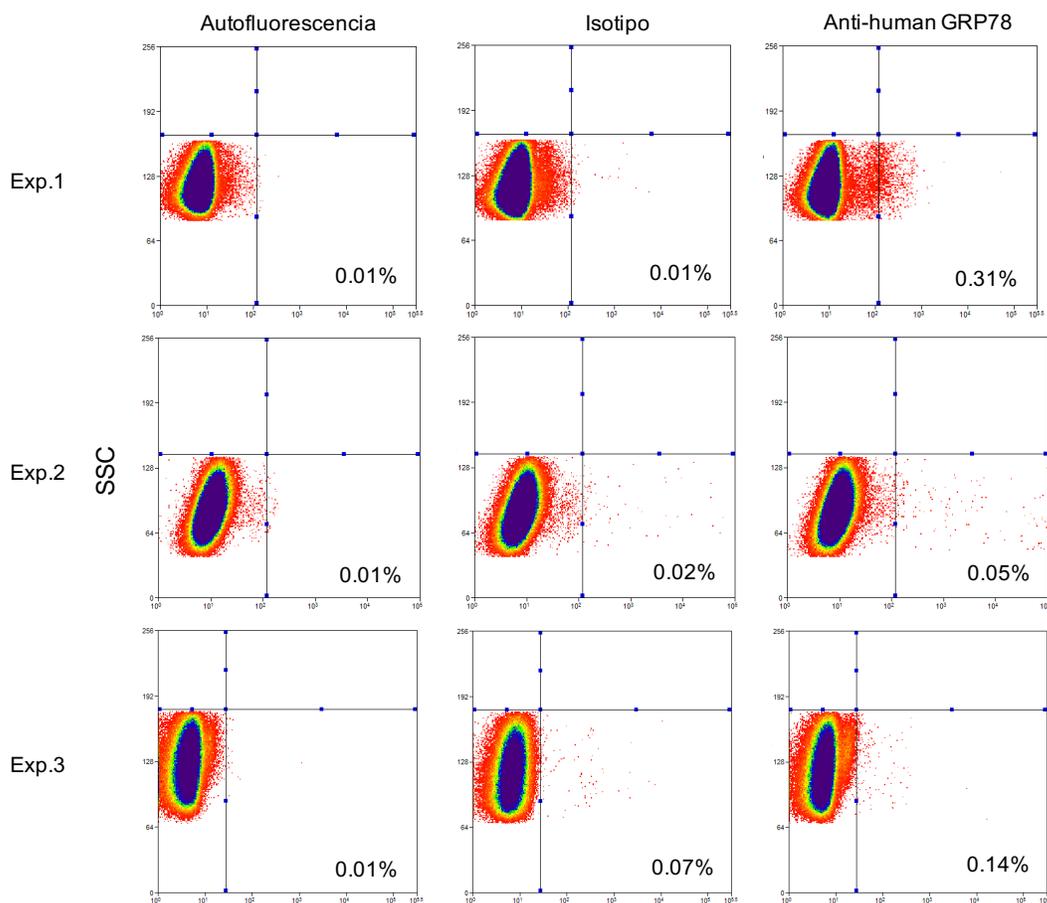


Figura 4. *Dot plots* de las tinciones de superficie de la línea celular CCRF. Se muestra el porcentaje de células positivas para GRP78, control de isotipo y autofluorescencia de tres experimentos independientes. Los datos mostrados corresponden a la población de células individuales definidas por los parámetros FSC vs SSC con el siguiente número promedio de eventos: autofluorescencia (255096 eventos), isotipo (327083 eventos) y GRP78 (297493 eventos). El análisis se realizó con el software Summit 6.3.

De acuerdo con los resultados de la relocalización de GRP78 en las líneas celulares, se puede determinar que la línea RS4;11 de LLA-B presenta una mayor frecuencia

de células GRP78+ a diferencia de su contraparte de sangre periférica y células de LLA-T. Bajo este hecho, se decidió ratificar la presencia de la proteína GRP78 en la membrana plasmática de las células RS4;11 mediante el marcaje de la proteína y utilizando como herramienta de análisis la microscopia de flujo. La tinción de superficie muestra una población del 0.81% de células viables que expresan GRP78 en la membrana plasmática. El 5.19% representa a células marcadas con Zombie NIR (un colorante fluorescente reactivo a aminos no permeable a células vivas) y GRP78, lo que nos indica que dichas células perdieron la integridad de la membrana y por lo tanto son células muertas. Por su parte el 89.9% corresponde a células viables que no están marcadas con Zombie NIR o Anti-human GRP78.

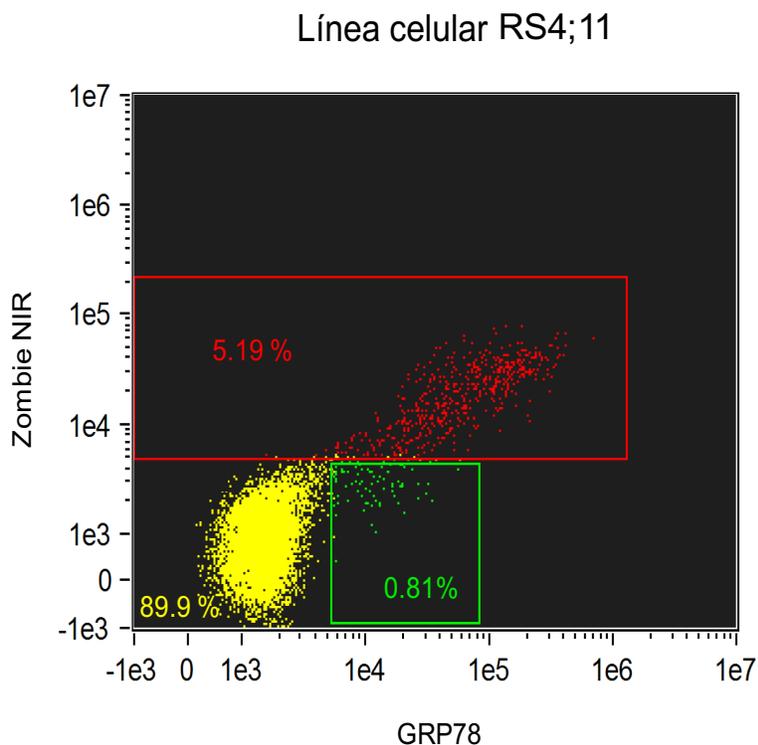


Figura 5. GRP78 se relocaliza hacia la membrana plasmática de células viables de la línea celular RS4;11. Se muestra el porcentaje de células viables positivas para GRP78 (verde, 81

eventos), células positivas para GRP78-Zombie NIR (rojo, 519 eventos) y células negativas para los dos marcadores (amarillo, 8992 eventos). El análisis se realizó con el software Ideas 6.2 seleccionando células individuales y en foco de 1×10^4 eventos adquiridos.

El microscopio de flujo, además de registrar la fluorescencia de los anticuerpos marcados con los fluorocromos, nos proporciona imágenes de cada uno de los eventos. De esta manera y como se observa en la Figura 6, se obtuvieron imágenes representativas de cada una de las poblaciones en el *dot plot* de la línea RS4;11 utilizando el software Ideas 6.2.

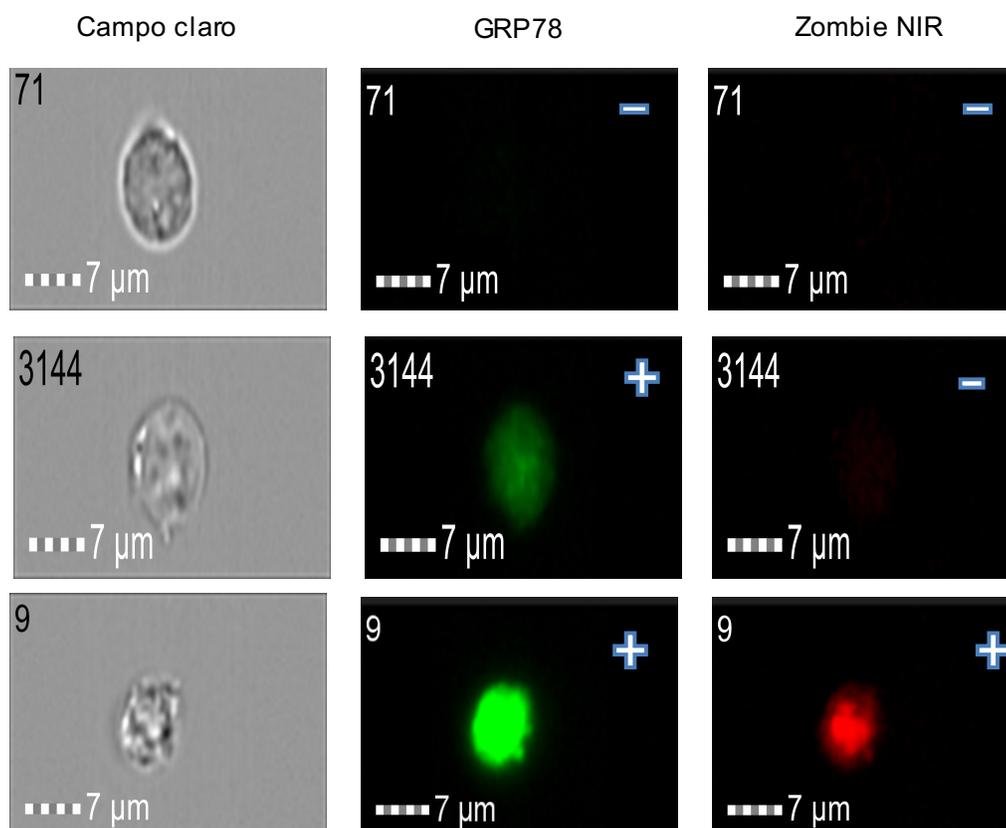


Figura 6. Microscopía de flujo de células de la línea celular RS4;11. Se muestran eventos representativos de cada una de las poblaciones identificadas en la microscopía de flujo de la línea

RS4;11. Imágenes en campo claro, canal de fluorescencia para Alexa Fluor 488 (verde) y Zombie NIR (rojo) 60X.

El evento número 71 corresponde a un evento de la población negativa para GRP78 y Zombie NIR, lo que significa que es una célula viable pero que no relocaliza la proteína hacia la membrana plasmática. La morfología celular del evento 3144 en campo claro supone una célula con la membrana íntegra, lo cual se corrobora con el marcaje negativo para Zombie NIR, resaltando el hecho de que la población a la cual pertenece, existe una relocalización de GRP78 hacia la membrana plasmática. Finalmente, el evento 9 en campo claro muestra una morfología que presume una célula con pérdida de integridad de la membrana, lo que permitió la entrada del Zombie NIR hacia el citoplasma reaccionando con el extremo N-terminal de las proteínas intracelulares emitiendo una fluorescencia a su paso por el microscopio de flujo. Debido a la permeabilidad de la membrana y que GRP78 se produce y localiza constitutivamente al interior de la célula, el anticuerpo utilizado ingresó al citoplasma uniéndose a GRP78 en su C-terminal resultando en una mayor intensidad de fluorescencia de GRP78 en comparación a GRP78 de superficie.

- **Muestras de individuos pediátricos al momento de diagnóstico con LLA presentan una población celular que relocaliza GRP78 hacia la membrana plasmática.**

Conforme a los resultados obtenidos de las líneas celulares, se decidió explorar la relocalización de GRP78 hacia la superficie celular en células leucémicas de individuos pediátricos al momento de diagnóstico con LLA, hipotetizando la existencia de una población celular viable positiva para éste marcador. Para comprobar esto, se llevaron a cabo tinciones de superficie buscando la proteína en células leucémicas provenientes de sangre periférica o médula ósea de individuos con LLA e individuos sanos. Como se puede apreciar en la Figura 7, células de sangre periférica de un individuo sano presenta un 0.62% de frecuencia de células que relocalizan GRP78 hacia la membrana plasmática. Por su parte, las células provenientes de un individuo diagnosticado con LLA-T muestran una mayor frecuencia de células positivas para GRP78 en la superficie celular. Así, las células leucémicas obtenidas de sangre periférica del paciente con LLA-T presentan una población GRP78 positiva alrededor del 1.1% mientras que su contraparte de médula ósea del mismo individuo alcanza hasta un 17% de células que relocalizan GRP78 hacia la membrana plasmática. Es de resaltar que las células de pacientes con leucemia al diagnóstico siguen la misma tendencia en cuanto a la frecuencia de células que relocalizan GRP78 dependiendo de la fuente de origen, teniendo una mayor frecuencia en médula ósea.

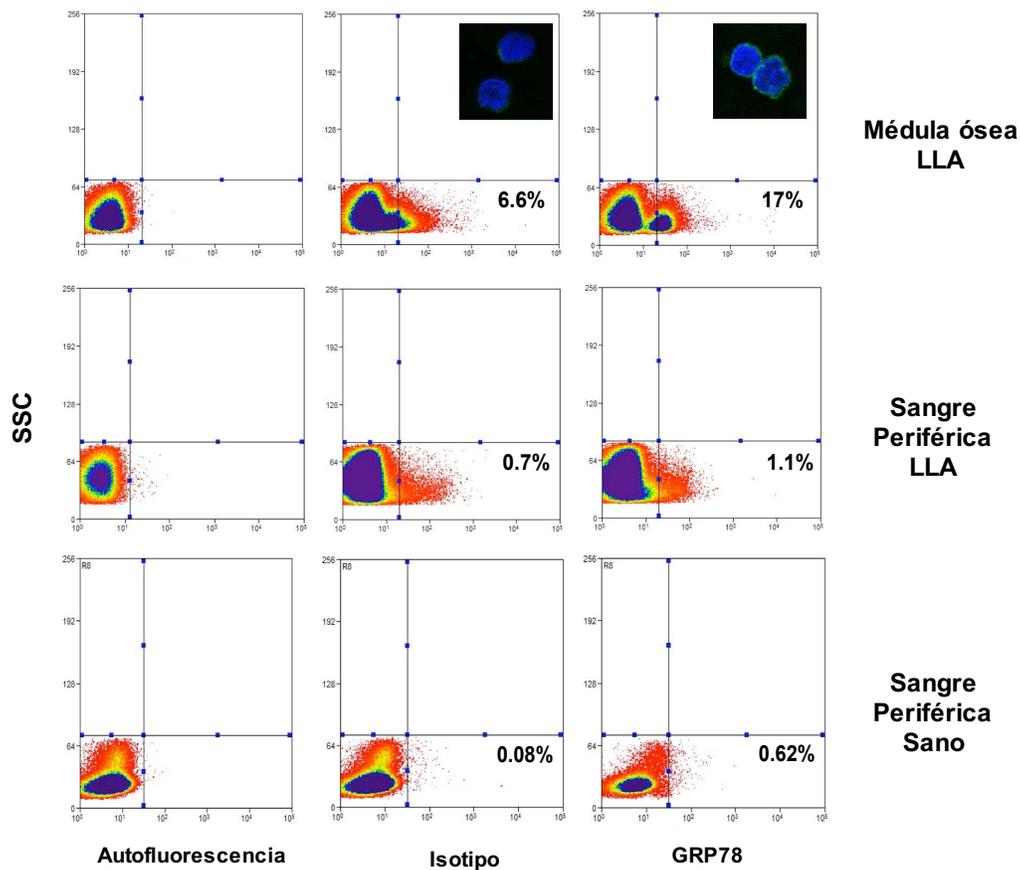


Figura 7. Relocalización de GRP78 hacia la membrana plasmática en células de un individuo con LLA-T e individuo sano. Análisis representativo de citometría de flujo de la relocalización de GRP78 en células leucémicas de sangre periférica y médula ósea de un individuo al momento de diagnóstico con LLA-T y células de sangre periférica de un individuo sano. Los datos mostrados corresponden a la población de células individuales definidas por los parámetros FSC vs SSC con el siguiente número de eventos: autofluorescencia (122215 eventos), isotipo (331638 eventos) y GRP78 (252295 eventos). Los datos fueron colectados en un citómetro Moflo Astrios cell-sorter y analizados con el software Summit 6.3.

A partir de los resultados exploratorios obtenidos con células de pacientes diagnosticados con LLA, se continuó con la recolección de muestras de individuos

pediátricos con leucemia, así como de pacientes sanos para determinar la frecuencia de células GRP78 positivos detallados en la siguiente tabla.

Tabla1. Características de las muestras de pacientes pediátricos sanos y con LLA.

Paciente	Sexo	Fuente	Tipo de Leucemia	% Blastos Médula ósea
1	H	Médula ósea	LLA-B	10
2	H	Médula ósea	LLA-B	N/D
3	H	Médula ósea	LLA-B	72
4	H	Médula ósea /Sangre periférica	LLA-B	80
5	M	Médula ósea/Sangre periférica	LLA-B	95
6	H	Médula ósea/Sangre periférica	LLA-B	88
7	H	Sangre periférica	LLA-B	78
8	M	Sangre Periférica	SANO	N/D

. Con el fin de analizar únicamente células viables se utilizó 7AAD como marcador de viabilidad y se realizaron tinciones de superficie buscando GRP78. Como se puede apreciar en los dot plots de la Figura 8, existe una mayor frecuencia de células GRP78 en muestras provenientes de médula ósea de individuos con LLA, alcanzando un 11.14% del total de células viables mientras que su contraparte de sangre periférica, sólo tiene una población del 2.32% de células que relocalizan GRP78.

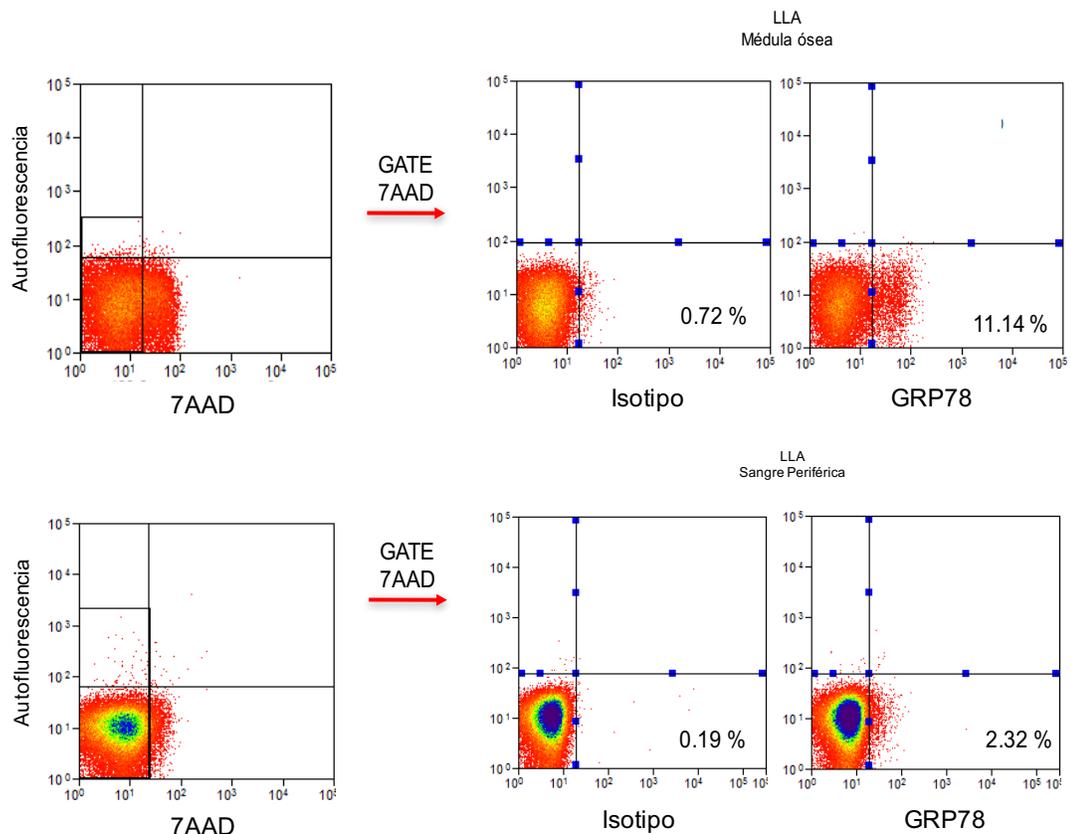


Figura 8. Relocalización de GRP78 en células leucémicas viables procedentes de médula ósea

y sangre periférica de individuos con LLA. Se muestran citometrías representativas de las tinciones de superficie llevadas a cabo en células de individuos pediátricos con LLA al momento del diagnóstico. Las células individuales viables analizadas para determinar GRP78 y su Isotipo fueron, en ambos casos, seleccionadas a partir de los parámetros FSC vs SSC y la región negativa de 7AAD vs Autofluorescencia con el siguiente promedio de eventos: isotipo (67182 eventos) y GRP78 (67551) La colección de los datos se obtuvo en un citómetro Moflo Astrios cell-sorter y fueron analizados con el software Summit 6.3.

Para saber si la proteína GRP78 se relocaliza preferentemente hacia la membrana plasmática en células leucémicas, especialmente en LLA, se determinó la presencia de la proteína en células de sangre periférica de individuos pediátricos sanos. En la Figura 9 se muestran los dot plots correspondientes a la tinción de superficie

realizada sobre células linfoides provenientes de sangre periférica. Las células viables se tomaron de la región negativa para Zombie Violet y se observa que un 0.57% de las células relocaliza GRP78 hacia la superficie celular, frecuencia inferior a las observada en las células leucémicas de individuos pediátricos con LLA.

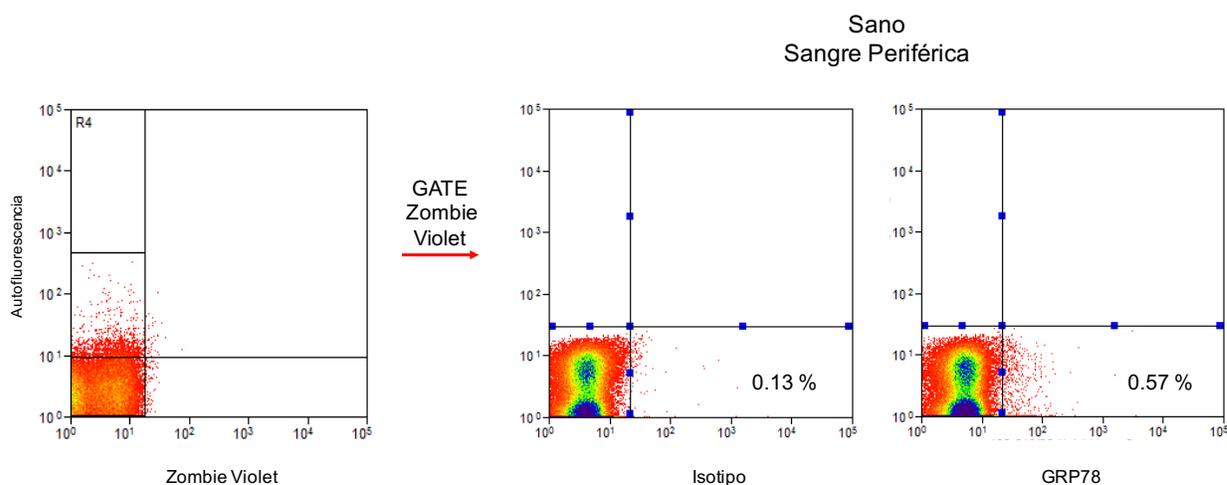


Figura 9. Relocalización de GRP78 en células linfoides de sangre periférica de individuo sano. *Dot plot* de la tinción de superficie para GRP78 en células linfoides de sangre periférica en un individuo sano. Las células individuales viables fueron seleccionadas de acuerdo a los parámetros FSC vs SSC y la región negativa de Zombie Violet vs Autofluorescencia con el siguiente número de eventos: isotipo (95959) y GRP78 (108224). La colección de los datos se llevó a cabo en un citómetro Moflo Astrios cell-sorter y fueron analizados con el software Summit 6.3.

En la figura 10 se comparan las frecuencias de las células GRP78 positivas entre cada una de las fuentes (médula ósea y sangre periférica) y condiciones (pacientes con LLA y donadores sanos), en donde podemos observar que las células leucémicas de médula ósea tienen una mayor frecuencia de células GRP78 positivas con un promedio y error estándar del $3.95\% \pm 1.38$ ($n=7$), mientras que su

contraparte de sangre periférica tuvo un porcentaje del $0.93\% \pm 0.69$ ($n=3$). Por su parte, la muestra que se tiene de sangre periférica de donador pediátrico sano presenta una frecuencia del 0.57% , inferior al porcentaje de las células leucémicas de médula ósea pero dentro del promedio de las leucémicas provenientes de sangre periférica. Al desglosar cada uno de los datos disponibles de los individuos con leucemia, observamos que en médula ósea hay tres patrones de frecuencia, resaltando el valor más alto correspondiente al 11.14% de células GRP78+ del paciente número 1, mientras que en sangre periférica el valor más alto fue de 2.32% . Con respecto a las células de médula ósea de pacientes sanos, la recolección de las muestras se limitó debido a su disposición en la institución de salud.

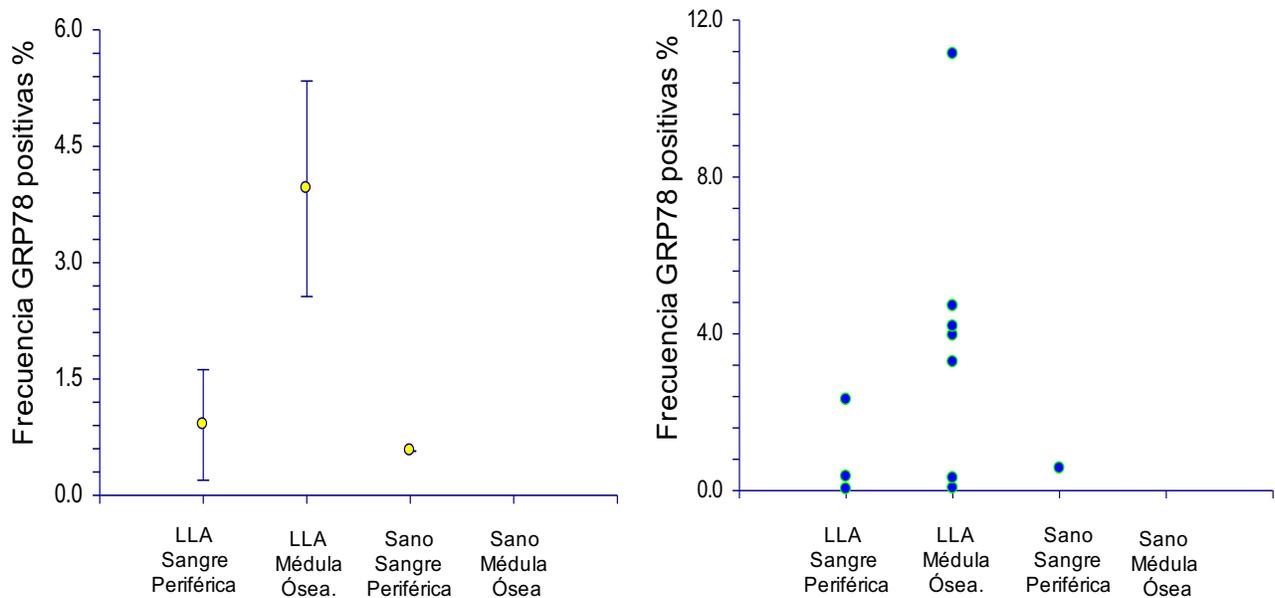


Figura 10. Células de médula ósea de pacientes pediátricos con LLA demuestran una mayor frecuencia de células que relocalizan GRP78. Se muestra la frecuencia de las células individuales viables positivas para GRP78 en individuos con LLA al momento de diagnóstico e individuos sanos en

dos diferentes fuentes (LLA Sangre Periférica; n=3, LLA Médula Ósea; n=7, Sano Sangre Periférica; n=1 y Sano Médula Ósea; n=0). En la gráfica de la izquierda los datos se presentan como la media \pm s. e. y a la derecha se muestran los datos individuales. El análisis de los datos se realizó con el software NCSS.

- **Estimulación con ISM1 recombinante en la línea celular RS4;11 de LLA.**

De acuerdo con los resultados obtenidos acerca de la identificación de la relocalización de GRP78 hacia la membrana plasmática en líneas celulares de LLA, se decidió ocupar la línea celular RS4;11 de LLA-B para los experimentos de estimulación con ISM1 debido a que presenta una mayor frecuencia de células GRP78 positivas con un $0.56\% \pm 0.041$. Examinando la literatura, se observó que la línea celular RS4;11 presenta el receptor de baja afinidad de ISM1, la integrina $\alpha v \beta 5$, por lo que se consideró realizar la estimulación con la población total para descartar un proceso de apoptosis mediado por esta integrina (Acharya et al., 2009). La figura 11 muestra los niveles de apoptosis después de la estimulación con $1 \mu\text{g/mL}$ de ISM1 recombinante de ratón, observándose un promedio de células en proceso de apoptosis (Anexina V positivas) del 1.11% de la población total. Células apoptóticas, cuya membrana ha perdido su integridad, caracterizándose por la unión de Anexina V e incorporación de 7-AAD al DNA, representaron un promedio del 2.42% de toda la población. A su vez, células negativas para Anexina V y 7-AAD que indican células viables representaron la mayoría de la población, teniendo un promedio del 96.42 %. Por otro lado, células en la condición control mostraron un promedio de células viables del 95.7% entre el experimento y su duplicado. Las células Anexina V

positivas representaron un promedio del 1.24% de la población total de células individuales analizadas. Con respecto a la frecuencia de células apoptóticas se observó que un promedio del 2.92% de la población celular fue positiva para Anexina V y 7-AAD. Con este resultado se puede determinar que, aunque la línea celular RS4;11 exprese la integrina $\alpha v\beta 5$, bajo la estimulación con ISM1 no induce un efecto proapoptótico, por otro lado, no se puede hacer una correlación directa entre el porcentaje de células GRP78 positivas y la muerte de las mismas bajo la interacción ISM1-GRP78 debido a su baja frecuencia.

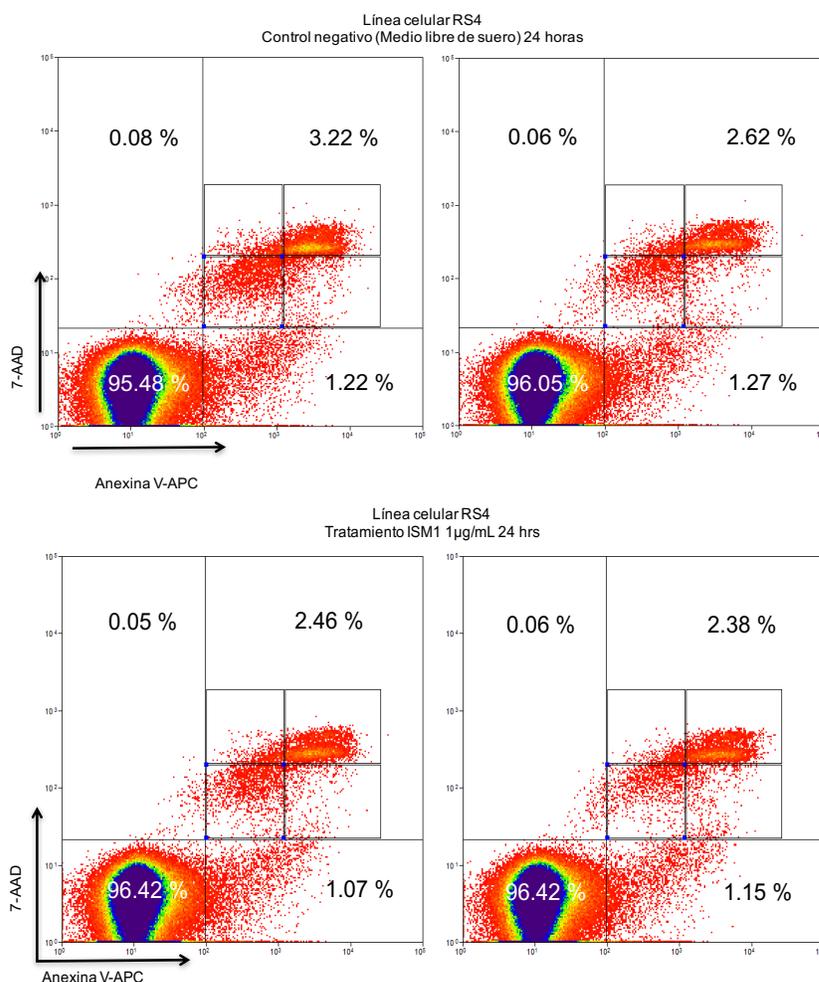


Figura 11. ISM1 no tiene un efecto proapoptótico sobre la línea celular RS4;11. Células de la línea celular RS4 fueron tratadas con o sin 1µg/mL de ISM1 recombinante por 24 horas. Se determinó el nivel de apoptosis con el kit Annexin V Apoptosis Detection Kit with 7-AAD en el experimento y su duplicado. La colección de los datos se llevó a cabo en un citómetro Moflo Astrios cell-sorter y fueron analizados con el software Summit 6.3.

- **Estimulación con ISM1 recombinante en células de individuos pediátricos al momento de diagnóstico con LLA.**

Los experimentos realizados buscando células leucémicas que relocalizan GRP78 en muestras de pacientes con LLA al momento de diagnóstico, revelaron que existe una mayor frecuencia de células con este fenotipo en médula ósea; $3.95\% \pm 1.38$. Para conocer el efecto que ISM1 podría tener sobre las células que relocalizan GRP78, se decidió estimular la población total de células leucémicas provenientes de médula ósea con 5µg/mL de ISM1 recombinante con el propósito de establecer una correlación entre el porcentaje de células que relocalizan la proteína y la inducción de apoptosis. Primero se determinó la frecuencia de células que relocalizan GRP78, mostrándose en la Figura 12 la citometría que se realizó en una muestra descongelada de células leucémicas buscando la relocalización de GRP78. El análisis se realizó utilizando células viables determinado por la región negativa a Zombie Violet y la presencia de CD45, obteniéndose un 5.54% de la población que relocaliza GRP78 antes de la estimulación. Culminado el tiempo de estimulación con la población total de células, se realizó una tinción de citometría con el fin de determinar apoptosis con Anexina V/7-AAD y verificar si la población GRP78 positiva inicial había desaparecido o bajó en frecuencia debido al tratamiento con ISM1.

Además, se añadió un tratamiento con BSA a una concentración de 5µg/mL como otro control negativo y corroborar el efecto de ISM1.

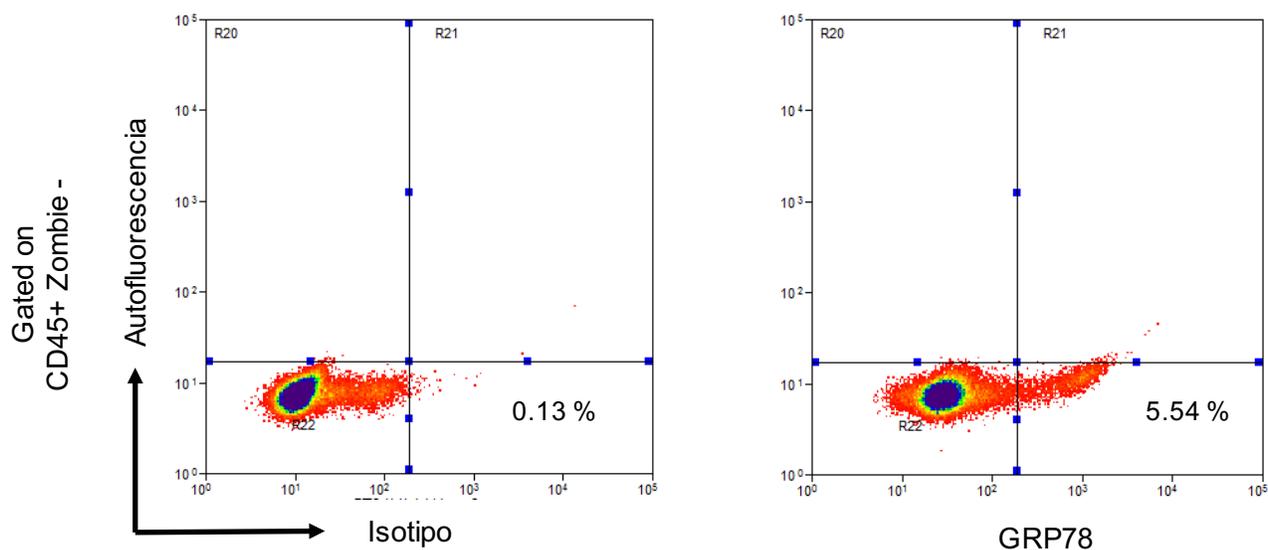


Figura 12. Relocalización de GRP78 en células descongeladas de un individuo pediátrico con LLA al diagnóstico. Se muestra la citometría de flujo realizada en células leucemias descongeladas de un paciente pediátrico con LLA. La población de análisis se determinó a partir de la región linfóide FSC vs SSC y de las regiones Zombie Violet – y CD45+. La colección de los datos se llevó a cabo en un citómetro CytoFlex y analizados con el software CytExpert.

Los resultados obtenidos de los experimentos de estimulación se muestran en la Figura 13, las citometrías de la parte superior corresponden a la tinción para detectar células apoptóticas. Examinando la condición control, observamos que existe un 34.74% de células CD45+ que están en apoptosis temprana, indicándonos que per se, hay una alta probabilidad de que las células mueran. Al comparar esta cifra con el tratamiento con ISM1, observamos que el porcentaje de células en proceso de apoptosis alcanza un 31.31%, cantidad inferior a la condición control. Lo mismo

sucedió con la presencia de BSA, donde el porcentaje de células en proceso de apoptosis alcanzó un 32.89% del total de la población. Tomando los resultados en conjunto, se sugiere que los niveles de apoptosis observados bajo el tratamiento con 5µg/mL de ISM1 no son propios del efecto de la proteína recombinante

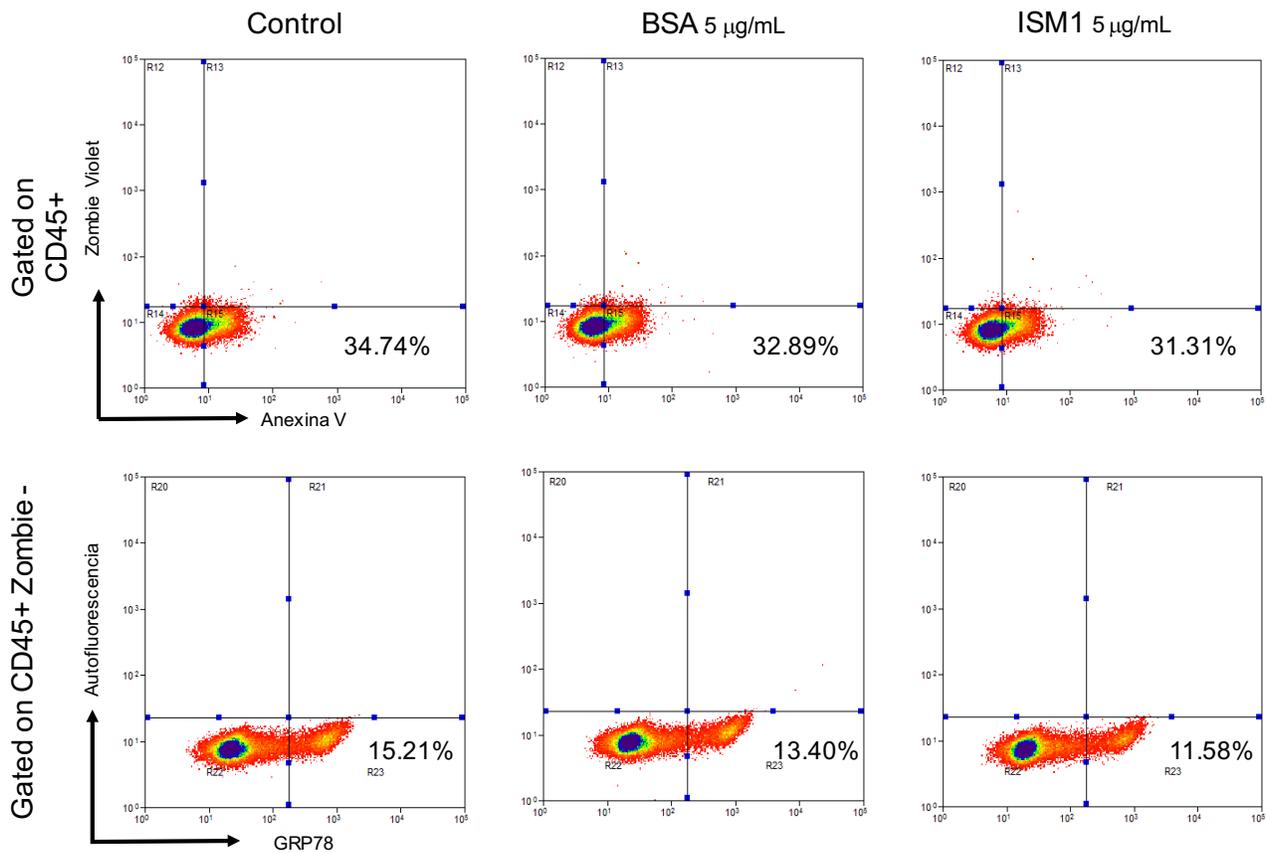


Figura 13. Efecto de la estimulación con ISM1 en células de individuos pediátricos con LLA. El experimento de estimulación se realizó en la población completa de células leucémicas de médula ósea de paciente con LLA. Para la detección de apoptosis se analizaron células CD45+, mientras que para determinar GRP78 se analizó la población Zombie Violet-, CD45+. La colección de los datos se llevó a cabo en un citómetro CytoFlex y se analizaron con el software CytExpert.

Al analizar lo que había sucedido con las células GRP78 positivas viables iniciales, recordando que se había obtenido una frecuencia del 5.54%, se observó que la frecuencia de las células Zombie Violet-, CD45+, GRP78+ aumentó su frecuencia llegando hasta el 15.21% en la condición control y 13.40% con el tratamiento de BSA. De manera interesante, la frecuencia de células viables que relocalizan GRP78 disminuyó con el tratamiento con ISM1 en comparación a la condición control, lo que sugeriría que hay una interacción ISM1-GRP78 y una subsecuente internalización del complejo sin llegar a inducir un proceso apoptótico detectable con la citometría de flujo. Es un hecho que diversos factores están alterando la supervivencia de las células por lo cual un efecto claro sobre las células GRP78⁺ no puede ser observado durante la estimulación con ISM1. Además, la baja frecuencia de células que relocalizan GRP78 en la población total imposibilita correlacionar el efecto de ISM1 con el número de células GRP78+ en apoptosis.

- **Purificación de células que relocalizan GRP78 a través de FACS y columnas inmunomagnéticas.**

Dados los resultados de estimulación con la población total, tanto en la línea celular como en células de pacientes con LLA al diagnóstico, en primera instancia se decidió purificar las células de interés de la línea celular RS4;11 con el fin de observar el efecto que ISM1 podría tener sobre las células purificadas que relocalizan GRP78. Utilizando FACS como técnica para purificar la población de interés, se obtuvieron los resultados presentes en la Tabla 2, donde se muestra la cantidad inicial de células para FACS y el número de células recuperadas utilizando un Flow Cytometer System Moflo Astrios.

Tabla 2. Número de células GRP78 positivas obtenidas por FACS en la línea celular RS4:11.

Número de células iniciales RS4;11		Células GRP78 positivas recuperadas
Exp. 1	1X10⁷	30,410
Exp. 2	7 X 10⁶	1,550
Exp. 3	5 X 10⁶	3,690

Podemos observar que la eficiencia de recuperación de ésta células es muy baja, además, se combina con la baja frecuencia de éstas células en la línea celular RS4;11 de LLA. Por este motivo, se tomó la opción de enriquecer la población de células de interés a partir de muestras de pacientes con LLA al diagnóstico, fuente en la que hemos demostrado que existe una mayor frecuencia de células que relocalizan GRP78 (3.95% ± 1.38%). El proceso de purificación se realizó ocupando columnas y perlas magnéticas con el propósito de realizar una selección positiva para enriquecer la población GRP78⁺. También, se realizó un experimento utilizando FACS para corroborar la purificación utilizando células de pacientes. Los resultados de éstos procesos se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Número de células GRP78 positivas obtenidas por columnas-perlas magnéticas y FACS a partir de células de pacientes con LLA

Número inicial de células de pacientes con LLA	Células GRP78 positivas recuperadas
Médula ósea 2.5×10^7 células (Perlas Magnéticas)	5,250
Médula ósea 2.5×10^7 células (Perlas Magnéticas)	3,600
Médula ósea 5×10^6 células (FACS)	<1000

Dos experimentos se realizaron utilizando células provenientes de médula ósea del paciente número 1 diagnosticado con LLA y con la tecnología de perlas magnéticas. En ambos casos, la recuperación de las células de interés fue muy baja como para poder realizar los experimentos de estimulación con ISM1. Para finalizar, se realizó la purificación utilizando FACS en células del mismo paciente sin lograr una buena recuperación de las células GRP78 positivas, situación similar al uso de perlas magnéticas y a la línea celular RS4;11 de LLA.

9 Discusión

El retículo endoplásmico (RE) es el principal organelo encargado de la síntesis, doblaje, maduración y tráfico de proteínas presentes en la célula (Lee, 2007). La exposición de las células a condiciones de estrés tales como: inanición de glucosa, inhibición de la glucosilación de proteínas, alteración en la homeostasis del Ca^{2+} o disponibilidad de oxígeno, causa un estrés en el RE y desencadena la activación de la UPR (Unfolded Protein Response) con el fin de promover la supervivencia celular (Fulda et al., 2010, Lee, 2007). La proteína de choque térmico GRP78 (Glucose regulated protein 78), ha sido establecida como una importante chaperona residente del retículo endoplásmico y un componente importante en la modulación de la vía UPR (Pfaffenbach and Lee, 2011). Se ha demostrado que GRP78 está altamente inducida en una gran variedad de tumores, desempeñando un papel crucial en la supervivencia de células, progresión del tumor, angiogénesis, metástasis y resistencia a la quimioterapia (Ni et al., 2011).

Tradicionalmente, GRP78 se reconoce como una proteína que se localiza en el RE, sin embargo, estudios han reportado que una fracción se puede relocalizar hacia la membrana plasmática de células cancerosas pero no en células normales (Zhang et al., 2010, Ni et al., 2011) Nuestros resultados muestran que las líneas celulares cancerosas de LLA utilizadas tanto de LLA-B (RS4;11 y Reh) como de LLA-T (Jurkat y CCRF) presentan una pequeña población que relocaliza GRP78 hacia la membrana plasmática, siendo la línea celular RS4;11 la que mayor frecuencia presenta en comparación a sus contrapartes de sangre periférica y de linaje (Fig. 1). Es de importancia resaltar que la línea celular RS4;11 se originó a partir de células

leucémicas de médula ósea, fuente donde se estableció la línea celular de LLA-B Sup-B15 donde se identificó la presencia de GRP78 en la superficie celular a partir de un estudio proteómico global de la membrana plasmática, sin embargo, el estudio no advierte la frecuencia de las células que relocalizan la proteína (Shin et al., 2003). La relocalización de GRP78 se corroboró en la línea RS4;11 utilizando la microscopía de flujo como método de análisis (Fig. 5). Los resultados utilizando esta tecnología nos muestran que la mayor parte de las células viables no relocaliza GRP78 en la superficie, mientras que un pequeño porcentaje relocaliza la proteína en la superficie celular, situación contraria a líneas celulares de otros tipos de cáncer. Estudios utilizando líneas celulares de cáncer de colon muestran que las líneas celulares HCT116 y HM7 alcanzan hasta un 85% de frecuencia de células que relocalizan GRP78 en la membrana plasmática (Hardy et al., 2012). Por otro lado, diversos estudios han demostrado que los niveles de GRP78 en la superficie celular varían dependiendo de la línea celular, por ejemplo, la línea celular MDAMB468 de cáncer de mama tiene niveles mayores de GRP78 de superficie en comparación a la línea BT474 (Raiter et al., 2014).

Estrés en el retículo endoplásmico puede ser inducido por diversos agentes como la taspigargina para aumentar los niveles de GRP78 hasta 12 veces más en la superficie como se ha explorado en la línea celular 293T, sin embargo, el incremento por estos mecanismos podría disminuir su viabilidad. (Zhang et al., 2010). Debido al estrés al que podrían estar sujetas las células y a la muy probable susceptibilidad de apoptosis, las líneas celulares de LLA no se estimularon con agentes estresantes del

RE como la Tapsigargina o Doxorubicina para incrementar los niveles de GRP78 en la membrana plasmática.

Las imágenes obtenidas a partir de la microscopía de flujo, nos muestran que GRP78 se distribuye uniformemente en la membrana plasmática de la línea RS4;11, sin embargo, la forma en que podría estar en la superficie celular no ha sido bien establecida. Un estudio realizado utilizando el software TMpred predictor program y la secuencia de aminoácidos de GRP78 reveló un modelo de conformación en la membrana incluyendo cuatro posibles dominios transmembrana con los extremos N-terminal y C-terminal orientados hacia el espacio extracelular.(Zhang et al., 2010). El anticuerpo utilizado para detectar GRP78 en la superficie celular de las líneas celulares de estudio, es un monoclonal que se une al extremo C-terminal de GRP78, lo que indica que en la línea RS4:11 ubica su extremo C-terminal en el espacio extracelular (de Ridder et al., 2012). Recientemente se han llevado a cabo estudios acerca de otras posibles configuraciones de GRP78 en la membrana plasmática, destacando el modelo embebido en la membrana plasmática, asociada a un complejo con proteínas transmembrana y/o anclada a Glycosylphosphatidylinositol (GPI) (Tsai et al., 2015). Análisis complementarios revelarán cual es la configuración de GRP78 en la membrana plasmática de las líneas celulares de LLA ya que las estructuras mencionadas varían en cada tipo celular y pueden o no estar presentes de manera simultánea en una célula (Tsai et al., 2015).

Se sabe que GRP78 puede desencadenar un proceso proapoptótico, de proliferación o sobrevivencia jugando un papel muy importante en el desarrollo y progresión del cáncer, sin embargo, las funciones de GRP78 en el sistema hematopoyético más allá

de su participación en la UPR, tanto en condiciones de homeostasis como en diversos trastornos hematológicos está por descubrirse. Se ha reportado que GRP78 contribuye en el mantenimiento, supervivencia y quiescencia de células troncales hematopoyéticas. Así lo demostró un estudio utilizando un ratón knockout inducible para GRP78 en el sistema hematopoyético, el cual resultó en la reducción de la población de HSCs debido a un incremento en la apoptosis y a una baja producción de células progenitoras linfoides en la médula ósea (Wey et al., 2012a, Miharada et al., 2011). Otro estudio reportó que existe una sobreexpresión de GRP78 a nivel de mRNA en leucemias, sugiriendo este aumento como un factor causante de la resistencia a la quimioterapia y recaída temprana (Uckun et al., 2011). Con los resultados obtenidos de las líneas celulares, se decidió explorar si las células de individuos pediátricos con LLA al diagnóstico presentaban una población que relocaliza GRP78 hacia la membrana plasmática. El análisis de citometría de flujo muestra que las células de LLA provenientes de médula ósea muestran una frecuencia media mayor de células que relocalizan GRP78 que su contraparte de sangre periférica e individuo sano, muy similar a la tendencia observada en las líneas celulares de LLA evaluadas. Las razones por las que hay una mayor frecuencia de células GRP78+ en individuos pediátricos en comparación a las líneas celulares de LLA no han sido establecidas, sin embargo, se ha demostrado que en otros modelos de cáncer, como el de mama, moléculas como la Doxorubicina o Taxotere inducen la sobreexpresión y relocalización de GRP78 hacia la membrana plasmática, incrementándose la frecuencia de células GRP78+ hasta un $50\pm 7.7\%$ en

comparación a la frecuencia original (7%)(Raiter et al., 2014). El microambiente tumoral caracterizado por hipoxia, privación de glucosa o una alteración en la homeostasis del Ca^{2+} podrían contribuir en la aparición de células leucémicas que relocalizan GRP78 en la LLA, principalmente en médula ósea. Un hecho importante con respecto a los datos, es que las células GRP78⁺ entre los pacientes al momento del diagnóstico con LLA presentan una dispersión en cuanto a sus frecuencias. Si tomamos el hecho de que la sobreexpresión y subsecuente relocalización de GRP78 facilita la progresión del tumor, migración, metástasis y resistencia a fármacos (Li et al., 2013) la diferencia de frecuencia de células GRP78⁺ entre las muestras de individuos con LLA podría estar relacionada con el pronóstico de la enfermedad ya que al ser una proteína de sobrevivencia, le daría ventajas de sobrevivencia a las clonas leucémicas frente a las terapias de quimioterapia. En un estudio realizado en células de pacientes con LLA-B se observó que las clonas leucémicas resistentes aumentaban hasta un 2.6 ± 0.7 veces la expresión de GRP78 en comparación a las clonas en la etapa de diagnóstico (Uckun et al., 2011). Aunado a esto, estudios se han llevado a cabo acerca de la secreción de GRP78 y se ha observado que hay una correlación entre los niveles de GRP78 en plasma y el estado del tumor (Ma et al., 2015). Futuras investigaciones deben llevarse a cabo para determinar si está diferencia en las frecuencias es significado del pronóstico de la enfermedad en leucemias y si la presencia per se de la población y/o la cantidad de GRP78 en plasma, pueden ocuparse como un marcador pronóstico para la LLA.

GRP78 en la superficie celular, tiene la capacidad de unirse a diferentes ligandos que desencadenan en la célula cancerosa señales de supervivencia/proliferación (α_2M y Cripto) o apoptosis (Par-4 y Kringle 5) (Ni et al., 2011). En este contexto, se ha reportado que ISM1, una proteína de secreción de 60kDa que se produce en células NK y NKT, también interacciona con GRP78 presente en la membrana plasmática de células cancerosas desencadenando muerte celular por apoptosis. (Valle-Rios et al., 2014, Chen et al., 2014). Los resultados obtenidos demuestran que la línea celular RS4;11 presenta una población del $0.56\% \pm 0.041$ que relocaliza GRP78, sin embargo, prácticamente toda la población produce la integrina $\alpha v\beta 5$, receptor de baja afinidad de ISM1 que ha demostrado desencadenar apoptosis en células endoteliales bajo su interacción (Acharya et al., 2009, Zhang et al., 2011). Debido a esto, se probó la estimulación de la población total de la línea RS4;11 con $1\mu g/mL$ de ISM1, dando como resultado el nulo efecto proapoptótico esperado, comparado con el control negativo, dada la presencia de la integrina $\alpha v\beta 5$. Este resultado permitió establecer que la presencia y/o niveles de expresión de la integrina en las células leucémicas no causaría interferencia en la observación del efecto proapoptótico desencadenado por la administración de ISM1 a la concentración de $1\mu g/mL$. Después de la estimulación, no se pudo establecer una correlación entre la frecuencia de células apoptóticas o en proceso de apoptosis y la frecuencia de células GRP78 positivas dada la baja frecuencia de la población de interés o debido a la cantidad de ISM1 recombinante administrada, aunque la concentración empleada fue reportada en desencadenar la internalización del complejo ISM1-GRP78 dentro de las tres primeras horas de

estimulación en células HUVEC.(Chen et al., 2014) Es por esto, que se decidió purificar las células que relocalizan GRP78 para observar el efecto proapoptótico propuesto a través de la vía ISM1-GRP78. A través de FACS no fue posible aislar el suficiente número de células GRP78 positivas de la línea celular RS4;11 presumiblemente por la baja frecuencia en la que están presentes en la población total de la línea RS4;11 ya que se partió de un número máximo de 1×10^7 células. Se determinó que existe una variación en los porcentajes de células GRP78+ recuperadas a través de FACS del 0.30 (Exp.1), 0.02 (Exp. 2) y 0.07% (Exp. 3) lo podría estar relacionado con el número de pases de la línea celular o al estrés y subsecuente muerte de las células GRP78+ provocado por el FACS. Por este motivo, se consideró el uso de células de individuos con LLA al momento del diagnóstico ya que el presente estudio demostró que existe una población de células leucémicas que relocaliza GRP78 hacia la membrana plasmática, teniendo una frecuencia media del $3.95\% \pm 1.38$ en médula ósea. Por este motivo se consideraron las muestras de pacientes como una fuente alterna para probar el efecto propuesto de ISM1.

De igual manera que en la línea celular RS4, primero se exploró el efecto de ISM1 sobre células leucémicas totales de médula ósea provenientes de individuos con LLA al diagnóstico. La frecuencia de células apoptóticas en el tratamiento con ISM1 (31.31%) no corresponde con la frecuencia inicial de células que relocalizan GRP78 (5.54%) en la población total al inicio de la estimulación. Al analizar los resultados observamos que entre la condición control y el tratamiento con ISM1, prácticamente tuvieron una frecuencia similar de células en proceso de apoptosis; 34.74% y 31.31% respectivamente. Estos resultados sugieren que existe un elevado nivel de apoptosis

en las células de los pacientes con LLA sin ser causa del tratamiento con ISM1 y muy probablemente debidos al estrés provocado por la ausencia de factores de sobrevivencia/proliferación como son; SCF, IL-3, FLT3 y nutrientes como: glucosa, triglicéridos, colesterol entre otros. De acuerdo con esto, un estudio reciente realizado con células de individuos con Leucemia Mieloide Aguda mostró que *in vitro* las células exhiben altos niveles de apoptosis espontánea ($\approx 90\%$), indicando que el microambiente hematopoyético, en especial los adipocitos y producción de FABP4, juegan un papel crítico en la supervivencia de las células leucémicas (Shafat et al., 2017).

Especulando acerca de lo que pasaría con la población GRP78 positiva después del tratamiento con ISM1 (esperando la reducción y/o desaparición), se determinó la frecuencia de células viables que relocalizan GRP78 y se obtuvo un incremento considerable en la frecuencia (11.58%) con respecto al inicio de la estimulación (5.54%). Esto nos habla de que un posible estrés debido a la falta de señales de sobrevivencia y proliferación del microambiente hematopoyético o el estrés inducido por la descongelación sensibilizaron a las células leucémicas a sobreexpresar y relocalizar GRP78 hacia la membrana plasmática. Un hecho interesante se observa en la reducción de la frecuencia de GRP78 en el tratamiento con ISM1 (11.58%) en comparación a la frecuencia observada en la condición control (15.21%). Esta reducción en la frecuencia podría deberse a la interacción ISM1-GRP78 y la subsecuente internalización del complejo, mostrando sólo aquellas células que no llegaron a endocitar GRP78, o bien, la eliminación de las células GRP78⁺ por el

mecanismo de acción propuesto para ISM1 sin que estas fueran registradas por citometría debido a su eliminación. (Chen et al., 2014). Como se mencionó anteriormente, es muy probable que diversos factores que promueven la sobrevivencia y proliferación de las células leucémicas como son SCF, IL-3, IL-7 y FLT3 sean necesarios para mantener vivas a las células leucémicas de pacientes con LLA, sin embargo, la administración de estos podría influir en el efecto proapoptótico promovido por ISM1(Nijmeijer et al., 2009) Optimización de un medio de cultivo libre de suero o de factores de crecimiento hematopoyético específico para células de LLA es necesario para poder observar un efecto claro de ISM1 sobre células leucémicas que relocalizan GRP78. Investigaciones futuras tendrán que realizarse para determinar el efecto de ISM1 sobre células leucémicas de LLA, sobre todo aquellas en cuestión del mantenimiento y sobrevivencia de células leucémicas provenientes de individuos pediátricos con LLA, ya que el aislamiento por FACS y perlas magnéticas no fue posible utilizando condiciones estándar de cultivo *in vitro*.

10 Conclusiones

- El estudio determinó que muestras de individuos pediátricos al momento de diagnóstico con LLA, presentan una población, variante en frecuencia, de células que relocalizan GRP78 hacia la membrana plasmática.
- El efecto proapoptótico de ISM1 sobre las células leucémicas de individuos pediátricos que relocalizan GRP78 en la superficie celular, a través de la vía ISM1-GRP78, no pudo ser determinado en el sistema *in vitro* utilizado.
- Una reducción en la frecuencia de células viables GRP78 positivas en el tratamiento con ISM1 con respecto al control negativo, sugiere la interacción ISM1-GRP78 y su subsecuente internalización.

11 Perspectivas

- Optimizar el método de purificación de células que relocalizan GRP78 hacia la membrana plasmática provenientes de individuos pediátricos al momento de diagnóstico con LLA.
- Fenotipificar las células que relocalizan GRP78 presentes en individuos con leucemia al momento del diagnóstico con LLA.
- Determinar el papel funcional de GRP78 en la membrana plasmática de células leucémicas de individuos con LLA.
- Elucidar el efecto a nivel celular y molecular que ISM1 tiene sobre células leucémicas de LLA que relocalizan GRP78 hacia la superficie celular

12 Bibliografía

ACHARYA, M., EDKINS, A. L., OZANNE, B. W. & CUSHLEY, W. 2009. SDF-1 and PDGF enhance alphavbeta5-mediated ERK activation and adhesion-independent growth of human pre-B cell lines. *Leukemia*, 23, 1807-17.

AL-RAWASHDEH, F. Y., SCRIVEN, P., CAMERON, I. C., VERGANI, P. V. & WYLD, L. 2010. Unfolded protein response activation contributes to chemoresistance in hepatocellular carcinoma. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 22, 1099-105.

ARAP, M. A., LAHDENRANTA, J., MINTZ, P. J., HAJITOU, A., SARKIS, A. S., ARAP, W. & PASQUALINI, R. 2004. Cell surface expression of the stress response chaperone GRP78 enables tumor targeting by circulating ligands. *Cancer Cell*, 6, 275-84.

BAUMEISTER, P., LUO, S., SKARNES, W. C., SUI, G., SETO, E., SHI, Y. & LEE, A. S. 2005. Endoplasmic reticulum stress induction of the Grp78/BiP promoter: activating mechanisms mediated by YY1 and its interactive chromatin modifiers. *Mol Cell Biol*, 25, 4529-40.

BHOJWANI, D., YANG, J. J. & PUI, C. H. 2015. Biology of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Clin North Am*, 62, 47-60.

BROWN, C. M., LARSEN, S. R., ILAND, H. J., JOSHUA, D. E. & GIBSON, J. 2012. Leukaemias into the 21st century: part 1: the acute leukaemias. *Intern Med J*, 42, 1179-86.

BURIKHANOV, R., ZHAO, Y., GOSWAMI, A., QIU, S., SCHWARZE, S. R. & RANGNEKAR, V. M. 2009. The tumor suppressor Par-4 activates an extrinsic pathway for apoptosis. *Cell*, 138, 377-88.

CUBILLOS-RUIZ, J. R., BETTIGOLE, S. E. & GLIMCHER, L. H. 2017. Tumorigenic and Immunosuppressive Effects of Endoplasmic Reticulum Stress in Cancer. *Cell*, 168, 692-706.

CHEN, M., ZHANG, Y., YU, V. C., CHONG, Y. S., YOSHIOKA, T. & GE, R. 2014. Isthmin targets cell-surface GRP78 and triggers apoptosis via induction of mitochondrial dysfunction. *Cell Death Differ*, 21, 797-810.

CHIARINI, F., LONETTI, A., EVANGELISTI, C., BUONTEMPO, F., ORSINI, E., EVANGELISTI, C., CAPPELLINI, A., NERI, L. M., MCCUBREY, J. A. & MARTELLI, A. M. 2016. Advances in understanding the acute lymphoblastic leukemia bone marrow microenvironment: From biology to therapeutic targeting. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1863, 449-463.

DAVIDSON, D. J., HASKELL, C., MAJEST, S., KHERZAI, A., EGAN, D. A., WALTER, K. A., SCHNEIDER, A., GUBBINS, E. F., SOLOMON, L., CHEN, Z., LESNIEWSKI, R. & HENKIN, J. 2005. Kringle 5 of human plasminogen induces apoptosis of endothelial and tumor cells through surface-expressed glucose-regulated protein 78. *Cancer Res*, 65, 4663-72.

DE RIDDER, G. G., RAY, R. & PIZZO, S. V. 2012. A murine monoclonal antibody directed against the carboxyl-terminal domain of GRP78 suppresses melanoma growth in mice. *Melanoma Res*, 22, 225-35.

DORANTES-ACOSTA, E., ZAPATA-TARRÉS, M., MIRANDA-LORA, A., MEDINA-SANSÓN, A., REYES-LÓPEZ, A., PEÑA DEL CASTILLO, H., CORTÉS-GALLO, G., MUÑOZ-HERNÁNDEZ, O. & GARDUÑO-ESPINOSA, J. 2012a. Comparación de las características clínicas al diagnóstico de niños con leucemia linfoblástica aguda afiliados al Seguro Popular, con respecto al desenlace. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 69, 190-196.

DORANTES-ACOSTA, E., ZAPATA-TARRÉS, M., MIRANDA-LORA, A. L., REYES-LÓPEZ, A., MUÑOZ HERNÁNDEZ, O., CORTÉS-GALLO, G. & GARDUÑO ESPINOSA, J. 2012b. Apoyo de organizaciones no gubernamentales a pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda afiliados al Seguro Popular en México. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 69, 212-216.

DOULATOV, S., NOTTA, F., LAURENTI, E. & DICK, J. E. 2012. Hematopoiesis: a human perspective. *Cell Stem Cell*, 10, 120-36.

FULDA, S., GORMAN, A. M., HORI, O. & SAMALI, A. 2010. Cellular Stress Responses: Cell Survival and Cell Death. *International Journal of Cell Biology*, 2010, 23.

HARDY, B., RAITER, A., YAKIMOV, M., VILKIN, A. & NIV, Y. 2012. Colon cancer cells expressing cell surface GRP78 as a marker for reduced tumorigenicity. *Cell Oncol (Dordr)*, 35, 345-54.

INABA, H., GREAVES, M. & MULLIGHAN, C. G. 2013. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*, 381, 10.1016/S0140-6736(12)62187-4.

JANOWSKA-WIECZOREK, A., MAJKA, M., RATAJCZAK, J. & RATAJCZAK, M. Z. 2001. Autocrine/paracrine mechanisms in human hematopoiesis. *Stem Cells*, 19, 99-107.

KAWAHARA, R. & SHIOZAWA, Y. 2015. Hematopoiesis☆. *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier.

KELBER, J. A., PANOPOULOS, A. D., SHANI, G., BOOKER, E. C., BELMONTE, J. C., VALE, W. W. & GRAY, P. C. 2009. Blockade of Cripto binding to cell surface GRP78 inhibits oncogenic Cripto signaling via MAPK/PI3K and Smad2/3 pathways. *Oncogene*, 28, 2324-36.

KHARABI MASOULEH, B., GENG, H., HURTZ, C., CHAN, L. N., LOGAN, A. C., CHANG, M. S., HUANG, C., SWAMINATHAN, S., SUN, H., PAIETTA, E., MELNICK, A. M., KOEFFLER, P. & MUSCHEN, M. 2014. Mechanistic rationale for targeting the unfolded protein response in pre-B acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, E2219-28.

LEE, A. S. 2007. GRP78 induction in cancer: therapeutic and prognostic implications. *Cancer Res*, 67, 3496-9.

LI, Z., ZHANG, L., ZHAO, Y., LI, H., XIAO, H., FU, R., ZHAO, C., WU, H. & LI, Z. 2013. Cell-surface GRP78 facilitates colorectal cancer cell migration and invasion. *Int J Biochem Cell Biol*, 45, 987-94.

LIU, K., CASTILLO, M. D., MURTHY, R. G., PATEL, N. & RAMESHWAR, P. 2007a. Tachykinins and hematopoiesis. *Clin Chim Acta*, 385, 28-34.

LIU, Y., STEINIGER, S. C. J., KIM, Y., KAUFMANN, G. F., FELDING-HABERMANN, B. & JANDA, K. D. 2007b. MECHANISTIC STUDIES OF A PEPTIDIC GRP78 LIGAND FOR CANCER CELL-SPECIFIC DRUG DELIVERY. *Molecular pharmaceutics*, 4, 435-447.

MA, X., GUO, W., YANG, S., ZHU, X., XIANG, J. & LI, H. 2015. Serum GRP78 as a Tumor Marker and Its Prognostic Significance in Non-Small Cell Lung Cancers: A Retrospective Study. *Disease Markers*, 2015, 6.

MARIO ENRIQUE RENDÓN-MACÍAS, N. C. R.-Z., MIGUEL ÁNGEL VILLASÍS-KEEVER, JACOBO SERRANO MENESES, ALBERTO ESCAMILLA NÚÑEZ 2012.

Tendencia mundial de la supervivencia en pacientes pediátricos con

leucemia linfoblástica aguda. Revisión de las últimas cuatro décadas. *Bol Med Hosp Infant Mex* 69, 153-163.

MAYANI, H. 2003. A Glance into Somatic Stem Cell Biology: Basic Principles, New Concepts, and Clinical Relevance. *Archives of Medical Research*, 34, 3-15.

MAYANI H, F.-F. E., PELAYO R, MONTESINOS JJ, FLORES-GUZMÁN P, CHÁVEZ-GONZÁLEZ MA 2007. Hematopoyesis. *Cancerología*, 2, 97-105.

MIGUEL ANGEL VILLASÍS KEEVER, J. S. A. G. M., ALBERTO ESCAMILLA NÚÑEZ, JESÚS BONILLA ROJAS 2012. metaanálisis sobre los factores pronóstico relacionados con la mortalidad en niños con leucemia linfoblástica aguda. *Bol Med Hosp Infant Mex* 69, 175-189.

MIHARADA, K., KARLSSON, G., REHN, M., RORBY, E., SIVA, K., CAMMENGA, J. & KARLSSON, S. 2011. Cripto regulates hematopoietic stem cells as a hypoxic-niche-related factor through cell surface receptor GRP78. *Cell Stem Cell*, 9, 330-44.

MISRA, U. K., DEEDWANIA, R. & PIZZO, S. V. 2006. Activation and cross-talk between Akt, NF-kappaB, and unfolded protein response signaling in 1-LN prostate cancer cells consequent to ligation of cell surface-associated GRP78. *J Biol Chem*, 281, 13694-707.

NAIR, R. R., TOLENTINO, J. & HAZLEHURST, L. A. 2010. The bone marrow microenvironment as a sanctuary for minimal residual disease in CML. *Biochemical Pharmacology*, 80, 602-612.

NI, M., ZHANG, Y. & LEE, AMY S. 2011. Beyond the endoplasmic reticulum: atypical GRP78 in cell viability, signalling and therapeutic targeting. *Biochemical Journal*, 434, 181-188.

NIJMEIJER, B. A., SZUHAI, K., GOSELINK, H. M., VAN SCHIE, M. L., VAN DER BURG, M., DE JONG, D., MARIJT, E. W., OTTMANN, O. G., WILLEMZE, R. & FALKENBURG, J. H. 2009. Long-term culture of primary human lymphoblastic leukemia cells in the absence of serum or hematopoietic growth factors. *Exp Hematol*, 37, 376-85.

OJHA, R. & AMARAVADI, R. K. 2017. Targeting the unfolded protein response in cancer. *Pharmacol Res*, 120, 258-266.

PERA, E. M., KIM, J. I., MARTINEZ, S. L., BRECHNER, M., LI, S. Y., WESSELY, O. & DE ROBERTIS, E. M. 2002. Isthmin is a novel secreted protein expressed as part of the Fgf-8 synexpression group in the *Xenopus* midbrain-hindbrain organizer. *Mech Dev*, 116, 169-72.

PFAFFENBACH, K. T. & LEE, A. S. 2011. The critical role of GRP78 in physiologic and pathologic stress. *Curr Opin Cell Biol*, 23, 150-6.

PUI, C.-H., MULLIGHAN, C. G., EVANS, W. E. & RELLING, M. V. 2012. Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there? *Blood*, 120, 1165-1174.

PUI, C.-H., ROBISON, L. L. & LOOK, A. T. 2008. Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet*, 371, 1030-1043.

RAITER, A., YERUSHALMI, R. & HARDY, B. 2014. Pharmacological induction of cell surface GRP78 contributes to apoptosis in triple negative breast cancer cells. *Oncotarget*, 5, 11452-63.

RIVERA-LUNA, R., SHALKOW-KLINCOVSTEIN, J., VELASCO-HIDALGO, L., CÁRDENAS-CARDÓS, R., ZAPATA-TARRÉS, M., OLAYA-VARGAS, A., AGUILAR-ORTIZ, M. R., ALTAMIRANO-ALVAREZ, E., CORREA-GONZALEZ, C., SÁNCHEZ-ZUBIETA, F. & PANTOJA-GUILLEN, F. 2014. Descriptive Epidemiology in Mexican children with cancer under an open national public health insurance program. *BMC Cancer*, 14, 790.

SCRIVEN, P., COULSON, S., HAINES, R., BALASUBRAMANIAN, S., CROSS, S. & WYLD, L. 2009. Activation and clinical significance of the unfolded protein response in breast cancer. *Br J Cancer*, 101, 1692-8.

SEKE ETET, P. F., VECCHIO, L., BOGNE KAMGA, P., NCHIWAN NUKENINE, E., KRAMPERA, M. & NWABO KAMDJE, A. H. 2013. Normal hematopoiesis and hematologic malignancies: Role of canonical Wnt signaling pathway and stromal microenvironment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1835, 1-10.

SHAFAT, M. S., OELLERICH, T., MOHR, S., ROBINSON, S. D., EDWARDS, D. R., MARLEIN, C. R., PIDDOCK, R. E., FENECH, M., ZAITSEVA, L., ABDUL-AZIZ, A., TURNER, J., WATKINS, J. A., LAWES, M., BOWLES, K. M. & RUSHWORTH, S. A. 2017. Leukemic blasts program bone marrow adipocytes to generate a protumoral microenvironment. *Blood*, 129, 1320-1332.

SHIN, B. K., WANG, H., YIM, A. M., LE NAOUR, F., BRICHORY, F., JANG, J. H., ZHAO, R., PURAVS, E., TRA, J., MICHAEL, C. W., MISEK, D. E. & HANASH, S. M. 2003. Global profiling of the cell surface proteome of cancer cells uncovers an abundance of proteins with chaperone function. *J Biol Chem*, 278, 7607-16.

SZCZEPAŃSKI, T., HARRISON, C. J. & VAN DONGEN, J. J. M. 2010. Genetic aberrations in paediatric acute leukaemias and implications for management of patients. *The Lancet Oncology*, 11, 880-889.

TANIMURA, A., YUJIRI, T., TANAKA, Y., HATANAKA, M., MITANI, N., NAKAMURA, Y., MORI, K. & TANIZAWA, Y. 2009. The anti-apoptotic role of the unfolded protein response in Bcr-Abl-positive leukemia cells. *Leuk Res*, 33, 924-8.

TSAI, Y. L., ZHANG, Y., TSENG, C. C., STANCIAUSKAS, R., PINAUD, F. & LEE, A. S. 2015. Characterization and mechanism of stress-induced translocation of 78-kilodalton glucose-regulated protein (GRP78) to the cell surface. *J Biol Chem*, 290, 8049-64.

UCKUN, F. M., QAZI, S., OZER, Z., GARNER, A. L., PITT, J., MA, H. & JANDA, K. D. 2011. Inducing apoptosis in chemotherapy-resistant B-lineage acute lymphoblastic leukaemia cells by targeting HSPA5, a master regulator of the anti-apoptotic unfolded protein response signalling network. *Br J Haematol*, 153, 741-52.

VALLE-RIOS, R., MARAVILLAS-MONTERO, J. L., BURKHARDT, A. M., MARTINEZ, C., BUHREN, B. A., HOMEY, B., GERBER, P. A., ROBINSON, O., HEVEZI, P. & ZLOTNIK, A. 2014. Isthmin 1 is a secreted protein expressed in skin, mucosal tissues, and NK, NKT, and th17 cells. *J Interferon Cytokine Res*, 34, 795-801.

VENUGOPAL, S., CHEN, M., LIAO, W., ER, S. Y., WONG, W. S. & GE, R. 2015. Isthmin is a novel vascular permeability inducer that functions through cell-surface GRP78-mediated Src activation. *Cardiovasc Res*, 107, 131-42.

WERTHEIM, G. & BAGG, A. 2014. Normal Hematopoiesis A2 - McManus, Linda M. *In: MITCHELL, R. N. (ed.) Pathobiology of Human Disease*. San Diego: Academic Press.

WEY, S., LUO, B. & LEE, A. S. 2012a. Acute Inducible Ablation of GRP78 Reveals Its Role in Hematopoietic Stem Cell Survival, Lymphogenesis and Regulation of Stress Signaling. *PLOS ONE*, 7, e39047.

WEY, S., LUO, B., TSENG, C.-C., NI, M., ZHOU, H., FU, Y., BHOJWANI, D., CARROLL, W. L. & LEE, A. S. 2012b. Inducible knockout of GRP78/BiP in the

hematopoietic system suppresses Pten-null leukemogenesis and AKT oncogenic signaling. *Blood*, 119, 817-825.

XIANG, W., KE, Z., ZHANG, Y., CHENG, G. H., IRWAN, I. D., SULOCHANA, K. N., POTTURI, P., WANG, Z., YANG, H., WANG, J., ZHUO, L., KINI, R. M. & GE, R. 2011. Isthmin is a novel secreted angiogenesis inhibitor that inhibits tumour growth in mice. *J Cell Mol Med*, 15, 359-74.

YUAN, B., XIAN, R., MA, J., CHEN, Y., LIN, C. & SONG, Y. 2012. Isthmin inhibits glioma growth through antiangiogenesis in vivo. *J Neurooncol*, 109, 245-52.

ZHANG, X.-X., LI, H.-D., ZHAO, S., ZHAO, L., SONG, H.-J., WANG, G., GUO, Q.-J., LUAN, Z.-D. & SU, R.-J. 2013a. The Cell Surface GRP78 Facilitates the Invasion of Hepatocellular Carcinoma Cells. *BioMed Research International*, 2013, 8.

ZHANG, Y., CHEN, M., VENUGOPAL, S., ZHOU, Y., XIANG, W., LI, Y. H., LIN, Q., KINI, R. M., CHONG, Y. S. & GE, R. 2011. Isthmin exerts pro-survival and death-promoting effect on endothelial cells through α v β 5 integrin depending on its physical state. *Cell Death Dis*, 2, e153.

ZHANG, Y., LIU, R., NI, M., GILL, P. & LEE, A. S. 2010. Cell surface relocation of the endoplasmic reticulum chaperone and unfolded protein response regulator GRP78/BiP. *J Biol Chem*, 285, 15065-75.

ZHANG, Y., TSENG, C. C., TSAI, Y. L., FU, X., SCHIFF, R. & LEE, A. S. 2013b. Cancer cells resistant to therapy promote cell surface relocalization of GRP78 which complexes with PI3K and enhances PI(3,4,5)P3 production. *PLoS One*, 8, e80071.

ZHAO, L., LI, H., SHI, Y., WANG, G., LIU, L., SU, C. & SU, R. 2015. Nanoparticles inhibit cancer cell invasion and enhance antitumor efficiency by targeted drug delivery via cell surface-related GRP78. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 245-256.