



UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO
DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BÁSICAS



**Inducción de la diferenciación eritroide de
células K562 por tratamiento con ribavirina**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS EN QUÍMICA
APLICADA EN FARMACIA**

PRESENTA

LUIS EDUARDO AVALOS PRIEGO

DIRECTORES

DR. ERICK NATIVIDAD DE LA CRUZ HERNÁNDEZ
DRA. PATRICIA MENDOZA LORENZO

Cunduacán, Tab.

Junio 2023

Carta autorización de impresión



División
Académica
de Ciencias
Básicas



DIRECCIÓN

08 de noviembre de 2023

Q.F.B. LUIS EDUARDO AVALOS PRIEGO
PASANTE DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS
EN QUÍMICA APLICADA
PRESENTE

Por medio del presente y de la manera más cordial, me dirijo a Usted para hacer de su conocimiento que proceda a la impresión del trabajo titulado **"INDUCCIÓN DE LA DIFERENCIACIÓN ERITROIDE DE CÉLULAS K562 POR TRATAMIENTO DE RIBAVIRINA"**, en virtud de que reúne los requisitos para el EXAMEN PROFESIONAL y obtener el grado de Maestro en Ciencias en Química Aplicada.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

ATENTAMENTE


DRA. HERMICENDA PÉREZ VIDAL
DIRECTORA



DIVISIÓN ACADÉMICA DE
CIENCIAS BÁSICAS

C.c.p.- Archivo

DIR'DRA.HPV/JP'DRA.EAM/kal



Km.1 Carretera Conduacán-Jalpa de Méndez, A.P. 24, C.P. 86690, Conduacán, Tab., México.

Tel/Fax: (993) 3581500 Ext. 6701 E-Mail: direccion.dacb@ujat.mx

www.ujat.mx

Carta autorización

CARTA AUTORIZACIÓN

El que suscribe, autoriza por medio del presente escrito a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco para que utilice tanto física como digitalmente la tesis de maestría denominada "**Inducción de la diferenciación eritroide de células K562 por tratamiento con ribavirina**", de la cual soy autor y titular de los Derechos de Autor.

La finalidad de uso por parte de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de la tesis antes mencionada será única y exclusivamente para difusión, educación y sin fines de lucro, autorización que se hace de manera enunciativa mas no limitativa para subirla a la Red Abierta de Bibliotecas Digitales (RABID) y a cualquier otra red académica con las que la Universidad tenga relación institucional.

Por lo antes manifestado, libero a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de cualquier reclamación legal que pudiera ejercer respecto al uso y manipulación de la tesis mencionada y para los fines estipulados en este documento.

Se firma la presente autorización en la ciudad de Cunduacán, Tabasco a los 13 días del mes de Noviembre del año 2023.

Autorizó



Luis Eduardo Avalos Priego

Dedicatoria

A mis padres Luis Manuel Avalos Ramón y Teodora Priego Mendoza, por ser mi motivación, brindarme su apoyo y alentarme para seguir siempre adelante en todo lo que me propongo.

A mi hermana Cecilia Guadalupe Avalos Priego por su cariño y su compañía.

Al Dr. Erick Natividad de la Cruz Hernández y a la Dra. Patricia Mendoza Lorenzo, por guiar mi trayectoria académica y todas sus aportaciones a este proyecto, ya que, sin ellos no sería posible.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

Agradecimientos

A la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, a las autoridades de la institución y muy especialmente a los maestros que, con su ardua labor, ofrecen una educación de calidad.

A la División Académica de Multidisciplinaria de Comalcalco, por todas las facilidades brindadas para el uso de sus instalaciones y del laboratorio de Investigación Biomédicas de Enfermedades Metabólicas e Infecciosas donde se desarrolló este proyecto.

A los directores de tesis

Dr. Erick Natividad de la Cruz Hernández y la Dra. Patricia Mendoza Lorenzo, por brindarme la oportunidad de poder trabajar con este proyecto, por su paciencia y dedicación a compartir su experiencia profesional y de investigación conmigo, pero, sobre todo, por su amistad.

Al comité evaluador

Dr. José Arnold Gonzáles Garrido, Dr. Carlos Javier López Victorio, Dr. Cesar Manuel Landa Pineda, Dr. Abraham Gómez Rivera, por sus aportaciones y recomendaciones al proyecto.

A la técnica de laboratorio

Q.F.B. María Fernanda Hernández Landero, por su invaluable apoyo profesional y personal.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Por la beca de maestría otorgada durante el desarrollo de este proyecto con número de registro 1080345.

A mis amigos

Q.F.B. Carlos García Ramos, M.C. Corazón de María Márquez Álvarez, M.C. Carlos Francisco Aguilar Gamas, Q.F.B. Luis Eduardo Ramos Valdiviezo, Abigail Zentella Hernández, por compartir conmigo su experiencia, sus consejos, su tiempo y su valiosa amistad.

Contenido

Carta autorización de impresión	I
Carta autorización	II
Dedicatoria	III
Agradecimientos	IV
Contenido	V
Índice de figuras	VII
Índice de tablas	IX
Lista de abreviaturas	X
Resumen	XIII
1. Introducción	1
2. Marco teórico	3
2.1. Hematopoyesis	3
2.2. Eritropoyesis	5
2.3. Hemoglobina	6
2.4. Regulación de la eritropoyesis	8
2.4.1. Factores extracelulares	8
2.4.2. Control transcripcional de la eritropoyesis	12
2.4.3. GATA-1	13
2.4.4. GATA-2	14
2.4.5. Regulación genética del cambio de GATA-2 a GATA-1	15
2.4.6. TAL1	17
2.4.7. KLF1	17
2.5. Patologías de la eritropoyesis	19
2.5.1. Epidemiología de las afecciones eritropoyéticas	19
2.6. Talasemias y hemoglobinopatías	21
2.6.1. Alfa talasemia	22
2.6.2. Beta talasemia	24
2.6.3. Tratamientos para las talasemias	24
2.7. Leucemias	26
2.7.1. Leucemia mieloide crónica: Historia y epidemiología	27
2.7.2. Parámetros clínicos y biológicos de la leucemia mieloide crónica	28
2.8. Tratamientos y desventajas actuales (resistencia)	30
2.8.1. Tratamientos para la leucemia mieloide crónica	30

2.8.2. Quimioterapia.....	30
2.8.3. Inhibidores de tirosina cinasas	31
2.8.4. Oncogenes	32
2.9. Nuevas estrategias terapéuticas relacionadas con la inducción de la diferenciación celular.....	33
2.9.1. Ribavirina como tratamiento.....	35
2.9.2. Mecanismos antitumorales de ribavirina.....	37
2.9.3. Efectos de ribavirina sobre eIF4E.....	38
2.9.4. Efectos de ribavirina sobre las vías MAPK, ERK, MNK.....	40
2.10. Línea celular K562 como modelo de estudio.....	41
4. Hipótesis	44
5. Objetivos	45
Metodología	46
6.1. Esquema de trabajo.....	46
6.2. Cultivo celular	46
6.3. Tratamiento de las células K562	47
6.4. Evaluación de viabilidad celular con XTT	48
6.5. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo.....	48
6.6. Análisis de genes por qPCR.....	49
6.7. Análisis de proteínas por western blot.....	50
6.8. Análisis estadístico.....	51
7. Resultados y discusión	52
7.1. Determinación de la diferenciación eritroide.....	52
7.3. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo.....	57
7.4. Análisis de genes por qPCR.....	60
7.5. Análisis de proteínas por western blot.....	69
7.6. Comparación de los efectos de ribavirina con los inhibidores PALOMID 529 y PD184352.....	74
8. Conclusiones.....	83
9. Perspectivas.....	84
9. Bibliografía.....	85

Índice de figuras

Figura 1. Modelo jerárquico de la hematopoyesis.....	4
Figura 2. Linfopoyesis.	5
Figura 3. Eritropoyesis.	6
Figura 4. Hemoglobinas.	7
Figura 5. Vías de señalización activadas por eritropoyetina.	10
Figura 6. Visión general de la eritropoyesis: regulación a múltiples niveles por diversas proteínas y miARNs.....	13
Figura 7. Regulación genética del cambio de GATA-2 a GATA-1.....	16
Figura 8. Morbimortalidad hospitalaria de la población mexicana.....	20
Figura 9. Agrupaciones genéticas de los genes de las globinas en el cromosoma 11 y 16.	22
Figura 10. Translocación cromosómica y formación del cromosoma Filadelfia.....	28
Figura 11. Mecanismo de acción del Imatinib.	32
Figura 12. Molécula de ribavirina.	36
Figura 13. Esquema general de trabajo.....	46
Figura 14. Determinación cualitativa de la diferenciación de células K562 por microscopía óptica.	52
Figura 15. Determinación semicuantitativa de la diferenciación de células K562 por microscopía óptica.....	53
Figura 16. Diferenciación de células K562 con ribavirina.....	54
Figura 17. Viabilidad de células K562 con ribavirina.....	57
Figura 18. Distribución de las fases del ciclo celular de la línea K562 a diferentes concentraciones de ribavirina.....	58
Figura 19. Principales aductos formados en la interacción del cisplatino con el ADN.....	59
Figura 20. Expresión del gen HB-A1-2.....	61
Figura 21. Expresión del gen HB-B.....	62
Figura 22. Expresión del gen HB-G.....	63
Figura 23. Expresión del gen KLF1.	64
Figura 24. Expresión del gen TAL1.	65

Figura 25. Expresión del gen GATA-2.	66
Figura 26. Expresión del gen GATA-1.....	67
Figura 27. Expresión del gen FAM122.....	68
Figura 28. Expresión del gen EIF4E.	69
Figura 29. Niveles de expresión de proteínas con ribavirina a 72 y 96 h.....	71
Figura 30. Mecanismo de acción de ribavirina en un modelo de células eritroleucemicas.....	73
Figura 31. Determinación cualitativa de la diferenciación de células K562 por microscopia óptica con inhibidores de TORC1 y de MEK/ERK.....	76
Figura 32. Determinación semicuantitativa de la diferenciación de células K562 por densidad óptica con inhibidores de TORC1 y de MEK/ERK.....	77
Figura 33. Expresión del gen KLF1 y TAL1, 72 h de tratamiento con inhibidores de TORC1 y de MEK/ERK.....	79
Figura 34. Expresión del gen GATA-2 y FAM122, 72 h de tratamiento con inhibidores de TORC1 y de MEK/ERK.....	80
Figura 35. Expresión del gen EIF4E, 72 h de tratamiento con inhibidores de TORC1 y de MEK/ERK.....	81
Figura 36. Niveles de expresión de proteínas a 72 h de tratamiento con ribavirina, PALOMID529 y PD184352.....	82

Índice de tablas

Tabla 1. Oligonucleótidos usados para el análisis de expresión de genes.....49

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

Lista de abreviaturas

LMC: leucemia mieloide crónica.

OMS: organización mundial de la salud.

HSC: células madre hematopoyéticas.

PMP: progenitores multipotentes.

PLC: progenitores linfoides comunes.

Pro-CLI: células prolinfocíticas innatas.

PMC: progenitores mieloides comunes.

PEM: progenitores eritroide-megacariocítico.

UFB-E: unidades formadoras de brotes eritroides.

CFB-Meg: células formadoras de brotes megacariocíticos.

PGM: progenitores gránulo-monocito.

UFM-M: unidades formadoras de colonias mielocíticas.

UFC-G: unidades formadoras de colonias granulocíticas.

UFC-E: unidades formadoras de colonias eritroides.

PE: proeritroblasto.

EB: eritroblasto basófilo.

EPC: eritroblasto policromatofilico.

EO: eritroblasto ortocromático.

Ret: reticulocito.

HB-A: globina α .

HB-B: globina β .

HB-G: globina γ .

HB-E: globina ϵ .

HB-D: globina δ .

HB-Z: globina ζ .

SCF: stem cell factor (factor de células madre).

IL: interleucina.

Epo: eritropoyetina.

EpoR: receptor de eritropoyetina.

HIF-2: factor hipoxia-inducible 2.

JAKs: Janus cinasas

STATs: traductores de señales y activadores de la transcripción (o por sus siglas en inglés, signal transducers and activators of transcription).

SH2: dominios con homología de secuencia Scr-2.

PI3K: fosfatidilinositol 3-cinasa.

MAPK: proteína cinasa activada por mitógeno.

FIG: factores de intercambio de nucleótidos de guanina.

GDP: guanosín difosfato.

GTP: guanosín trifosfato.

PTPs: proteínas tirosina-fosfatasa.

REC: red eritroide central.

G1HRD: dominio regulador hematopoyético del locus de GATA-1.

G1HE: amplificador hematopoyético GATA-1.

TAL1: proteína 1 de leucemia linfocítica aguda de células T.

KLF1: factor 1 similar a Krueppel (o por sus siglas en inglés, Krueppel Like Factor 1).

ACH: concentrador de cromatina activo.

MCV: volumen corpuscular medio.

MCH: hemoglobina corpuscular media.

TDT: talasemia dependiente de transfusiones.

NTDT: talasemia no dependiente de transfusiones.

NTBI: hierro no ligado a la transferrina.

CTL: células troncales leucémicas.

LLC: leucemia linfocítica crónica.

LLA: leucemia linfocítica aguda.

LMA: leucemia mieloide aguda.

CDDP: Cisplatino.

LPA: leucemia promielocítica aguda.

ATRA: ácido-retinoico trans.

ARA-C: arabinósido de citosina.

ACM: tratamiento secuencial de aclarubicina A.

eIF4E: factor de iniciación de la traducción eucariota 4E.

ATCC: American Type Culture Collection.

PBS: tampón fosfato salino.

RB: ribavirina.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

Resumen

Las leucemias mieloides y las talasemias representan un importante problema de salud debido a que estas patologías se caracterizan por que afectan directamente la diferenciación terminal de los eritrocitos, desencadenando en sintomatologías como fatiga, anemias, dificultad para respirar, hematomas, palidez, pérdida de peso o sangrado, y en sus casos más graves la muerte. Se ha reportado que el uso de altas concentraciones del fármaco antiviral ribavirina ($>50 \mu\text{M}$) induce la diferenciación terminal de células mieloides inmaduras a eritrocitos e incrementa la hemoglobina fetal, sin embargo, se desconoce el mecanismo de acción vinculado con este efecto. En este contexto, se propuso como objetivo evaluar la participación de las vías MAPK y AKT, así como de la actividad de la proteína eIF4E (4E), sobre la diferenciación eritroide de las células K562 inducida por el tratamiento con ribavirina. Para ello, se empleó ribavirina ($\leq 50 \mu\text{M}$) en un modelo con células eritroleucémicas K562, a las cuales se les realizó la caracterización cualitativa y semicuantitativamente de células diferenciadas con ribavirina mediante tinción con bencidina, microscopía óptica y espectrofotometría. Se estimó la viabilidad celular a través del ensayo XTT. Se identificaron las fases del ciclo celular por tinción con yoduro de propidio y citometría de flujo. Por último, se analizó la expresión de marcadores y rutas de diferenciación por RT-PCR y western blot. De acuerdo con los resultados, ribavirina demostró ser inductor de la diferenciación eritroide (máx. 98%) y promotor de la síntesis de hemoglobina fetal en concentraciones menores a $50 \mu\text{M}$ a través del aumento de la expresión de genes y proteínas como HB-B, HB-G, KLF1, TAL1, GATA-1; también redujo la expresión de factores que inhiben la maduración eritroide como GATA-2 y FAM122. Además, se registró una regulación a la baja de la fosforilación de las proteínas de la vía MAPK / AKT como también de 4E. Finalmente podemos concluir que la concentración de $30 \mu\text{M}$ de ribavirina es la óptima para promover la diferenciación eritroide, la síntesis de hemoglobina, la disminución de la viabilidad celular y la reducción de la proliferación. La disminución de la fosforilación de 4E sugiere una posible regulación de la traducción de los factores que regulan de manera negativa a la diferenciación eritroide (GATA-2, FAM122).

1. Introducción

La eritropoyesis es el proceso por el cual se generan las células eritrocíticas encargadas del transporte de oxígeno a los tejidos (1). Este mecanismo forma parte de la hematopoyesis, un proceso encargado del desarrollo, diferenciación y maduración de los elementos de la sangre (eritrocitos, leucocitos, linfocitos y plaquetas) (2). La eritropoyesis se lleva a cabo de manera gradual, identificándose estadios celulares intermedios entre la célula madre y el eritrocito maduro (3). Esta diferenciación progresiva está controlada a nivel molecular por factores de crecimiento y hormonas (eritropoyetina), quienes activan diferentes vías de señalización a través de la expresión de factores de transcripción eritroides (4). Esta regulación se puede afectar en cualquier punto del proceso, dando lugar a diferentes patologías como las talasemias, la anemia de células falciformes, la leucemia mieloide y la policitemia vera (5,6).

Las enfermedades hematológicas como la leucemia mieloide crónica (LMC) y las talasemias, son enfermedades neoplásicas en las cuales la principal línea celular afectada es eritroide, lo que promueve que dichas células se queden en un estado indiferenciado, reduciendo su capacidad de sintetizar hemoglobina adulta (7). Las hemoglobinopatías representan un importante problema de salud al registrarse hasta en un 71% de los 229 países considerados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (8). Cada año nacen más de 330 000 niños afectados (83% con anemia de células falciformes y 17% con talasemias) causando el 3,4% de las defunciones entre niños menores de 5 años (9). Actualmente el tratamiento para la LMC se basa en el uso de fármacos que provocan apoptosis y agentes (E.g: anticuerpos y fármacos) que buscan disminuir la actividad de los receptores tirosina cinasa, teniendo como principal desventaja que en su mayoría suelen generar efectos adversos muy notorios y con el tiempo producen resistencia farmacológica (10).

Por otra parte, los tratamientos para las talasemias incluyen el trasplante de médula ósea, la terapia génica, o de uso más común, la transfusión de glóbulos rojos, lo que resulta de muy difícil acceso para los pacientes debido a la baja cantidad de donadores, los problemas de compatibilidad, las reacciones inmunes y el riesgo de infecciones (10).

Ante esta problemática se está investigando el uso de nuevas terapias con compuestos capaces de promover la diferenciación de las células inmaduras generadas en las LMC y que favorezcan la síntesis de las cadenas de hemoglobina para compensar los efectos de las talasemias (7). Se ha reportado que la 1-[(2R,3R,4S,5R)-3,4-dihidroxi-5-(hidroximetil) oxolan-2-il]-1,2,4-triazol-3-carboxamida, conocido como ribavirina (RB) es fármaco antiviral empleado en el tratamiento de diversas enfermedades virales. Se ha propuesto que uso puede inducir la diferenciación de células mieloides inmaduras a eritrocitos e incrementa la hemoglobina fetal (4,11). Sin embargo para alcanzar este objetivo se han empleado altas concentraciones (>50 μM), lo cual reduce su posible aplicación. Además de que el mecanismo de acción responsable de esta actividad se desconoce por completo. La ribavirina también ha demostrado activar las vías apoptóticas de líneas celulares como K562 y HepG2 (12).

En este contexto, el presente trabajo evaluó el potencial de la Rb como inductor de la diferenciación eritroide, de la síntesis de hemoglobina y de la inhibición de la viabilidad celular usando como modelo *in vitro* la línea celular leucémica humana K562, empleadas con frecuencia para estudiar los mecanismos moleculares que regulan la expresión de genes de la globina humana, así como para determinar el potencial terapéutico de nuevos compuestos diferenciadores de células eritroides (10). Además, se investigó la participación las rutas MAPK y AKT en la regulación de la actividad de la proteína 4E, así como el efecto sobre los genes que participan en la diferenciación eritroide.

2. Marco teórico

2.1. Hematopoyesis

En el cuerpo de una persona adulta diariamente se producen más de un millón de células maduras por segundo, esto para compensar las células que se pierden de manera fisiológica, con el objetivo de mantener la homeostasis en el organismo (13). A este proceso encargado del desarrollo, diferenciación y maduración de las células de la sangre (glóbulos rojos, glóbulos blancos, plaquetas) se le conoce como hematopoyesis. En el adulto, el proceso inicia en la médula ósea, en la cual residen las células madre hematopoyéticas (HSC, del inglés: hematopoietic stem cells), células pluripotenciales que pueden generar distintos linajes celulares en condiciones adecuadas y en presencia de diversos factores de diferenciación (14). El linaje mieloide se encarga del desarrollo de los eritrocitos o glóbulos rojos; que tienen la función de transportar el oxígeno y el dióxido de carbono desde los pulmones a los tejidos y viceversa; además de las plaquetas, cuya función se relaciona principalmente con la hemostasia y la respuesta inmune, entre otras. Por otro lado, se encuentra el linaje linfóide encargado del desarrollo de los linfocitos B, T y células Natural Killers, los cuales están relacionados con la respuesta inmunológica del huésped (15).

Las HSCs se dividen por mitosis para mantener la reserva de células madre y a partir de ellas, algunas células se diferenciarán en células progenitoras de cada uno de los linajes celulares, mediante el control transcripcional de genes específicos de cada linaje (15). Por lo tanto, en respuesta a señales de diferenciación, las HSCs se diferencian hacia progenitores multipotentes (PMP) que corresponden al 0.5% del total de las células de la médula ósea, las cuales han perdido su capacidad de autorrenovación, pero conservan su potencial proliferativo.

Los PMP presentan patrones de expresión de marcadores celulares muy particulares de acuerdo con el linaje que pertenece. Estas características les permiten responder a estímulos específicos para posteriormente diferenciarse a progenitores oligopotentes comprometidos con linajes específicos ya sea linfóide o mieloide (figura 1). Estas células mantienen una alta capacidad proliferativa y constituyen >90% de las células hematopoyéticas residentes (1).

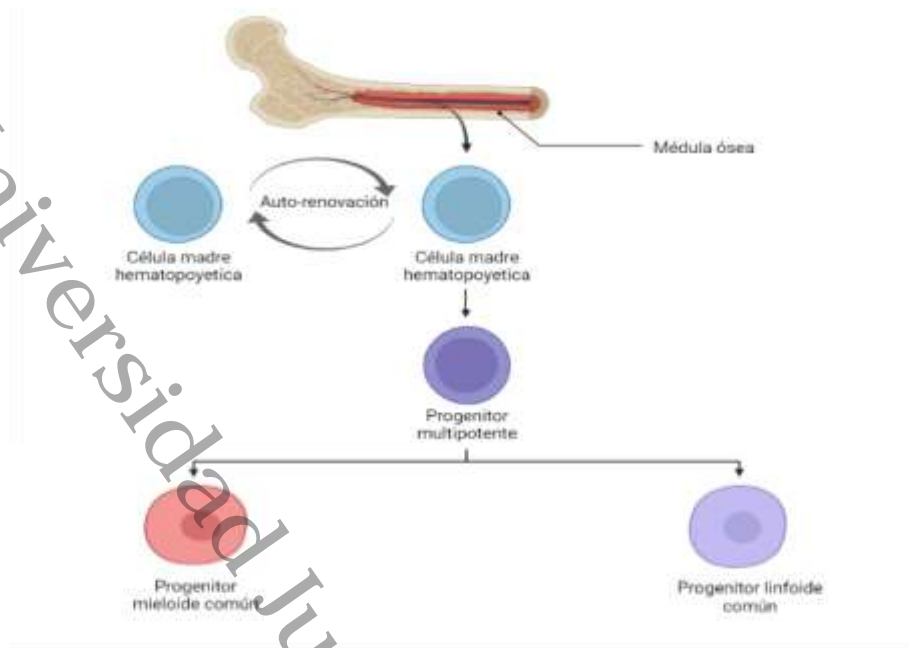


Figura 1. Modelo jerárquico de la hematopoyesis. Creado en BioRender.com.

Estos progenitores oligopotentes dan lugar a todas las células efectoras del sistema hematopoyético, como los progenitores linfoides comunes (PLC) que posteriormente dan origen a los prolinfocito T, prolinfocito B, prolinfocito NK y células prolinfocíticas innatas (Pro-CLI) finalmente originando células linfocito T, linfocito B, linfocito NK y linfocíticas innatas, a través del proceso conocido como linfopoyesis (figura 2). Por otra parte, los progenitores mieloides comunes (PMC) dan origen a los progenitores eritroide-megacariocítico (PEM) que a su vez se diferencian a unidades formadoras de brotes eritroides (UFB-E) y células formadoras de brotes megacariocíticos (CFB-Meg), para generar eritrocitos y plaquetas. Adicionalmente, los PMC también generan los progenitores gránulo-monocito (PGM) que dan origen a las unidades formadoras de colonias mielocíticas (UFM-M) y las unidades formadoras de colonias granulocíticas (UFC-G), dando como producto final los macrófagos y granulocitos respectivamente (figura 3). En resumen, la hematopoyesis se regula de manera precisa con el propósito de: 1) mantener un fondo común disponible de HSCs, 2) regular la asignación, proliferación y diferenciación de las células en todas las etapas de cada vía y 3) modular la actividad de cada vía en respuesta a las demandas fisiológicas (16).

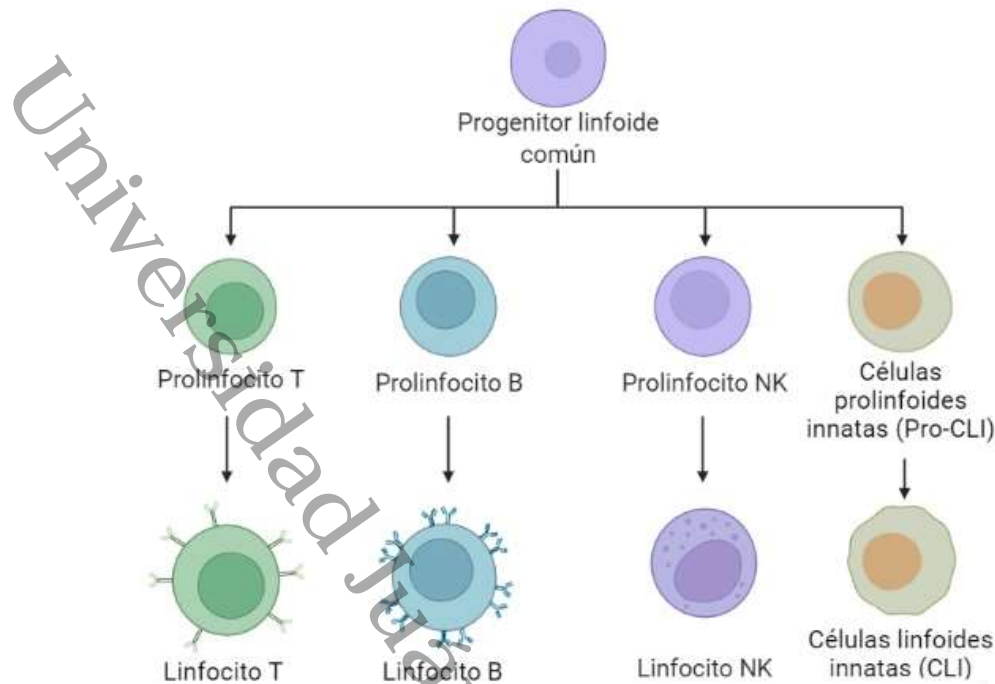


Figura 2. Linfopoyesis. Creado en BioRender.com.

2.2. Eritropoyesis

El modelo comúnmente usado para explicar la eritropoyesis se basa en la existencia de PMP. Esta célula da lugar al PMC (figura 3), el cual dará lugar, a su vez, al PEM (16). En este modelo clásico, la eritropoyesis se basa en la diferenciación progresiva de progenitores hematopoyéticos cada vez más restringidos hacia el linaje eritroide por los patrones de expresión génica (17).

Los progenitores eritroides más primitivos son denominados UFB-E, las cuales mantienen una alta tasa de proliferación en respuesta a citocinas, mientras que los progenitores eritroides más diferenciados, denominados unidades formadoras de colonias eritroides (UFC-E), poseen menor capacidad proliferativa, pero mantienen la capacidad para formar colonias en medios semisólidos (18). Estos progenitores dan lugar a precursores eritroides, como el proeritroblasto (PE), que se diferenciarán posteriormente a eritroblasto basófilo (EB), eritroblasto policromatofílico (EPC) y eritroblasto ortocromático (EO), que finalmente al enuclearse, dará lugar al reticulocito (Ret) y finalmente al eritrocito (figura 3). Estos precursores muestran una reducción progresiva de tamaño

celular y nuclear, al mismo tiempo inician la producción de proteínas necesarias para la síntesis de hemoglobina (18).

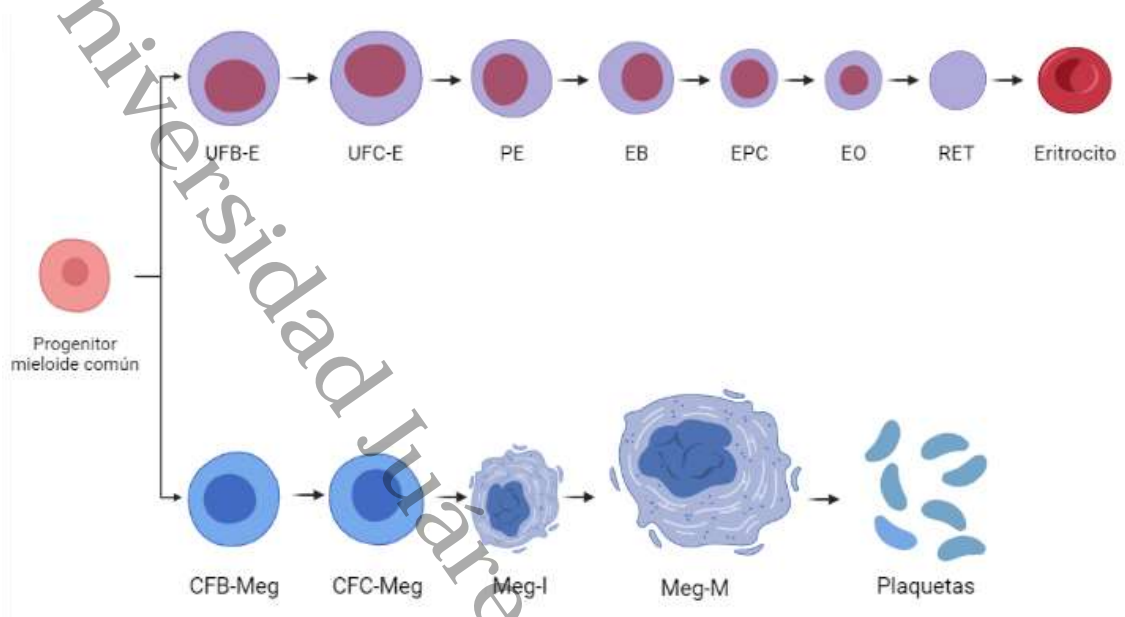


Figura 3. Eritropoyesis. Creado en BioRender.com.

Se ha descrito que el PE sufre tres mitosis, que genera sucesivamente dos EB, cuatro EPC, ocho EO y 16 Ret, que diferencian en 16 eritrocitos. Los eritrocitos maduros contienen una red citoesquelética especializada unida a la membrana plasmática, lo que les confiere la capacidad de soportar grandes deformaciones sin perder su integridad estructural, y le confiere su forma de disco oval bicóncavo (18).

2.3. Hemoglobina

La principal función que cumplen los eritrocitos es el transporte de oxígeno y dióxido de carbono, esto lo realiza con ayuda de la hemoglobina, siendo estas células las únicas capaces de producirla. La hemoglobina adulta es un tetrámero formado por dos globinas alfa (α) y dos globinas beta (β) unidas a un anillo porfirínico que contiene hierro, denominado grupo hemo (4). En el ser humano se pueden encontrar 6 tipos de hemoglobinas a lo largo del desarrollo (figura 4): las hemoglobinas embrionarias gower I (2 globinas ζ y ϵ), portland (2 globinas ζ y γ), gower II (2 globinas α y ϵ), la hemoglobina fetal (2 globinas α y γ) y la hemoglobina adulta 1 (globinas α y β) y 2 (2 globinas α y δ). Para regular la

síntesis de hemoglobina existen diferentes genes que controlan la expresión de las globinas dependiendo de la etapa del desarrollo del organismo. Inicialmente en la etapa embrionaria y fetal donde ocurre la eritropoyesis primitiva, se expresan los genes de las globinas ζ (HB-Z) y α (HB-A), los cuales se encuentran en el cromosoma 16, además de las globinas ϵ (HB-E) y γ (HB-G) localizados en el cromosoma 11. A partir del nacimiento se presenta el cambio de expresión de globinas fetales a las globinas adultas, en las cuales los genes implicados son: HB-A 1-2, globina β (HB-B) y globina δ (HB-D), marcando así el comienzo de la eritropoyesis definitiva (18).

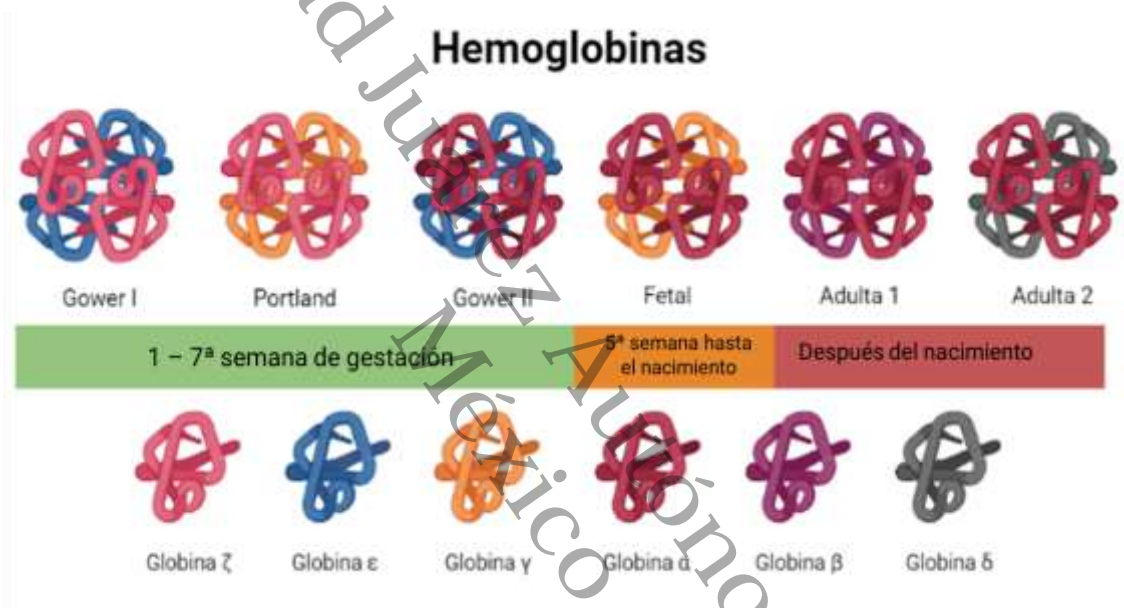


Figura 4. Hemoglobinas. Creado en BioRender.com.

Respecto a los mecanismos de control de este proceso, se ha descrito recientemente que el gen KLF1 juega un papel fundamental en la regulación del cambio entre la expresión de hemoglobina fetal y adulta, tanto en la activación directa de la globina β , como en la represión indirecta de la expresión del gen de la globina γ mediante la regulación de BCL11A (19). Se sabe que BCL11A se une al promotor del gen de la globina β , aunque es desconocido el mecanismo exacto implicado en el silenciamiento de la expresión de la hemoglobina fetal (15). La importancia de entender las bases moleculares del cambio de la hemoglobina fetal a la adulta debe al diseño de posibles esquemas terapéuticos. Existe evidencia clínica que vincula la producción de hemoglobina fetal con la reducción de la gravedad de las hemoglobinopatías como la beta

talasemia, la anemia de células falciformes y en el tratamiento de las leucemias mieloides (10).

2.4. Regulación de la eritropoyesis

La eritropoyesis está altamente regulada por diferentes factores que se diferencian por el sitio de acción, ya sea a nivel extracelular como los factores de crecimiento o a nivel intracelular como son los factores de transcripción. En los siguientes apartados abordaremos cada uno de ellos.

2.4.1. Factores extracelulares

Los factores extracelulares que participan en la regulación de la eritropoyesis constan de varias citocinas que actúan de manera conjunta. Tal es el caso del factor de células madre (SCF, del inglés: Stem cell factor), el cual se une al receptor c-KIT, que es un receptor con actividad tirosina cinasa y requiere de la acción sinérgica de las interleucinas (IL) 3, 6 y la eritropoyetina (Epo). El SCF en combinación con Epo aumenta el número de células precursoras eritroides generadas a partir de células PMP primitivas y permite que los precursores respondan a niveles de Epo que son demasiado bajos para provocar una respuesta en ausencia de SCF (20). Además, SCF puede fosforilar indirectamente al receptor de Epo a través del receptor c-KIT (18). Siendo así la Epo el principal regulador a nivel extracelular de la eritropoyesis. Ya que la Epo estimula la eritropoyesis, promueve la supervivencia, proliferación y diferenciación terminal de los UFC-E y eritroblastos (4). La síntesis de Epo se regula por los niveles de oxígeno tisular, proceso en el que cumple un rol primordial el factor de transcripción HIF-2 (factor inducible por hipoxia-2), que regula la expresión de los genes implicados en la eritropoyesis en respuesta a los cambios en la presión parcial de oxígeno. En el humano, el 85-90% de la hormona se forma en el riñón, en el endotelio de los capilares situados alrededor de los canales nefríticos y el 10- 15% en el hígado, siendo este último el sitio predominante durante la vida fetal. Una vez sintetizada, la Epo circula hasta la médula ósea donde cumple su función como "factor de crecimiento" sobre sus células objetivo (21).

6

Cuando la Epo llega a la médula ósea, su acción es mediada por la unión a su receptor (EpoR) localizado en la membrana celular, lo que desencadena una cascada de señales que termina en la regulación de la transcripción de genes específicos del linaje eritroide. El mecanismo de señalización del complejo Epo/EpoR depende principalmente de la activación de dos familias de proteínas cinasas intracelulares acopladas al EpoR, conocidas como Janus cinasas (JAKs) y la traducción de la señal a través de las proteínas activadores de la transcripción STAT-5 (por su siglas en inglés signal transducers and activators of transcription) (21). La formación del complejo Epo/EpoR recluta a la proteína JAK2 para la transfosforila de los ocho residuos de tirosina que se encuentran en el dominio distal citoplasmático del EpoR. La fosforilación de estos residuos de tirosina provee los sitios de unión para las proteínas STAT5, además de la activación de la proteínas fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) y de la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) (figura 5) (22). La vía de PI3K/AKT está relacionada con la supervivencia celular, inhibiendo la translocación del factor de transcripción FOXO3a mediante la fosforilación. Esto genera la disminución de la transcripción de los genes diana y de sus productos de expresión, normalmente activados por FOXO3a, entre ellos la proteína que controla la transición del ciclo celular p27^{kip1} (23).

1

En la vía llamada JAK-STAT, de los diez miembros de la familia de STAT, que actúan como factores de transcripción activados por dimerización tras la fosforilación de las tirosina, solo las isoformas STAT5a y STAT5b son las activadas por el complejo Epo-EpoR. Uno de los genes controlados por STAT5 es la proteína antiapoptótica BCL-xL, la cual promueve la supervivencia de las células mieloides primitivas. Aunque se conoce que la activación de STAT5 por Epo es necesaria para la eritropoyesis, los mecanismo por los cuales se generan los cambios en los patrones de expresión eritroides no se conocen por completo (24). Estudios recientes identificaron los lugares de unión de STAT5 sobre la cromatina en más de 300 localizaciones genómicas, concretamente regiones promotoras distales, ocupadas también por otros factores de transcripción como GATA-1, KLF1 y TAL1, denominados reguladores maestros de la diferenciación eritroide (24).

1

La vía Ras/Raf/MAPK es también activada por el EpoR, inicialmente las proteínas adaptadoras como Grb2 pueden reconocer los dominios SH2 como Shc, que a su vez reclutan factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF; por sus siglas en inglés, guanine nucleotide exchange factor) como SOS o CDC25 en la membrana celular. Los GEF poseen la capacidad de interactuar con las proteínas Ras en la membrana celular para promover un cambio conformacional y el intercambio de guanosín difosfato (GDP) por guanosín trifosfato (GTP), para activar los demás miembros de esta vía Ras/Raf/MAPK (Figura 5). La función de esta vía es transducir señales desde el medio extracelular al núcleo donde se activan genes específicos para el crecimiento, división y diferenciación celular (25).

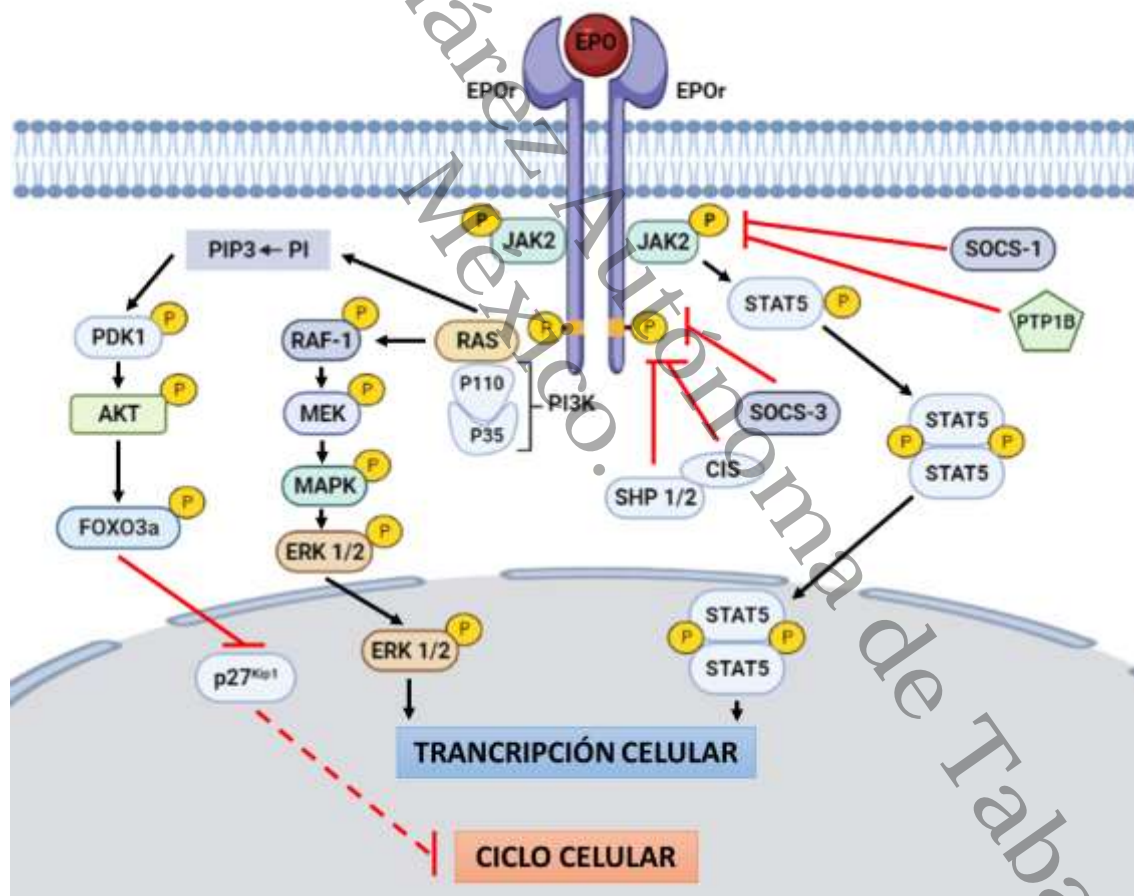


Figura 5. Vías de señalización activadas por eritropoyetina. Modificado de “Eritropoyetina como agente eritropoyético y no eritropoyético: consideraciones terapéuticas”, elaborado por Vittori D y colaboradores (21).

Una importante característica de la señalización mediada por Epo es la naturaleza transitoria de su activación, dado que los procesos de fosforilación

1 son mecanismos postraduccionales inducidos por la activación del EpoR, la desfosforilación es necesaria para su desactivación. La desfosforilación del receptor se lleva a cabo por la fosfatasa SHP-1, que se une a través de su dominio SH2 a las tirosinas fosforiladas (4). SHP-1 también participa en la inhibición de la actividad de JAK2. Otro mecanismo de desactivación está mediado por las proteínas fosfatasas de la familia SOCS (del inglés: Suppressor of cytokine signaling): SOCS-1, CIS, y SOCS-3 son activadas por los factores de transcripción STAT tras la estimulación por la Epo. Estas proteínas inhiben directamente JAK2 a través de su unión al dominio cinasa, iniciando la degradación proteosomal mediada por ubiquitina. Por último, otro mecanismo de desfosforilación son las proteínas tirosina-fosfatasas (PTP; del inglés, protein tyrosine phosphatase), las cuales catalizan la desfosforilación de residuos tirosina. En particular, PTP1B induce una retroalimentación negativa, modulando de esta forma la señalización activada por la interacción Epo/EpoR (21).

1 La proteína de matriz extracelular fibronectina también es importante para la eritropoyesis; la fibronectina y la Epo regulan la proliferación eritroide en diferentes etapas de desarrollo. Durante el primer día de cultivo, las UFC-E experimentan 2 divisiones, regulan positivamente el receptor de transferrina y comienzan la expresión de Ter119 y varios cientos de otros genes importantes para el linaje eritroide. Esta etapa requiere Epo, pero es independiente de la fibronectina. Durante el segundo día, hay 2 o 3 divisiones celulares rápidas con ausencia de las fases G1 y G2; estando la mayoría de las células en fases S o M. Posteriormente se presenta una represión completa de toda la transcripción de genes, condensación de cromatina, condensación nuclear y enucleación. La adhesión a la fibronectina, sin presencia de Epo, es fundamental para las últimas divisiones celulares terminales y favorecer la enucleación. Las integrinas $\alpha 4$, $\alpha 5$ y $\beta 1$ se expresan principalmente en progenitores eritroides. Los fragmentos de fibronectina se acoplan a $\alpha 4\beta 1$ (pero no a $\alpha 5\beta 1$) la integrina apoya la proliferación terminal normal. En ausencia de fibronectina, una fracción de los eritroblastos cultivados enuclea, pero estos generan "reticulocitos" más grandes de lo normal (26). Se considera que esto podría estar relacionado con las anemias macrocíticas en las que se producen glóbulos rojos grandes y pobremente hemoglobinizados. En conjunto, estos datos sugieren un modelo de 2 fases para

1 el factor de crecimiento y la regulación de la matriz extracelular de la eritropoyesis, con una fase temprana independiente de integrina dependiente de Epo, seguida de una fase dependiente de integrina $\alpha 4\beta 1$ independiente de Epo (26).

2.4.2. Control transcripcional de la eritropoyesis

La regulación de la expresión génica es un importante mecanismo de control de la diferenciación eritroide. STAT5 y otros reguladores transcripcionales dependientes de la Epo, activan la expresión de genes como GATA-2, GATA-1, FOG, TAL1, LDB1, LMO2, PU1, y GFI-1B (26). Estos reguladores maestros se encuentran organizados en diversas combinaciones de complejos proteicos, como el complejo de remodelación de nucleosomas (NuRD) o el transbordador eritroide de remodelación nuclear (NuSERY) (27). Existen otros reguladores transcripcionales, como BCL11A y KLF1, que participan en la transición de las globinas HB-G a las globinas HB-B. Sin embargo, en la actualidad, los mecanismos mediante los cuales los distintos complejos interactúan para reprimir o activar la expresión de determinados genes no se conocen a detalle (26). Estos reguladores conocidos como factores de transcripción se unen a secuencias promotoras o potenciadoras “enhancer” que inician y regulan la transcripción de genes como el de las globinas y la enucleación de los eritrocitos, (24). Por tal motivo, se considera que forman parte de una red eritroide central (REC). Esta red está formada por los factores de transcripción como: GATA-1, TAL1, KLF1, LDB1 y LMO2. A través de modelos murinos se ha demostrado que la ausencia de estos factores conlleva a graves defectos en la eritropoyesis con letalidad embrionaria. En humanos, la presencia de mutaciones en los factores GATA-1 o KLF1 resulta en múltiples fenotipos que provoca el desarrollo de leucemias y talasemias (18).

Otros proteínas necesarias para el desarrollo eritroide incluyen: FOG1 (27), NF-E2 (28), Gfi1b (29), ETO2 (30), TAF10 (31), MYB (32) y ZNF148/ZBP89 (33); además de resaltar la participación de otros proteínas que podrían intervenir en la regulación de la transcripción, como es el caso de eIF4E (34).

Otros factores que se están tomando importancia en la eritropoyesis son los ARNs no codificantes (ARNnc), principalmente los microRNAs (miRNA) ver figura 6. Se han identificado que los miR-144 y 451 aumentan su expresión durante las últimas etapas de la diferenciación eritroide. De igual manera, se ha descrito que el locus murino miR-144/451 está regulado positivamente por la expresión de GATA-1 (35). Por otra parte, se sabe que los miARNs pueden regular negativamente la eritropoyesis terminal, como es el caso de miR-150; el cual suprime la hemoglobinización en los reticulocitos y el marcaje con CD235a (glicoforina A), mediante el control del gen EPB41 en la membrana de los glóbulos rojos (36).

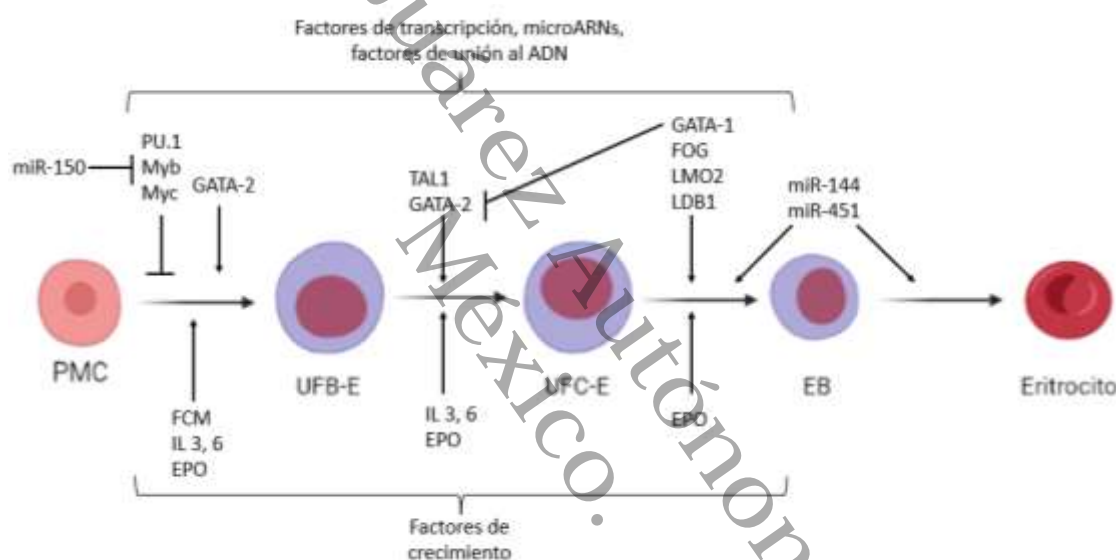


Figura 6. Factores involucrados en la regulación eritropoyética. Creado en BioRender.com.

2.4.3. GATA-1

El factor transcripcional GATA-1, el cual cuenta con un doble dedo de zinc, fue descubierto después del hallazgo de la secuencia motivo GATA dentro de las regiones reguladoras transcripcionales de la mayoría de los genes específicos eritroides (37). La inhibición específica de GATA-1 en ratones demuestra su importancia en la estimulación de la eritropoyesis y la relación con la supervivencia de los precursores eritroides a través de la expresión de la molécula antiapoptótica BCL-xL mediada por GATA-1 (37).

Como se mencionó el factor transcripcional GATA-1 cuenta con dos motivos conocidos como dedos de zinc, el C-terminal el cual reconoce motivos GATA, mientras que el N-terminal se encarga de estabilizar la unión al ADN sobre determinados motivos (38). Además de la capacidad de unión al ADN, GATA-1 se puede unir de manera directa a diversos factores de transcripción, incluyendo FOG-1, PU.1, Sp1, TRAP220, y KLF1 (38).

El gen GATA-1 se encuentra en el cromosoma Xp11.23. En los PMC, GATA-1 regula su expresión mediante una secuencia enhancer localizada en la región 5', mientras que en las células eritroides maduras, la expresión del gen requiere un elemento adicional, localizado en el primer intrón. Estos dos elementos forman el dominio regulador hematopoyético del locus de GATA-1 (G1-HRD, por sus siglas en inglés hematopoietic regulatory domain) (39). Es así como dentro del G1-HRD se encuentran cuatro elementos reguladores fundamentales para la expresión de GATA-1: un potenciador hematopoyético GATA-1 (G1HE), un doble motivo GATA, un elemento CACCC y un intrón. Tanto el sitio GATA localizado en la región G1HE, como el doble motivo GATA situado en la región promotora han demostrado ser necesarios para la expresión genética de GATA-1 (40).

2.4.4. GATA-2

El factor de transcripción GATA-2 se expresa abundantemente en las HSCs, en los PMP y los PMC (41). La expresión de este gen promueve la proliferación y bloquea la diferenciación. Por ello se ha descrito que la expresión de GATA-2 precede a la expresión de GATA-1, y debe disminuir a medida que la expresión de GATA-1 se va incrementando para dar lugar a la diferenciación eritroide (41). La disrupción selectiva de GATA-2 en ratones provocó fallo de la hematopoyesis definitiva resultando en la muerte de estos, mientras que al realizar una delección heterocigota de GATA-2, los ratones se mantuvieron viables, pero mostraban HSCs con una vida media afectada (41).

El gen GATA-2 contiene dos exones no traducidos. El primer exón proximal (exón 1G) se utiliza en varios tejidos, mientras que el primer exón distal (exón 1S) es utilizado únicamente en los tejidos hematopoyéticos y nervioso. Al igual

que en el gen GATA-1, existen regiones reguladoras de la expresión de GATA-2 en el exón 1S, denominadas dominio regulador hematopoyético temprano de GATA-2 (G2-EHRD, por sus siglas en inglés, GATA-2 Early Hematopoietic Regulatory Domain) (40). Además de la región G2-EHRD, existen otras regiones reguladoras de la expresión de GATA-2 distribuidas a lo largo del gen, las cuales poseen motivos 30 GATA. En los progenitores eritroides tempranos, GATA-2 se une a los motivos GATA en estas regiones reguladoras. Tras la inducción de la expresión de GATA-1, GATA-1 ocupa estos sitios. Por tanto, la expresión de GATA-2 está regulado por GATA-1 durante la diferenciación eritroide y por GATA-2 durante la proliferación de los precursores, a través de su unión a los motivos GATA (40).

2.4.5.Regulación genética del cambio de GATA-2 a GATA-1

La expresión del gen GATA-2 se regula en trans, gracias a la unión de la proteína GATA-2 a los motivos GATA que se encuentran distribuidos en el gen. Este mecanismo también promueve la expresión del gen GATA-1 en la fase inicial de la diferenciación eritroide. Durante la diferenciación terminal de los eritroblastos, el gen GATA-1 al igual que GATA-2 aumenta su expresión mediante la unión a los motivos GATA situados en la región G1-HRD. De esta forma, el incremento de GATA-1 compite con GATA-2 para desplazarla de los diferentes sitios de unión en el gen GATA-2, los que provoca la inhibición de su expresión (figura 7) (42).

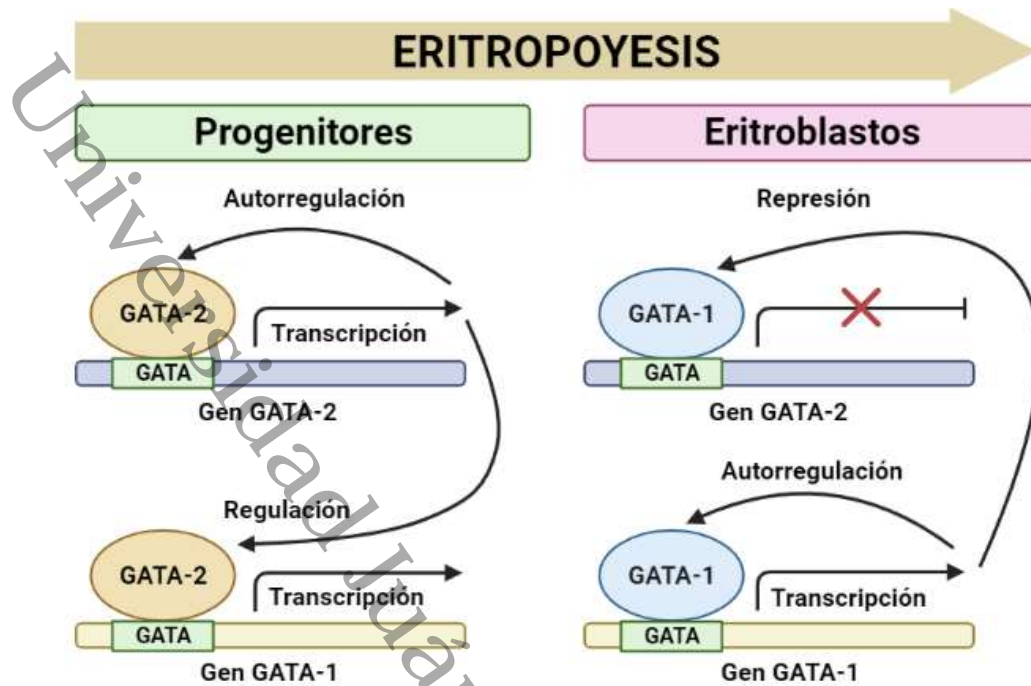


Figura 7. Regulación genética de la activación de GATA-1 por GATA-2. Creado en BioRender.com.

La expresión de GATA-1 se inicia en la etapa de PMC, al inicio del linaje eritroide. Progresivamente, la expresión de GATA-1 se incrementa y llega a su máximo cuando los progenitores eritroides dan lugar a los proeritroblastos. Cuando los proeritroblastos entran en la fase de diferenciación eritroide terminal, GATA-1 directamente activa una serie de genes vinculados a la línea eritroide, como el gen de la HB-B, Alas2 (5'-aminolevulinato sintetasa), potenciando de igual manera su expresión; y también reprime la expresión de genes esenciales para la proliferación de los progenitores, en las etapas tempranas de la hematopoyesis: GATA-2, c-KIT, MYB y MYC. A partir de la etapa de eritroblastos tardíos, los niveles de GATA-1 comienzan a decaer. Este cambio en los niveles de GATA-1 es esencial para la correcta eritropoyesis. Ya que se ha descrito que la sobreexpresión del gen GATA-1 durante la etapa final de la diferenciación eritroide conduce a una maduración eritroide defectuosa, determinando así que GATA-1 puede actuar como oncogén inhibiendo la diferenciación eritroide (42).

2.4.6. TAL1

TAL1 es un factor de transcripción perteneciente a la familia de factores hélice-lazo-hélice, que se une a un motivo corto consenso de ADN, llamado E-box (CANNTG). La expresión de TAL1 es similar a la de GATA-1, ya que aparece en células eritroides, megacariocitos y mastocitos. Se ha descrito que la inactivación condicional del gen TAL1 en la hematopoyesis adulta conduce a errores en la eritropoyesis (43), demostrando así el papel crítico de TAL1 en la diferenciación eritroide (44).

1 Se sabe que TAL1 forma parte de un complejo multiproteico con otros factores como LMO2, E47/E2A, LDB1 y GATA-1. Este complejo donde participa TAL1 se une sobre motivos del ADN, consistentes a un motivo GATA y un motivo E-box vecino (37). Estos motivos están presentes en muchos genes eritroides, así como en los elementos reguladores de los genes TAL1 y GATA-1 o el gen KLF1. Aunque también se ha reportado que la unión al ADN de TAL1 no es indispensable para la funciones de especificación de las HSCs, esta unión sí es necesaria para las funciones relacionadas con la maduración eritroide (45).

2.4.7. KLF1

1 KLF1 (Krueppel Like Factor 1) es un regulador maestro de la eritropoyesis que se encuentra activo en las poblaciones eritroides tempranas como las definitivas. Su expresión está restringida a los órganos hematopoyéticos a lo largo de todas las etapas del desarrollo, iniciándose su expresión en el saco vitelino en el día embrionario 7.5, luego cambia al hígado fetal y por último se expresa en la médula ósea adulta y la pulpa roja del bazo. Se ha descrito que la supresión genética de KLF1 provoca anemia letal en útero que se compara a los efectos de la beta-talasemia (46).

1 La expresión de KLF1 comienza a partir de los PMP donde apenas es casi detectable, y su expresión se incrementa sucesivamente en los PMC. Este incremento continua a medida que las células maduran hacia el linaje eritroide; en caso contrario, cuando las células maduran hacia el linaje megacariocito la expresión de KLF1 se reduce (19). En ese aspecto, se ha referido que el dominio de unión al ADN de KLF1 reprime la expresión de genes megacariocíticos

mediados por FLI1, siendo este mismo factor de transcripción capaz de reprimir los genes diana de KLF1. Así es como en los PMC, el incremento de los niveles entre un factor y otro determinará el linaje de diferenciación, al cual se dirigirá la célula (eritrocito o megacariocito), de forma similar al equilibrio que existe entre PU.1 y GATA-1 en progenitores mieloides (45).

Además de su participación como regulador en la eritropoyesis, KLF1 tiene como genes diana componentes de la membrana y el citoesqueleto, así como a la síntesis de antígenos de los grupo sanguíneos, transportadores, espectrinas, o glicoforinas; los cuales en ausencia de este factor de transcripción se ven afectados provocando pérdida en la integridad y estabilidad de la membrana de los eritrocitos (19,46).

Se ha demostrado el papel de KLF1 sobre la regulación del ciclo celular; el cual provoca una inhibición de la proliferación celular, promoviendo la diferenciación y la síntesis de hemoglobina. Esto ocurre a través de dos genes diana: p18 (INK4c) y p21 (WAF/CIP1). Las proteínas p18 y p21 actúan como inhibidores de las cinasas dependientes de ciclinas, lo que conlleva a la inhibición de la progresión de la fase G1 y la entrada a la fase S del ciclo celular (46).

Por otro lado, se ha expuesto que KLF1 es capaz de activar la expresión de los genes E2F2 y E2F4, que paradójicamente promueven la proliferación celular. En un estudio donde cultivaron células eritroides primarias con delección de KLF1, las células no lograron ingresar a la fase S de manera eficiente, esto debido a que la activación de E2F2 y E2F4 por parte de KLF1 es fundamental para garantizar que los progenitores eritroides UFB-E y UFC-E puedan ingresar con éxito a la fase S y producir un número suficiente de progenie. El factor de transcripción E2F2 controla la entrada de las células en la fase S y la síntesis de ADN. Mientras que E2F4, además de controlar la entrada a la fase S de las células, demostró tener un papel regulador de la eritropoyesis a través del control de la proteína Rb (47,46).

KLF1 es una molécula clave para el cambio genético de globina γ (hemoglobina fetal) a globina β (hemoglobina adulta) a través de diferentes mecanismos; uno de manera directa activando la expresión del gen de la HB-B; y a través de un

mecanismo indirecto, mediante el factor BCL11A, represor de la expresión del gen de la HB-G (19).

Se conoce que la expresión de KLF1 es necesaria para la síntesis del grupo hemo (46). KLF1 se encarga de regular este proceso mediante ajuste de la expresión de la mayoría de las enzimas necesarias para convertir el succinil-CoA y glicina en hemo. Además de regula la expresión del transportador de transferrina y otras proteínas necesarias para la captación de hierro por las células eritroides. Otra función de KLF1 es la regulación de la exportación del grupo hemo con el átomo de hierro desde la mitocondria al citoplasma, así como el ensamblaje del grupo hemo con las globinas para dar la formación de la molécula de hemoglobina (46). En resumen, KLF1 es un regulador maestro de la eritropoyesis, a través de diferentes mecanismos como la producción e integridad de la células eritroides.

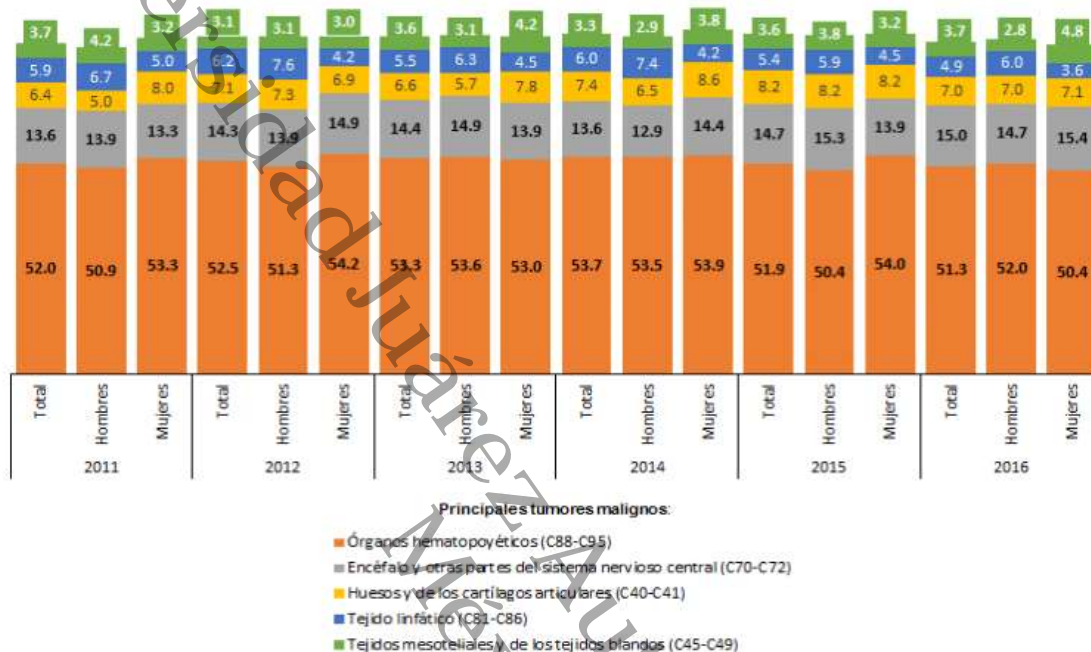
2.5. Patologías de la eritropoyesis

Como se ha descrito en los apartados anteriores, la eritropoyesis es un proceso altamente regulado a diferentes niveles, por lo que al producirse un cambio o alteración en este proceso puede desencadenar en el desarrollo de patologías que afecten el desarrollo, la diferenciación o la maduración de los eritrocitos o cualquier otro componente que los constituye. Por ello a continuación, abordaremos las diferentes patologías que afectan la eritropoyesis y las afecciones que provocan.

2.5.1. Epidemiología de las afecciones eritropoyéticas

Según cifras de la Organización Panamericana de la Salud, en la región de las Américas, el cáncer es la segunda causa de muerte (48). Se estima que 3.8 millones de personas fueron diagnosticadas en 2018 y 1.4 millones murieron por esta enfermedad. Aproximadamente, el 57% de los nuevos casos de cáncer y el 47% de las muertes ocurren en personas de 69 años o más jóvenes (48). En México el cáncer es la tercera causa de muerte, después de las enfermedades cardiovasculares y diabetes, según estudios realizados por la OMS y la Agencia Internacional de Investigación de Cáncer (49). Durante el 2010 en México, se

reportaron 33 mil casos hospitalarios por tumores malignos, en la población menor a los 20 años, el 56.7% se presentó en órganos hematopoyéticos (figura 8), siendo la leucemia la principal causa de defunción en el 2011, afectando principalmente al género masculino, datos según el Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2020 (50).



Se utilizó la Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud (CIE-10). Excluye defunciones con residencia habitual en el extranjero y edad no especificada.

Figura 8. Morbimortalidad hospitalaria de la población mexicana. Tomado de Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer, INEGI (50).

En el caso de las hemoglobinopatías son las enfermedades hereditarias más comunes a nivel mundial; cerca de 4.5% de las personas son portadoras de un gen mutado para talasemias o hemoglobinas anormales. A pesar de que las regiones donde más comúnmente se observan estas anomalías son las zonas mediterráneas, el incremento en la migración ha contribuido a que estas alteraciones sean detectadas en individuos de otras áreas. Está reportado que en México existe una prevalencia de hemoglobinopatías del 1.25 a 26.1%, donde la talasemia y la hemoglobina S (Hb S) son los hallazgos más frecuentes (51).

2.6. Talasemias y hemoglobinopatías

Las afecciones genéticas que presentan casos clínicos más graves y comunes son los trastornos hereditarios de la molécula de hemoglobina (52). Estos trastornos se pueden dividir en dos de manera general: aquellos en los que una mutación interfiere en la cantidad de proteína producida, ya sea de manera reducida o nula (talasemias) y aquellos que se producen por el cambio en la estructura de la molécula de hemoglobina, resultando en la generación de una variante proteica que no posee la capacidad de ejercer su función como es debido (hemoglobinopatías) (53). De esta manera podemos definir a las talasemias como un conjunto de trastornos caracterizados por la síntesis reducida o ausente de una, o raramente, de dos de las cadenas globínicas, afectándose el equilibrio entre la producción de globinas α y β (por ejemplo), desencadenando una deficiencia en la síntesis de hemoglobina adulta (54).

Los diferentes tipos de talasemias varían dependiendo del gen de globina que presente la mutación, estos genes se encuentran en dos agrupaciones conocidas como familias de genes de globina (GGC, del inglés Globin gene clusters), situados en los cromosomas 11 y 16 (figura 9) (55):

1. La agrupación de genes beta está localizada en el extremo del brazo corto del cromosoma 11, con una extensión de 70 kb. Contiene los genes de globina embrionarios (globina ϵ), fetal (globina γ), y adulta (δ y β).
2. La agrupación de genes alfa está localizada en el brazo corto del cromosoma 16 y tiene una extensión de 40 kb. Contiene los genes embrionarios (ζ), y 2 copias del gen fetal/adulto (alfa, $\alpha 1$ y $\alpha 2$) (55).

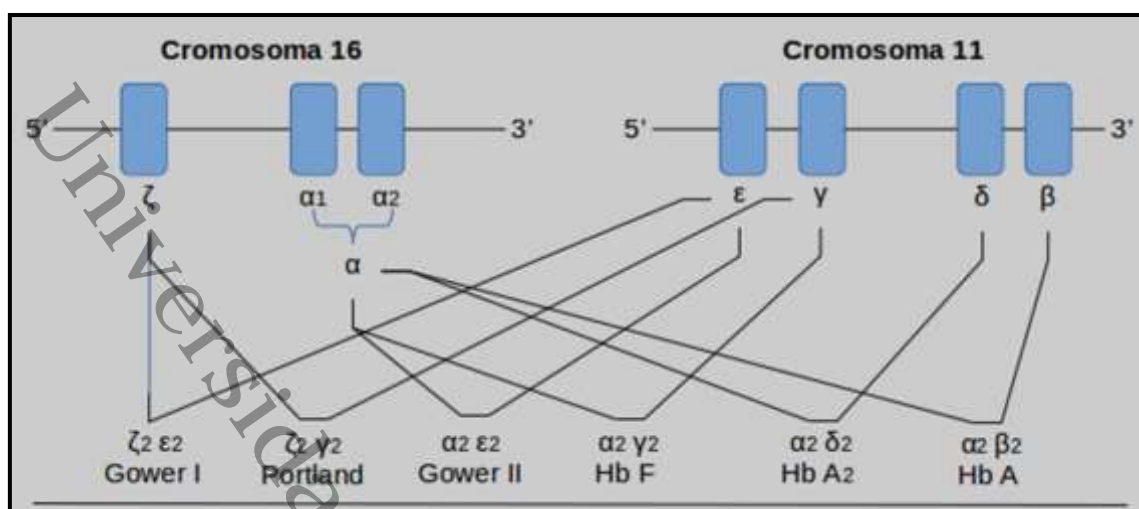


Figura 9. Agrupaciones genéticas de los genes de las globinas en el cromosoma 11 y 16. Creado en BioRender.com.

Dentro de cada agrupación genética, los genes están separados por los extremos 5' y 3' por secuencias de ADN reguladoras: secuencias promotoras, secuencias potenciadoras, la región de control del locus (región genética que interactúa con una serie de factores de transcripción en el inicio de la maduración eritroide para promover el acceso de la maquinaria transcripcional a las demás secuencias reguladoras del complejo genético) (55). La afectación de estas secuencias reguladoras también se encuentra asociado al desarrollo de las talasemias, las cuales se pueden dividir de manera general en dos tipos las alfas talasemias y las betas talasemias.

1

2.6.1. Alfa talasemia

La alfa talasemia se debe a la disminuida o nula producción de cadenas globínicas alfa, dando lugar a un exceso de globinas gamma en el feto y recién nacido, y a un exceso de globinas beta en el niño y el adulto. Aunque el exceso de globinas beta es capaz de formar homotetrámeros solubles (formado por 4 globinas beta, dan lugar a la Hemoglobina H), son inestables y algunas precipitan dentro de la célula, provocando el mal funcionamiento de los eritrocitos (54).

1

Genéticamente, las talasemias son heterogéneas, ya que existen más de 100 mutaciones que pueden afectar en cada una de las etapas necesarias para la correcta producción de hemoglobina. Las mutaciones más frecuentes son

aquellas que afectan a la terminación de la traducción y al procesamiento del ARNm; mientras que deleciones, reordenamientos génicos, defectos de la transcripción, estabilidad del ARNm o ensamblaje de la hemoglobina, son menos frecuentes (55). A pesar de esta heterogeneidad, se pueden utilizar ciertos términos clínicos para describir la expresión fenotípica de las alfa talasemias. Debido a la duplicación del gen alfa en humanos, cada individuo normalmente porta cuatro genes de cadenas alfa, y podemos describir varios tipos de alfa talasemias:

1. Alfa talasemia (0): Esta entidad hace referencia a más de 20 mutaciones genéticas distintas del gen de la globina alfa, que provocan la deleción de ambos loci en un cromosoma. Estos pacientes no pueden sintetizar cadenas alfa, por tanto, carecen de la biosíntesis de hemoglobina adulta 1 y 2 o hemoglobina fetal, lo que hace a esta condición incompatible con la vida.
2. Alfa talasemia (+): En este caso, más de 15 mutaciones genéticas provocan una disminución en la producción de globina alfa, debido a la deleción de uno solo de los locus alfa del cromosoma afectado. Existen por tanto 3 formas de alfa talasemia (+), según el número de genes alfa heredados:
 - a. Herencia de 3 genes alfa normales (aa/a-): Esta situación se denomina alfa talasemia 2, o portador silencioso. Los sujetos son asintomáticos e incluso pueden ser hematológicamente normales. El diagnóstico se realiza mediante análisis de ADN.
 - b. Herencia de 2 genes alfa normales (a-/a-): Esta entidad se conoce como alfa talasemia menor. En ella, los sujetos son clínicamente normales, pero pueden tener ligera anemia junto con disminuciones del volumen corpuscular medio (MCV) y de la hemoglobina corpuscular media (MCH).
 - c. Herencia de 1 gen alfa normal (a/--): Es conocida como enfermedad de hemoglobina H, compuesta por tetrámeros de cadenas beta sobrantes. Estos pacientes tienen diferentes grados de anemia hemolítica, así como ligera eritropoyesis inefectiva, esplenomegalia, cambios óseos y sobrecarga de hierro (54).

2.6.2. Beta talasemia

La beta talasemia se caracteriza por la producción de una o ambas cadenas globínicas beta deficientes. Se manifiesta clínicamente con anemia hemolítica y alteración en el manejo del hierro. Al igual que la alfa talasemia, la beta talasemia se puede clasificar según el grado de reducción de la globina beta:

1. Beta talasemia (0): Aquella en la que hay una completa abolición de la producción de cadenas beta. Los pacientes homocigotos para mutaciones de beta talasemia (0) tienen la denominada beta talasemia mayor, no pueden producir cadenas beta, ni tampoco la hemoglobina adulta normal. Estos pacientes tienen graves anemias que requieren múltiples transfusiones y otras manifestaciones graves.
2. Beta talasemia (+): Está producida por mutaciones que disminuyen (pero no completamente) la producción de cadenas beta. Los pacientes homocigotos para mutaciones de beta talasemia (+) pueden formar algo de hemoglobina adulta y clínicamente presentan una menor gravedad en comparación con la beta talasemia (0) (55).

Del mismo modo que la alfa talasemia, las principales mutaciones genéticas son aquellas que afectan a la traducción y al procesamiento del ARNm. Sin embargo, es destacable la relación entre mutaciones en el gen GATA-1 y la beta talasemia. En individuos con mutaciones en el gen GATA-1 (R216Q), se produce beta talasemia junto con trombocitopenia y anemia diseritropoyética. La causa de la afectación selectiva del locus beta es incierta, pero puede deberse al impacto de la mutación sobre el factor FOG-1 u otros factores, que afectan la regulación del gen de la globina beta (54)

2.6.3. Tratamientos para las talasemias

Anteriormente las talasemias se clasificaban como talasemia mayor, intermedia y menor, según el cuadro clínico del paciente, a manera de identificar qué tipo de tratamiento sería el más eficaz, sin embargo un criterio de clasificación más útil es en Talasemias dependiente (TDT) y no dependiente de transfusiones (NTDT) (56). Para determinar el inicio de las transfusiones se deben tener los hallazgos clínicos y datos de laboratorio objetivos como: el crecimiento

deficiente, el desarrollo de prominencia frontal o hiperplasia maxilar u otros síntomas de anemia y eritropoyesis ineficaz, incluso en ausencia de anemia grave son parte del diagnóstico para el inicio de las transfusiones. Para los valores de laboratorio, si el nivel de hemoglobina en estado estacionario es inferior a 7 g/dL se recomienda comenzar con las transfusiones (57).

El principal objetivo de realizar la terapia de transfusión de glóbulos rojos es disminuir la sintomatología de la anemia permitiendo al paciente tener un desarrollo normal, así como la supresión de la eritropoyesis endógena ineficaz. Esto generalmente se logra mediante la administración de transfusiones cada 3 a 5 semanas para mantener el nivel de hemoglobina por encima de 9.5 g/dL antes de la transfusión (57).

La beta talasemia se caracteriza por un metabolismo anormal del hierro a través de una mayor producción de eritroferrona por parte de los precursores eritroides y una regulación a la baja de la producción hepática de hepcidina, lo que resulta en una mayor absorción de hierro (58). Los pacientes con TDT invariablemente tienen una sobrecarga transfusional y absorptiva de hierro a las múltiples transfusiones. El depósito de hierro en el hígado, el corazón y los órganos endocrinos causa la morbilidad más significativa. En el caso de la enfermedad cardíaca, la principal causa de muerte por sobrecarga de hierro incluye disfunción ventricular izquierda, insuficiencia cardíaca y arritmias. El depósito de hierro en los órganos endocrinos provoca hipotiroidismo, hipoparatiroidismo, retraso del crecimiento, retraso de la pubertad y diabetes. La fibrosis hepática, cirrosis y el carcinoma hepatocelular relacionados con la exposición acumulada al hierro por lo general se manifiestan hasta una edad avanzada. Por lo tanto, el control y el manejo de la sobrecarga de hierro son una parte esencial del tratamiento de la talasemia (56).

La terapia de quelación de hierro se administra con el objetivo de proporcionar la mayor exposición posible al quelante en un período de 24 horas para reducir los efectos tóxicos del hierro no ligado a la transferrina (NTBI) (59). El inicio de la quelación de hierro en niños generalmente se retrasa hasta después de los 2 años, cuando hay evidencia de una carga de hierro alta (10 a 20 transfusiones, ferritina >1000 ng/mL y hierro hepático), con una concentración >5–7 mg/g de peso. Esta práctica surge de las preocupaciones sobre el efecto del hierro sobre

el retraso del crecimiento y la toxicidad ósea cuando se emplean quelantes de hierro (Deferoxamina) en niños pequeños con baja carga de hierro, lo que podría no aplicarse a los quelantes orales más nuevos. Un estudio piloto reciente evaluó el uso más temprano de dosis bajas de deferiprona en bebés y niños pequeños con niveles de ferritina sérica de 400 a menos de 1000 ng/ml. Este enfoque retrasó el desarrollo de la sobrecarga de hierro y redujo la exposición al hierro plasmático lábil tóxico sin efectos inesperados, efectos adversos serios o severos.

2.7. Leucemias

Las leucemias son un grupo de neoplasias malignas de los tejidos formadores de sangre que se caracterizan por el aumento en la proliferación de células sanguíneas con un fenotipo anormal (60). La anomalía de las células leucémicas proviene de la inhibición de la diferenciación e incremento en la tasa de proliferación (61). En las leucemias el bloqueo de la diferenciación ocurre en progenitores hematopoyéticos tempranos, resultando en células indiferenciadas denominadas blastos. Los cuales sufren eventos transformantes generando células troncales leucémicas (CTL) que son capaces de autorrenovarse, propagando e incrementando la progenie celular (62).

Desde el punto de vista clínico y patológico, la leucemia se subdivide en una variedad de grupos. La primera división es entre su inmunofenotipo ya sea del linaje linfocítico o el mieloide, según el tipo de célula afectada. Además, la enfermedad se clasifica como aguda; cuando es de progresión rápida con un mayor número de células inmaduras. En el caso de las crónicas; cuando denotan una evolución progresiva lenta con un predominio de células maduras (60). La combinación de estas dos clasificaciones proporciona un total de cuatro categorías principales: leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia mieloide aguda (LMA) y LMC. Por último, las leucemias también se pueden dividir dependiendo de la naturaleza de los eventos transformantes como factores remodeladores de la cromatina, fusión de genes, así como la activación de tirosina cinasas como BCR/ABL (63).

4

2.7.1. Leucemia mieloide crónica: Historia y epidemiología

La leucemia mieloide crónica fue descrita por primera vez en 1845 por Hughes Bennet, quien mencionó que se trataba de una enfermedad infecciosa que causaba hipertrofia en hígado y bazo, hasta provocar la muerte. Sin embargo, pocas semanas después, Rudolf Virchow publicó un caso similar en el que mencionaba que la enfermedad no era infecciosa y que implicaba un incremento en el número de células sanguíneas, por lo que acuñó el término de leucemia (del griego *leucos*, que significa célula blanca). En 1870, Neumann reconoció que las células leucémicas descritas se originaban en la médula ósea y casi cien años después, en 1960 Nowel y Hungerford describieron que en este padecimiento existía un cromosoma anormal que se presentaba en todos los casos de esta leucemia. No obstante, fue hasta el año 1973 que Janet Rowley describió que el cromosoma anormal era provocado por una translocación recíproca entre los brazos largos de los cromosomas 9 y 22, dándosele el nombre de cromosoma Filadelfia (figura 10) (64).

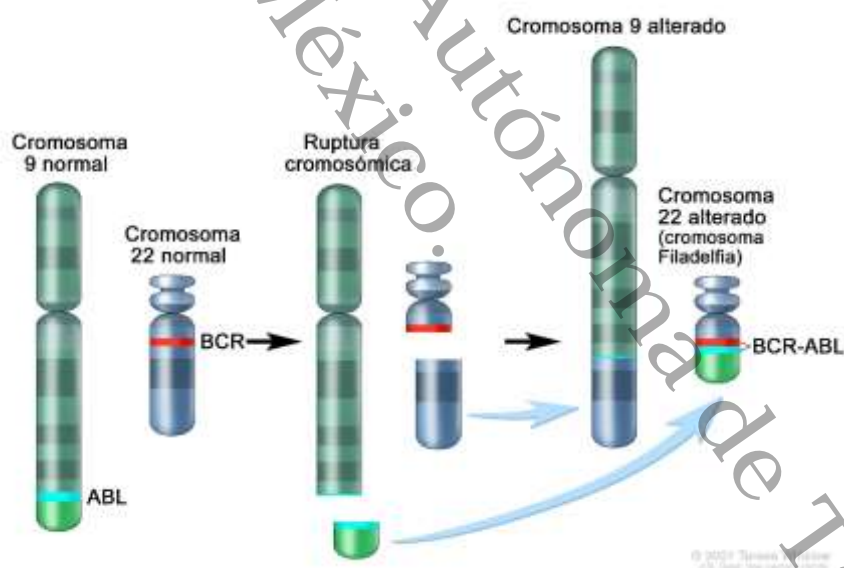


Figura 10. Translocación cromosómica y formación del cromosoma Filadelfia. Tomado de Instituto Nacional del Cáncer, Cromosoma Filadelfia (65).

5

La LMC representa entre el 15% y el 20% del total de leucemias y su incidencia en los países occidentales se ha estimado en 1,6 casos por 100 000 habitantes/año (66). La edad media de presentación es de 53 años, la incidencia máxima se encuentra entre los 40 y los 60 años, con predominio en varones con

una relación de 1.3:1. Alrededor de la mitad de los pacientes son asintomáticos al momento del diagnóstico y la mediana de supervivencia global después de este, es de 4 a 6 años (supervivencia global a 5 años del 39%) con un rango que oscila desde menos de un año a más de 10 años. La mortalidad ajustada por edad es de 0,6 por 100 000 habitantes/año; la gran mayoría de los sujetos que fallecen por LMC tienen más de 55 años (74,7%) y se ha estimado que el 0,16% (1 de cada 619 hombres y mujeres) de las personas que nacen en la actualidad tendrán la enfermedad en algún momento de sus vidas y que el 0,06% morirán por ella (67).

La incidencia de la LMC en Estados Unidos es de 2 casos por cada 100,000 personas, siendo diagnosticados entre 3,500 y 5,000 nuevos casos por año, lo que provoca que este padecimiento represente el 14% de todos los casos diagnosticados con leucemia. La frecuencia de la LMC es baja en personas menores de 40 años, tendiendo a incrementarse exponencialmente con la edad. La edad media al momento del diagnóstico es de 60 años. No parece existir predisposición genética o geográfica para adquirir este padecimiento, aunque algunos autores lo han asociado con exposición a altas dosis de radiación ionizante.

En México, el 10% de todas las leucemias corresponden a LMC, con una mediana al diagnóstico de 45.8 años, afectando más a los hombres (57.8%) que las mujeres, esta frecuencia es muy similar a la reportada en EUA, la cual corresponde al 56.5%. En México, la tasa de mortalidad por LMC en el año 2004, fue reportada en 3/100,000 habitantes, mientras que para 2008 la estimada por la Secretaría de Salud fue de 3.5 por cada 100,000 habitantes, y la Global Cancer Observatory reportó para 2012 una tasa de mortalidad ajustada por edad de 3.7 por cada 100,000 habitantes (68,69).

2.7.2. Parámetros clínicos y biológicos de la leucemia mieloide crónica

Clínicamente la LMC se divide en tres fases o estadios. La primera, denominada fase crónica, es un estado indolente en el que se diagnostica al 90% de los pacientes. La duración de esta etapa es variable, puede durar entre tres y ocho

2 años, se caracteriza por una sobreproducción de células del linaje granulocítico (mieloides inmaduras y granulocitos maduros), con aumento en el recuento de leucocitos, plaquetas, y un conteo de células blásticas menores al 10%. Estas características hacen que no sea fácil diferenciarla clínica y hematológicamente de una leucemia aguda. Dentro de la sintomatología se presenta en los pacientes fatiga, palidez, distensión abdominal, esplenomegalia, hepatomegalia, fiebre, sudoración nocturna y pérdida de peso sin causa aparente (1). El padecimiento progresa a la fase acelerada, la cual no todos los pacientes presentan, ya que pueden pasar de una fase crónica a una fase blástica. Esta fase acelerada presenta una menor respuesta al tratamiento y sus características son una intensa esplenomegalia, leucocitosis, incremento de los blastos del 10 al 30% en sangre periférica y médula ósea, un incremento de los basófilos del 20% en sangre periférica.

Por último, la enfermedad progresa a la crisis blástica, caracterizada por 30% o más células inmaduras (blastos) en circulación e incluso en infiltrados extramedulares asociados con un incremento de la esplenomegalia. La crisis blástica es mieloide en dos de cada tres casos y durante esta fase, la supervivencia de los pacientes se reduce a meses e incluso semanas, ya que estos pacientes son los más resistentes al tratamiento. El paciente puede presentar fiebre e inflamación de los nódulos linfáticos, hígado o bazo. Tanto la fase acelerada, como la fase blástica son consideradas fases avanzadas, y el 15% de los pacientes con LMC en el momento de ser diagnosticados se encontrarán en una de estas fases (62).

3 La OMS estableció los siguientes criterios para realizar el seguimiento de los pacientes desde la fase crónica de la enfermedad: leucocitosis persistente >10.000 leucocitos / μL (10×10^9 /L) y/o esplenomegalia persistente; trombocitosis persistente, con un recuento plaquetario $>1.000 \times 10^3$ / μL (1.000×10^9 /L); trombocitopenia persistente con un recuento de plaquetas $<20\%$ de basófilos en sangre periférica; y recuento de blastos del 10-19% en sangre o médula ósea. También se debe tener en la cuenta la resistencia a los fármacos (no respuesta hematológica después de la terapia de inducción). Los criterios de la OMS para la LMC en crisis blástica incluyen los siguientes: Recuento de blastos igual o

superior al 20% en sangre periférica o en médula ósea, e infiltración extramedular de blastos (70).

2.8. Tratamientos y desventajas actuales (resistencia)

2.8.1. Tratamientos para la leucemia mieloide crónica

Se han desarrollado diferentes estrategias para el tratamiento de las LMC, a través de fármacos que promueven la apoptosis dirigida a deshacerse de tantas células leucémicas como sea posible o los agentes que buscan disminuir la actividad de los receptores tirosina cinasa, evitando la proliferación de las células leucémicas que expresan el cromosoma Filadelfia. Actualmente se ha descrito que estos tratamientos en su mayoría suelen generar efectos adversos muy notorios, además que con el tiempo los pacientes presentan resistencia a ellos, a continuación, se describirán las principales farmacoterapias para el tratamiento de la LMC y sus principales desventajas.

2.8.2. Quimioterapia

Los principales fármacos usados en la quimioterapia para atender a los pacientes con LMC consisten en hidroxurea, citarabina (ARA-C), busulfán, ciclofosfamida y cisplatino (CDDP) siendo este último empleado de manera rutinaria para el tratamiento del cáncer de testículo y ovario, además de que se utiliza cada vez más contra los tumores de cuello uterino y vejiga. El mecanismo de acción del CDDP se basa en el entrecruzamiento intracadena de la unidad cis-Pt (NH₃)₂ al ADN celular en dos bases de guanina vecinas. Esto provoca una interferencia en la estructura del ADN, alterando la replicación y la mitosis celular. El ADN dañado activa los mecanismos de reparación, lo que promueve la apoptosis celular cuando esta reparación resulta imposible. Por otra parte, se ha reportado el potencial del CDDP como agente diferenciador en un modelo con células eritroleucémicas, las cuales luego de ser expuestas al fármaco incrementaron los niveles de hemoglobina adulta y la presencia de marcadores de diferenciación terminal CD235a (10). Sin embargo, a pesar de ser uno de los agentes quimioterapéuticos más activos actualmente disponibles, el cisplatino

exhibe efectos secundarios severos, siendo los más significativos la neuropatía óptica, la ototoxicidad, la nefrotoxicidad aguda y crónica (10).

2.8.3. Inhibidores de tirosina cinasas

El Imatinib es actualmente el tratamiento estándar de la leucemia mieloide en la fase crónica, aprobado por la FDA en el 2001 como el primer inhibidor de la tirosina cinasa disponible para uso clínico. Su actividad se basa en la unión de este fármaco a los sitios de unión de ATP del transcrito de fusión BCR-ABL (figura 11), bloqueando selectivamente la proliferación celular e induciendo la apoptosis en las células que expresan el cromosoma Filadelfia y mantienen un estímulo constante de proliferación a través de la tirosina cinasa BCR-ABL (71).

Los estudios han demostrado que el imatinib (Gleevec®) logra mantener controlada la fase crónica en los pacientes con LMC al ingerir una dosis de 400 mg/día, y en fase acelerada y blástica, a una dosis de 600 mg/día. El objetivo del tratamiento con el imatinib es encontrar una respuesta hematológica completa (reducción en el recuento de leucocitos, plaquetas, células inmaduras como mielocitos, promielocitos, o blastos en sangre periférica, desaparición de esplenomegalia) a los tres meses de seguimiento.

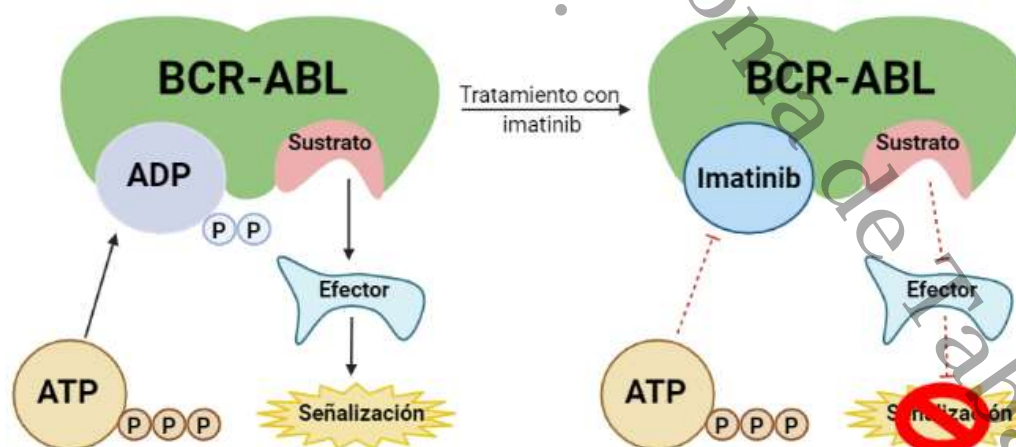


Figura 11. Mecanismo de acción del Imatinib. Tomado y modificado de "Sequencing treatment in chronic myeloid leukemia: the first choice may be the Hardest", elaborado por Heaney (72).

2

A pesar de que el imatinib es un tratamiento efectivo, algunos pacientes recaen por enfermedad resistente hasta en un 40% de los casos. La resistencia puede ser primaria cuando se da la falta de la respuesta inicial al no alcanzar los objetivos del tratamiento o secundaria cuando sobreviene una recaída del paciente que inicialmente había tenido una respuesta (62). En estos casos la primera opción para tratar a los pacientes con resistencia al imatinib es cambiar el medicamento a otro inhibidor de la tirosina cinasa de segunda generación como el dasatinib. Este fármaco está autorizado por la FDA como la primera terapia de la LMC resistente al imatinib, ya que se ha descrito que es efectivo con la mayoría de las mutaciones resistentes al tratamiento con imatinib. Al igual que su homólogo, la inhibición que realiza el dasatinib es sobre las cinasas BCR-ABL, diferenciándose por el sitio de unión del ATP, haciéndolo tanto en las conformaciones activas e inactivas del dominio cinasa de ABL (73). A pesar de ser un fármaco de segunda línea no está exento de generar efectos adversos, siendo los más frecuentes la mielosupresión y el derrame pleural que se ha observado en 35% de los pacientes. Por lo que el tratamiento puede interrumpirse por periodos cortos para permitir la recuperación del paciente. Por otro lado, debido a las mutaciones como la que se encuentran dentro del dominio de unión a ATP de la tirosina cinasa ABL (T315I) en el oncogén BCR-ABL confieren un alto grado de resistencia a imatinib y dasatinib (74,75).

2.8.4. Oncogenes

Como se abordó en los apartados anteriores las talasemias y las leucemias son patologías ligadas principalmente con defectos durante la eritropoyesis, estas alteraciones en su mayoría son desencadenados por la activación de proteínas que activan la proliferación celular conocidos como oncogenes. En definición son genes que sufrieron una mutación, obteniendo una activación constante o función y por lo tanto tienen el potencial de generar cáncer. Algunos oncogenes implicados en el proceso de leucemogénesis son BCR-ABL, RAS, BCL-2 MYC, RUNX1, ASXL1, GATA-2. Los cual se pueden sobre expresar o mantener un estado activo y promover la proliferación de células eritroides inmaduras (76). De igual manera las mutaciones de v-erbA generan un desorden en la proliferación e inhibe la diferenciación (77), también existen oncogenes que se unen a otros

proteínas inhibiendo su actividad, como PU.1 (37) y FAM122 (78). Los cuales interactúan directamente con GATA-1 impidiendo su actividad como promotor de la diferenciación eritroide (78). Esto es solo por mencionar algunos, remarcando su importancia en el desarrollo de las patologías y de su investigación para el posible desarrollo de blancos terapéuticos.

2.9. Nuevas estrategias terapéuticas relacionadas con la inducción de la diferenciación celular

A pesar del avance en el desarrollo de tratamientos más eficaces para las leucemia mielógena crónica la tasa de mortalidad de los pacientes sigue siendo alta. Otros protocolos de tratamiento emplean fármacos citotóxicos en combinación con interferón han mostrado ser eficaces en los pacientes con leucemia, prolongado la vida de los pacientes pero no han resultado en una mejora adicional significativa. El único tratamiento curativo es la quimioterapia y/o radioterapia intensiva seguida del trasplante de médula ósea alogénica. Sin embargo, solo una minoría de los pacientes con LMC tienen donantes compatibles, lo cual reduce su tasa de éxito; por el contrario, pacientes de edad avanzada que muchas veces tienen otras enfermedades, son incapaces de tolerar la intensiva terapia (1).

2 Otro enfoque de los tratamientos es el desarrollo de moléculas dirigidas hacia tirosinas cinasas, sin embargo, como se mencionó antes, se desarrolla resistencia debido a la heterogeneidad de las células tumorales y a la sobrevivencia de células troncales de la LMC quiescentes. Por lo que para superar la resistencia a los fármacos y la recaída a la enfermedad se ha propuesto la terapia de inducción de la diferenciación celular. Esta terapia está enfocada en el empleo de agentes capaces de inducir la diferenciación terminal hacia un fenotipo maduro acompañado del cese de la proliferación celular con eventual activación de la muerte celular (79). En principio, la inducción de diferenciación eritroide mejora el estatus inmunológico de los pacientes evitando la lisis masiva de células blásticas observado por regímenes citotóxicos (61).

2 Además de que se ha demostrado que una combinación de terapias citotóxicas y de diferenciación puede potenciar la apoptosis de las células tumorales,

disminuyendo la recurrencia de los tumores y evitando el desarrollo de resistencia hacia los quimioterapéuticos (79).

La leucemia promielocítica aguda (LPA) fue el primer modelo de malignidad hematológica tratada por agentes inductores de la diferenciación, incluyendo el ácido-transretinoico (ATRA). El ATRA es un potente inductor de la diferenciación en células leucémicas mieloides hacia el linaje granulocítico mostrando remisiones completas en el tratamiento de la LPA sin causar hipoplasia medular (1). Algunos compuestos distintos del ATRA pueden inducir diferenciación *in vitro* de las células leucémicas humanas, pero la transición de estos resultados a la clínica hasta el momento no ha tenido éxito. Estas investigaciones se logran mediante el uso de líneas celulares leucémicas humanas las cuales retienen el potencial de diferenciación terminal hacia varios tipos de células maduras al ser estimuladas con diversos compuestos. Tal es el caso de la línea celular K562, la cual posee la característica primordial de exhibir marcadores eritroides, monocíticos y megacariocíticos dependiendo del tratamiento aplicado, lo que resalta su uso potencial como modelo para el estudio de nuevos compuestos inductores de la diferenciación.

La línea celular K562 ha sido utilizada como un sistema *in vitro* para la investigación de la diferenciación celular. Diversos estudios han indicado que compuestos con diferentes estructuras químicas pueden inducir diferenciación de las células K562; agentes como cisplatino, hemina, 5-azacitidina, arabinósido de citosina (ARA-C) conducen la diferenciación hacia el linaje eritroide. Por otro lado el tratamiento con esteres de forbol (EF) inducen la diferenciación hacia monocitos y/o megacariocitos, aunque; los EF promueven la carcinogénesis, por lo que su uso en la clínica no es contemplado.

Recientemente los derivados de la piperazina, utilizados normalmente como antibióticos o antihelmínticos, han demostrado que inhiben la proliferación y conducen a la diferenciación eritroide en la línea celular K562 (1). Por lo que se ha propuesto que líneas celulares de LMC resistentes al imatinib, sean tratadas con inductores de la diferenciación celular, como recientemente se ha demostrado con el uso del resveratrol (1).

2

Por otra parte, se ha reportado que pacientes tratados con imatinib mantienen la expresión de la proteína BCR-ABL a pesar de la inhibición de la actividad cinasa en las células madre/progenitoras de la LMC, estudios *in vitro* han demostrado que el tratamiento secuencial de aclarubicina A (ACM) junto el imatinib disminuye los niveles de expresión de BCR-ABL conduciendo a la apoptosis asociado a la disminución de la expresión de las proteínas antiapoptóticos Mcl-1 y BCL-xL en la línea celular K562. Con los antecedentes antes mencionados se abre la pauta para el descubrimiento de nuevos agentes con la actividad de diferenciación celular sobre células leucémicas que reduzcan la proliferación tumoral.

2

2.9.1. Ribavirina como tratamiento

17

La ribavirina [1-[(2R,3R,4S,5R)-3,4-dihidroxi-5-(hidroximetil)oxolan-2-il]-1,2,4-triazol-3-carboxamida (figura 12) se desarrolló como un agente antivírico contra varios virus de ADN y ARN, pero su uso más común es el tratamiento del virus sincicial respiratorio y en combinación con el interferón alfa para el tratamiento del virus de la hepatitis C (80). Actualmente se tienen bien estudiados los mecanismos responsables de su actividad antiviral, como un inhibidor específico de la inositida-5'-monofosfato deshidrogenasa 1 y 2 (IMPDH), una enzima que cataliza el paso limitante de la velocidad de síntesis de *novoo* de guanósín trifosfato GTP. La ribavirina bloquea la enzima en el sitio de unión de inosina monofosfato-monofosfato de xantosina (IMP-XMP), lo que impide que el ADN o ARN viral se repliquen dentro de la célula (81). Laleh y colaboradores (82), describen que la expresión y la actividad de IMPDH está marcadamente elevadas en varios tipos de tumores animales y humanos, lo que se relaciona estrechamente con la transformación y proliferación de células malignas. Por lo tanto, se ha sugerido que los inhibidores de la IMPDH pueden ser buenos candidatos para la quimioterapia contra el cáncer (81).

En una revisión de estudios previos descritos por Joshua Casao y colaboradores (12), encontraron que ribavirina puede activar las vías apoptóticas extrínsecas e intrínsecas en células K562 de una manera dependiente de la dosis y del tiempo. Además se observó que una dosis de ribavirina $>50 \mu\text{M}$ provocan diferenciación eritroide, lo que aumento de manera constante con el tiempo de exposición al fármaco en las células K562. De igual manera, el

tratamiento con ribavirina dio como resultado una regulación positiva de los genes HB-B, HB-A y MPO, con disminución de la expresión de MYC y AKT1. Estos cambios moleculares podrían ser responsables de inducir tanto la diferenciación como los procesos apoptóticos. La ribavirina también provocó una disminución significativa en la expresión de la principal variante de ARNm de BCR-ABL (b3a2), lo que puede abrir nuevas oportunidades hacia una combinación de medicamentos específica para la terapia de la LMC.

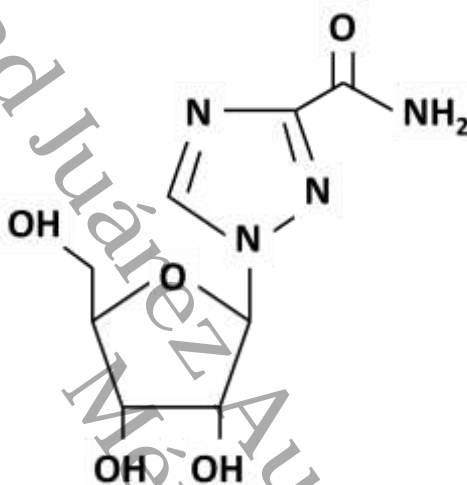


Figura 12. Molécula de ribavirina. Creado en BioRender.com.

Otro aspecto importante de resaltar sobre el uso de ribavirina como agente antitumoral es su acción inhibitoria sobre la proteína 4E, específicamente en la leucemia. Esto debido a que este oncogén está elevado en aproximadamente el 30% de los cánceres humanos, incluidos los subtipos primarios de LMA, LMC en crisis blástica, la LLA y la LMC en fase crónica (12). Según lo descrito por Casao y colaboradores en un ensayo clínico de fase I/II (12), se examinaron los efectos de la monoterapia de ribavirina en pacientes con LMA M4/M5, de los cuales once con enfermedad recidivante o refractaria recibieron 6 o más ciclos de 28 días de ribavirina oral diaria, con dosis iniciales de 1000 mg/día y aumento eventual a dosis de 1400, 2000 y 2800 mg/día. Para el día 30, un paciente experimentó una remisión completa, 2 pacientes tuvieron remisiones parciales, otros 2 tuvieron respuestas blásticas, 4 continuaron con enfermedad estable y 2 tuvieron enfermedad progresiva, mientras que no hubo toxicidades relacionadas con la terapia (12).

Estos resultados impulsaron una mayor investigación de su uso en terapia combinada para la LMA M4/M5 a fin de aumentar la frecuencia y la duración de la respuesta clínica. Para ello se emplearon los anticancerígenos comúnmente utilizados para el tratamiento de la LMA como es la ARA-C, la idarubicina y la azacitidina, los cuales se examinaron en combinación con ribavirina en muestras primarias de pacientes. Notablemente, la terapia combinada de ribavirina con los fármacos quimioterapéuticos dio resultados usando concentraciones 1000 veces más bajas que la terapia estándar con ARA-C e idarubicina (12). Se validó aún más el perfil de seguridad del uso de ribavirina en terapia combinada en un ensayo clínico de fase I de seguimiento, donde se encontró que la dosis recomendada era ciclos de 28 días de 1400 mg orales dos veces al día con dosificación continua para ribavirina e inyección subcutánea de 10 mg dos veces al día para dosis bajas de ARA-C (83). La combinación fue bien tolerada sin efectos adversos inesperados. Se observó una respuesta completa en 2 pacientes, con una duración de 224 y 743 días cada uno. Dos pacientes tuvieron una respuesta parcial y una respuesta blástica. Es importante mencionar que los pacientes que presentaron respuesta clínica tenían un nivel medio de ribavirina en plasma de 33 mmol/L, mientras que los 5 pacientes que respondieron tenían niveles promedios de 19 mmol/L (83).

2.9.2. Mecanismos antitumorales de ribavirina

Actualmente existen diversos estudios que han descrito la eficacia terapéutica de ribavirina en una variedad de cánceres, aunque los mecanismos de acción que le confieren estas propiedades siguen sin ser especificados. Algunos estudios han caracterizado mejor estos efectos a través de estudios preclínicos y clínicos más sólidos que sugieren que el principal blanco de la ribavirina es eIF4E, modulado a través de la unión directa y la inhibición competitiva (84). Complementando otros estudios también demuestran un efecto de la ribavirina en diferentes tipos tumorales a través de otras proteínas, incluidas ERK, EZH2 e IMPDH (12). Los cambios en estas vías después del tratamiento con ribavirina pueden ser el resultado de efectos indirectos de la inhibición de 4E y IMPDH o de la orientación directa de la ribavirina sobre las vías MAPK, ERK, MNK. En los

siguientes apartados abordaremos las evidencias con respecto a los posibles mecanismos de acción de ribavirina.

2.9.3. Efectos de ribavirina sobre eIF4E

Factor de iniciación de la traducción eucariota 4E (eIF4E) es una subunidad del complejo eIF4F (factor de iniciación de la traducción eucariota 4F). Su función consiste en la unión a la caperuza 5' del ARNm, la cual se combina con eIF4G y eIF4A para formar el complejo del EIF4F. El inicio de la traducción en eucariotas implica la unión de eIF4E a la caperuza 5' (metil-7 guanosina) de los transcritos de ARNm (85). La evidencia científica sugiere que los tumores que presentan sobreexpresión de eIF4E están asociados a un mal pronóstico y la resistencia a los medicamentos, debido a que eIF4E modula la traducción de un conjunto de genes que están implicados en la proliferación, la supervivencia y la carcinogénesis. Estos incluyen ciclinas D1 y D3, c-MYC, MDM2, VEGF, survivina y BCL-2 (84).

Se ha demostrado que ribavirina actúa como un inhibidor de EIF4E, esto a través de su unión en el sitio funcional utilizado para unirse a la caperuza 5' de los transcritos de ARNm *in vitro* (86). De esta manera ribavirina y el ARNm diana compiten por el sitio de unión, la posterior translocación al retículo endoplásmico para la traducción. Esto fue confirmado por Volpon y colaboradores (86), los cuales describieron que la adición de trifosfato de ribavirina (RTP) a EIF4E humano purificado dio como resultado cambios conformacionales en su estructura. Estos hallazgos se observaron trabajando con concentraciones de ribavirina clínicamente alcanzables que oscilaban entre 20 y 40 $\mu\text{mol/L}$. Por otro lado, también se analizó el análogo de ribavirina el fármaco tiazofurina el cual resulto incapaz de unirse a EIF4E por lo que no afecta su actividad, lo que sugiere que solo los análogos que mimetizan la estructura de la caperuza 5' tienen el potencial de inhibir a EIF4E (86).

Asimismo, también se ha demostrado que muchos subconjuntos de LMA tienen un aumento en la expresión de EIF4E, así como un aumento en la traducción de ciclina D1. Estos estudios preclínicos iniciales demostraron que la ribavirina inhibía fuertemente la formación de colonias de cultivos primarios de LMA M5.

Además, al realizar el análisis molecular se evidenció una reducción de las proteínas dependientes de EIF4E y una reducción de la fosforilación de AKT. De igual manera la relocalización de EIF4E desde el núcleo al citoplasma se asoció con la respuesta clínica y en caso contrario, la localización nuclear continua o la reentrada de EIF4E al núcleo correlacionó con la falta de respuesta clínica (84). Estudios recientes adicionales han respaldado la modulación de EIF4E de la ribavirina en múltiples tipos de cáncer. Los estudios que involucraron tumores sólidos (Carcinoma de células escamosas de la lengua, tumores cerebrales, cáncer de páncreas, carcinoma de células renales y retinoblastoma) y hematológicos (LMC Ph+) demostraron que el tratamiento con ribavirina, solo o en combinación con paclitaxel o radiación, reduce la proliferación *in vitro* e *in vivo* (12).

En general, estos hallazgos sugieren que la ribavirina desempeña un papel en la modulación de EIF4E tanto en el citoplasma como en el núcleo. Además, tanto mTOR como 4EBP1 fosforilado se reducen, lo que indica inhibición indirecta a través de la vía de la AKT, en consecuencia los niveles de ciclina D1, c-MYC y VEGF se reducen (87).

2.9.4. Efectos de ribavirina sobre IMPDH

Se ha reportado que el metabolito ribavirina 5-monofosfato (RMP) es capaz de inhibir la enzima IMPDH a través del bloqueo del sitio de unión IMP-XMP, lo que la convierte en un elemento determinante de los niveles de guanina celular que posteriormente serán fundamentales para la síntesis de nucleótidos y la señalización intracelular dependiente de la proteína G. Se sabe que existen dos isoformas de IMPDH: IMPDH1 es la que se encuentra mayormente expresada en células normales e IMPDH2 está vinculada a la transformación maligna de las células y la formación de tumores (12).

En un estudio realizado por De la Cruz-Hernández y colaboradores (88), evaluaron el tratamiento de ribavirina en la línea celular de cáncer de mama MCF-7, lo que resultó en una inhibición del crecimiento de las células que se comparaba con el provocado por el siRNA contra IMPDH, por otro lado, la combinación de ribavirina con siRNA no generó un efecto sinérgico sobre la inhibición del crecimiento de las células (88). En cuanto a el tratamiento con

ribavirina en células de leucemia se produjo en una disminución significativa del ARNm de IMPDH2 y reguló al alza otras vías involucradas en la biosíntesis de purinas (12).

Asimismo, la inhibición de IMPDH por ribavirina en células de glioma se asocia al incremento de apoptosis y a la inducción de autofagia. El tratamiento también dio como resultado una disminución de la actividad de mTORC1 mediante la disminución de la señalización de Src/AKT. Por el contrario, la sustitución de la ribavirina por el inhibidor de la IMPDH tiazofurina replicó los efectos obtenidos por el fármaco. En resumen, estos reportes confirman la capacidad del tratamiento de ribavirina para inhibir la proliferación celular activando procesos como la apoptosis y la inducción de la autofagia (89).

2.9.4. Efectos de ribavirina sobre las vías MAPK, ERK, MNK.

Como se mencionó en el punto 2.4.1. la vía MAPK desempeña un papel importante en el desarrollo, la proliferación y la supervivencia celular. Por lo cual comúnmente están involucradas en la patogénesis del cáncer debido a la sobreexpresión de algunas de las proteínas que forman parte, como Ras, Raf, MEK1/2 y ERK. En un estudio empleando la línea celular de melanoma IGR39, a través de ensayos de inmunoprecipitación encontraron que ribavirina redujo la interacción entre las proteínas Ras y Raf debido a una reducción en la fosforilación de ERK (12). Esto sugiere que el efecto en la actividad de ERK podría asociarse a tres posibles causas; la falta de la interacción de Raf con Ras; la interacción directa de ribavirina con ERK; y la modulación de EIF4E (12).

En otro estudio que investigó la terapia para la LLA y la LMC con ribavirina (30 y 60 $\mu\text{mol/L}$) e imatinib, encontraron reducción de las formas fosforiladas de EIF4E, MEK, ERK y MNK1 en la línea celular SUP-B15 de la LLA. Se demostraron efectos similares en blastos primarios de LLA derivados de pacientes, aunque con una dosis notablemente más alta de ribavirina (500 μM) lo que destaca aún más el efecto de la ribavirina en la vía MAPK (90).

2.10. Línea celular K562 como modelo de estudio.

La línea celular leucémica humana K562 se ha propuesto como un sistema modelo *in vitro* muy útil para estudiar el mecanismo o mecanismos moleculares que regulan la expresión de genes de globina humana embrionaria y fetal, así como para determinar el potencial terapéutico de nuevos compuestos inductores de la diferenciación (82). Esta línea celular, aislada y caracterizada por Lozzio y Lozzio de un paciente con leucemia mielógena crónica en crisis blástica, exhibe una baja proporción de células sintetizadoras de hemoglobina en condiciones estándar de crecimiento celular, pero es capaz de experimentar diferenciación eritroide cuando se trata con una variedad de compuestos, que incluyen hemina, ARA-C, ácido butírico, azacitidina y cromomicina y mitramicina. Después de la inducción eritroide de las células K562, se observa un fuerte aumento en la acumulación citoplásmica de Hb Portland (2 HB-Z, 2 HB-G) y Hb Gower 1 (2 HB-Z, 2 HB-E), acompañado de un aumento en la expresión de los genes de HB-E y HB-G humana. Los estudios *in vitro* demuestran que los inductores conocidos de la diferenciación eritroide K562, como la hidroxurea, la eritropoyetina, los butiratos y la 5-azacitidina, también son capaces de inducir la producción de hemoglobina fetal cuando se administran individualmente o en combinación a células eritroides normales (32). Con respecto a este punto, el ácido butírico y la 5-azacitidina han sido objeto de informes recientes centrados en el tratamiento *in vivo* de las beta talasemias (52).

3. Justificación

Como se abordó anteriormente las leucemias y talasemias son enfermedades de alto impacto a nivel mundial, tanto por sus efectos degenerativos como por sus tratamientos, los cuales presentan muchas complicaciones a los pacientes. Debido a este panorama las investigaciones actuales están centradas en la búsqueda de compuestos que sean capaces de iniciar la diferenciación de las células inmaduras generadas por las leucemias y/o promover la síntesis de hemoglobina para combatir las talasemias. Esta necesidad se ha renovado debido a la rentabilidad y los tiempos largos que se toman en el desarrollo y aprobación de nuevos fármacos, lo que ha llevado a investigar propiedades terapéuticas previamente no caracterizadas entre medicamentos que ya han alcanzado la aprobación de las autoridades sanitarias.

Un candidato para el reposicionamiento es la ribavirina, un agente antiviral usado como tratamiento de diversas enfermedades virales. Aunque estudios recientes han demostrado que ribavirina tiene propiedades antineoplásicas prometedoras, el estudio y la comprensión de los mecanismos de acción podría ofrecer información importante sobre su aplicación en diferentes condiciones patológicas.

Aunque los resultados preclínicos y clínicos prometedores en monoterapia y terapia combinada para varios tipos de cáncer se basan principalmente en el efecto de la ribavirina sobre el factor 4E, aún no se ha esclarecido completamente si su eficacia terapéutica se basa únicamente en este mecanismo o si también involucra acciones complementarias en diferentes procesos celulares como es la inhibición de IMPDH y la regulación sobre las vías MAPK, ERK, MNK. La acumulación de datos sigue arrojando luz no solo sobre los posibles mecanismos de acción, sino también sobre las vías cruciales en distintos tipos de cáncer que podrían ser afectadas por la ribavirina.

Por lo tanto, es imperativo llevar a cabo investigaciones adicionales para explorar estos mecanismos de acción que contribuyen a las propiedades anticancerígenas de la ribavirina. Estos estudios no solo mejorarían su posible aplicación en diversas enfermedades, sino que también servirían como ejemplo de los beneficios del reposicionamiento de medicamentos. Esto, a su vez, podría

incentivar a los investigadores a continuar buscando candidatos clínicamente efectivos y rentables que ya se utilizan de manera segura en la práctica médica actual sin generar efectos adversos tan agresivos como las terapias antineoplásicas comúnmente usadas.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

4. Hipótesis

El tratamiento con ribavirina en la línea celular de leucemia mieloide crónica humana K562 inducirá la expresión de marcadores asociados a la diferenciación eritroide mediante la regulación de las vías AKT y MAPKs.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

5. Objetivos

5.1. General

Evaluar el efecto de ribavirina sobre la regulación de las vías MAPK y AKT, así como de la actividad de la proteína EIF4E durante la diferenciación eritroide en las células K562.

5.2. Específicos

1. Determinar cualitativa y semicuantitativamente la diferenciación eritroide de las células K562 tratadas con ribavirina mediante tinción con bencidina, microscopia óptica y espectrofotometría.
2. Evaluar la viabilidad celular de la línea K562 durante la inducción de la diferenciación con el tratamiento de ribavirina a través del ensayo XTT.
3. Estudiar el efecto del tratamiento con ribavirina en las fases del ciclo celular de las células K562 por tinción con yoduro de propidio y citometría de flujo.
4. Analizar la expresión de marcadores y rutas de diferenciación en células K562 tratadas con ribavirina por RT-PCR y western blot.

Metodología

6.1. Esquema de trabajo

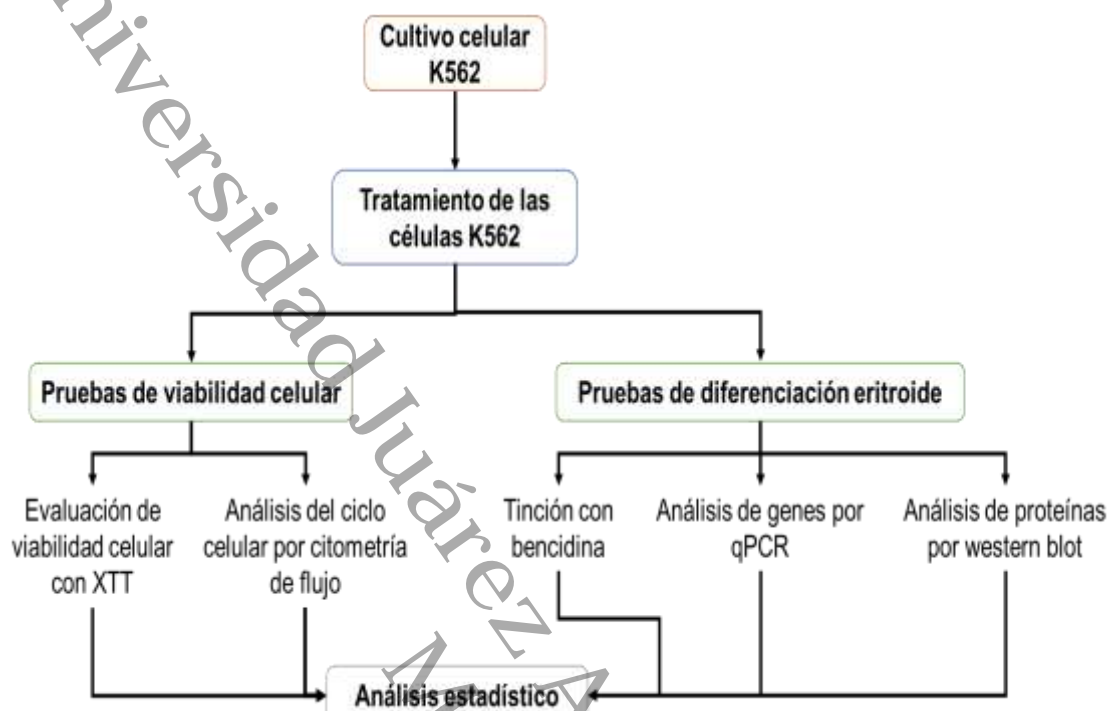


Figura 13. Esquema general de trabajo.

6.2. Cultivo celular

Se empleó un modelo de células eritroleucémicas K562 obtenidas de la *American Type Culture Collection* (ATCC) con número de catálogo CCL-243 aisladas de médula ósea de un paciente con leucemia mielógena crónica de 53 años y caracterizadas por un estadio indiferenciado de UFC-E y la traslocación del cromosoma Filadelfia. Su proliferación requirió RPMI 1640 (Gibco™) complementado con suero fetal bovino (10%), L-glutamina (2 mM), penicilina-estreptomicina [1 mL/L (Thermo Scientific®)] y CO₂ (5%) a 37°C.

El cultivo se realizó de manera estéril en una campana de flujo laminar (Thermo Scientific® MSC Advantage). Brevemente, se tomó 10 mL de RPMI 1640 (Gibco™) complementado con suero fetal bovino (10%) y penicilina-estreptomicina (10 µL), la mezcla se colocó en un frasco de cultivo celular de 75cm² (Corning®), al cual se le adicionó 8 x 10⁴ células de la línea K562 y L-glutamina (2 mM) para promover el crecimiento. Las células fueron incubadas a 37°C en una incubadora de CO₂ (5%) con chaqueta de agua (Thermo Scientific

Forma™ Serie II 3110). El medio de cultivo fue renovado cada 3 a 4 días para evitar el estrés celular.

6.3. Tratamiento de las células K562

Inicialmente, las células K562 fueron tratadas con ribavirina (Sigma-Aldrich®) disuelta en Dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich®) en concentraciones de 10, 20, 30, 50 μ M. Para mantener constantes las concentraciones de los fármacos que disminuyen durante los ensayos debido al metabolismo de las células, este tratamiento fue adicionado nuevamente a las 72 h, evitando la pérdida de disponibilidad durante todo el tiempo de las pruebas. Como fármaco de referencia se usó CDDP a una concentración de 5 μ M (Sigma-Aldrich®) en solución salina, además de un control sin tratamiento.

A fin de determinar los efectos de la inhibición de TORC1 y de MEK/ERK durante la diferenciación eritroide se utilizó como tratamiento 100 μ M de PALOMID 529 (Sigma-Aldrich®) y 100 μ M de PD184352 (Sigma-Aldrich®) respectivamente (23,91).

6.3. Determinación de la diferenciación eritroide

La producción de hemoglobina en las células se determinó a través de la reacción específica de bencidina/peróxido de hidrógeno, catalizada por el grupo "hemo" y fundamentada en la descomposición del H_2O_2 a O_2 cuyo proceso de oxidación de la bencidina genera un derivado verde o azul que es detectado colorimétricamente (10). Inicialmente, 6×10^4 células fueron sembradas por pozo en una placa de 24 pozos conteniendo 2 mL de RPMI 1640 e incubadas durante periodos de 72 a 168 h (3-7 días). Posteriormente, las células K562 fueron recolectadas por centrifugación (2000 rpm/5 min), lavadas con 1 mL de PBS 1X (tres veces), homogenizadas en 100 μ L de PBS 1X y teñidas con 50 μ L de una solución de tinción (bencidina 0.4%; ácido acético glacial 12%; H_2O_2 2%; agua destilada) por 30 minutos protegidas de la luz. El porcentaje de células diferenciadas fue calculado contabilizando en 100 células por muestra con ayuda de una cámara de Neubauer y microscopía óptica de alta resolución (Carl Zeiss® modelo AxioCam ICc 1) (82).

La determinación cuantitativa de células diferenciadas fue realizada colocando 100 μL de la suspensión celular más 50 μL de la solución de tinción con bencidina en una placa de 96 pozos, tras un reposo de 30 minutos en condiciones de obscuridad, se determinó la densidad óptica (espectrofotómetro Epoch, Bioteck® a 570 nm) colocando el equipo en lectura de placa de 96 pozos 6.5 mm de radio (82).

6.4. Evaluación de viabilidad celular con XTT

16 Para los ensayos de viabilidad celular se empleó 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfopenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida (XTT) el cual se basa en la escisión de la sal amarilla de tetrazolio la cual es reducida por los cofactores de nucleótidos de piridina NADH y NADPH mitocondriales para formar un colorante de formazán naranja por células metabólicamente activas, esta solución coloreada resultante es cuantificable por espectrofotometría. Para llevarlo a cabo se utilizó un total de 3×10^3 células/pozo en 100 μL de RPMI 1640, las cuales se sembraron en placas de 96 pozos con determinaciones de viabilidad cada 24 horas por un periodo de 72 a 168 h. Brevemente, a partir de las 72 horas de cultivo, 50 μL de una solución XTT (XTT Labeling Reagent; Electron-coupling Reagent 50:1, Roche®) fue adicionada a cada pozo manteniendo un periodo de incubación de 4 h en condiciones de obscuridad. Transcurrido este tiempo se procedió a realizar la lectura de la placa en un espectrofotómetro para Microplacas Epoch a 492 y 690 nm (Bioteck®).

6.5. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo

Un total de 10×10^4 células fueron sembradas en 2 mL de RPMI 1640 en placas de 6 pozos durante 48 y 72 h. Tras el periodo de incubación, las células fueron centrifugadas (2000 rpm/5 min), lavadas (1 mL PBS 1X) y fijadas en 300 μL de buffer de citratos (citrato trisódico 40 mM; sacarosa 250 mM; pH 7.6; DMSO 5%) en etanol frío al 70%. Previo a la lectura de las células en el citómetro de flujo (FACS Canto II, ByoSystems®) se realizó el protocolo de Vindelov, Christensen, & Nissen, 1982 (92) que consistió en añadir al tubo de reacción: 200 μL de una solución A (NP-40 0.1%; tetrahidrocloruro de espermina 1.50 mM; tripsina 0.3

mg/mL), 200 μ L de una solución B (inhibidor de tripsina 0.5 mg/mL; 0.1 mg/mL ribonucleasa; pH 7.6) y 160 μ L de una solución C (yoduro de propidio 0.416 mg/mL; tetrahidrocloreuro de espermina 1.16 mg/mL) manteniendo un reposo de 15 min en hielo en condiciones de obscuridad. Finalmente, fueron cuantificadas de 20 a 40 células/seg a una velocidad de flujo de 12 pL/seg en presencia de un haz de luz azul a 488 nm con láser de iones de argón para la excitación.

6.6. Análisis de genes por qPCR

El ensayo fue realizado a partir de la siembra de 8×10^4 células K562 en cajas de 6 pozos con 2 mL de RPMI 1640 previamente tratadas e incubadas a 48, 72 y 96 h. Posterior al cultivo, el medio fue eliminado mediante centrifugación (2000 rpm/5 min) y lavados (1 mL PBS 1X). Las células fueron sometidas a procesos de extracción y purificación de ARN total a partir de un Total RNA Purification Kit (Norgen, Biotek®), a cuantificación por espectrofotometría en un Take3 Microvolume Plate (Epoch, Biotek®) y a retrotranscripción mediante un RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit de acuerdo con las condiciones del fabricante (Thermoscientific®). Para las reacciones de qPCR (Rotor-Gene Q, QIAGEN®) se usaron los oligonucleótidos enlistados en la tabla 1, usando al GAPDH como control endógeno. La expresión relativa fue calculada a partir del método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, el cual compara la variación de la expresión (ΔCt) del gen de interés con la del gen de referencia (GAPDH) (93).

Tabla 1. Oligonucleótidos seleccionados para el análisis de expresión de genes.

Marcador de diferenciación	Rutas de diferenciación
HB-A1,2	KLF-1
HB-B	FAM122
HB-G	EIF4E
	TAL-1
	GATA-1
	GATA-2

6.7. Análisis de proteínas por western blot

El ensayo se realizó a partir de 8×10^4 células de la línea K562 sembradas en frascos de cultivo celular de 75cm^2 que contenían 10 mL de medio RPMI 1640, se utilizaron tiempos de incubación con tratamiento de 72 y 96 h. Para la extracción de proteínas totales, las células expuestas a ribavirina y CDDP se lavaron tres veces con 1 mL de PBS 1X por centrifugación a 2000 rpm durante 5 minutos para eliminar el medio, posteriormente las células fueron tratadas con 200 μL de solución de lisis celular (RIPA) suplementado con inhibidores de proteasas (0.5 M Tris-HCl [pH 7.4], 1.5M NaCl, 2.5% ácido desoxicólico, 10% NP-40, 10mM EDTA, 1 mM PMSF), para promover la lisis se usó ultrasonido con punta sónica y congelación rápida con nitrógeno líquido. La calidad de las proteínas obtenidas se corroboró mediante electroforesis en geles de poliacrilamida teñidos con azul de coomasie al 2%. La detección de las proteínas HB-B (SC-21757), HB-G (SC-21756), TAL1 (SC-393287), GATA-1 (SC-265), p38 (SC-535), p38-P (SC-17852), ERK (SC-1647), ERK-P (SC-7383), AKT (SC-55523), AKT-P (SC-7985), EIF4E (SC-9976), EIF4E-P (SC-12885), se llevó a cabo mediante anticuerpos específicos (Santa Cruz Biotechnology). Brevemente, las proteínas se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida del 15 o 18% dependiendo del peso molecular y se transfirieron a membranas de PVDF (Immobilon[®]-P) en cámara húmeda (Bio-Rad[®]). Después, las membranas se incubaron con anticuerpos primarios utilizando una dilución 1:1000 dirigidos contra las proteínas diana a 4°C durante toda la noche. Para la detección del complejo proteína-anticuerpo primario se emplearon anticuerpos peroxidados utilizando el sistema de quimioluminiscencia (ECL, Millipore), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La normalización de la cantidad de proteína totales se determinó utilizando anticuerpos que reconocen a GADPH (Santa Cruz Biotechnology), proteína que se expresa de manera constitutiva. El análisis cuantitativo de los niveles de proteína y fosforilación se basó en el software ImageJ.

6.8. Análisis estadístico

Con los datos obtenidos se generó una base de datos en el software GraphPad Prims 8 donde fueron analizados todos los ensayos con sus respectivos triplicados mediante pruebas de ANOVA de una sola vía y pruebas post hoc de Tukey. Un valor de $p < 0,05$ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$) fue considerado como estadísticamente significativa.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

7. Resultados y discusión

7.1. Determinación de la diferenciación eritroide

La capacidad de la ribavirina (RB) para inducir la diferenciación eritroide se evaluó en células K562 tratadas durante un máximo de 168 h. De acuerdo con la figura 14 el porcentaje de células diferenciadas aumentó de manera dependiente del tiempo y la concentración empleada de RB. El porcentaje de células diferenciadas mostró una diferencia significativa a partir de la concentración 10 μM respecto al control ($p < 0.0001$) desde las 72h de tratamiento. Por otra parte, la concentración más alta del tratamiento (50 μM) con RB indujo un 98% de diferenciación en las células a las 168 h, mientras que a las 72 h se observa un 44.5% de diferenciación. Comparando estos porcentajes con el fármaco de referencia CDDP, el comportamiento en la diferenciación respecto al tiempo fue parecido a la concentración de 10 μM .

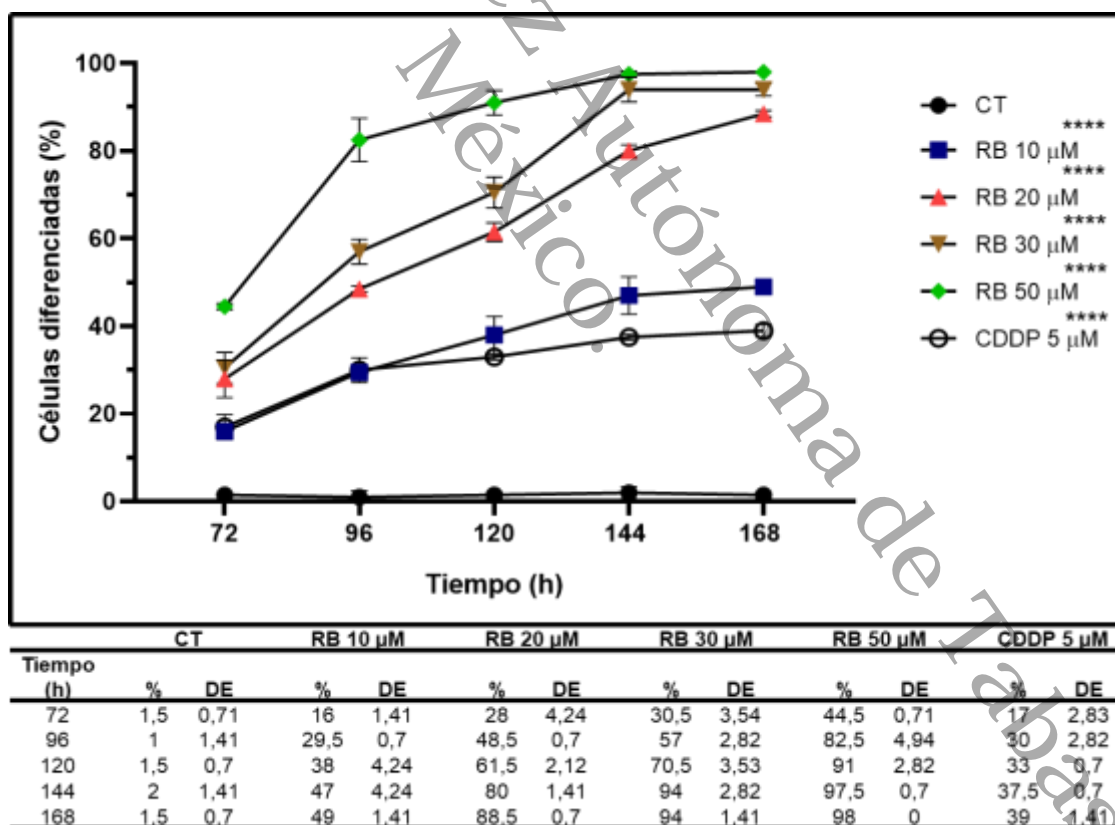


Figura 14. Determinación cualitativa de la diferenciación de células K562 por microscopía óptica, CT: control, RB: ribavirina, CDDP: cisplatino. ANOVA con post hoc de Tukey vs grupo CT; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$; las barras representan las medias \pm DE.

Para verificar los datos obtenidos mediante los ensayos de las células teñidas con bencidina, se realizó un ensayo cuantitativo basado en la lectura de la absorbancia de la hemoglobina teñida con bencidina, donde se midió la DO de las células K562 tratadas con RB. En la figura 15, se muestra el comportamiento de las células durante la inducción de diferenciación con RB, donde de igual manera que los resultados reportados en el ensayo morfológico, la diferenciación eritroide fue dependiente del tiempo y de la concentración empleada. Describiendo los resultados, observamos que la concentración de 10 µM de RB (0.134 de DO) exhibió una diferencia significativa respecto al control (0.114 de DO) a partir de las 72 h de tratamiento (*p<0.05). El punto más alto del tratamiento con la RB se obtuvo con la concentración 50 µM, la cual genero un valor de 0.163 DO a 72 h y en el tiempo final de 168 h alcanzo un máximo de 0.499 DO (p<0.0001). Por último, el fármaco de referencia CDDP registró una diferenciación celular (0.205 DO) a 72 h mayor a todas las concentraciones de RB, pero su incremento conforme al tiempo fue mínimo, mostrando una DO de 0.300 a 168 h, similar a la concentración de 20 µM de RB.

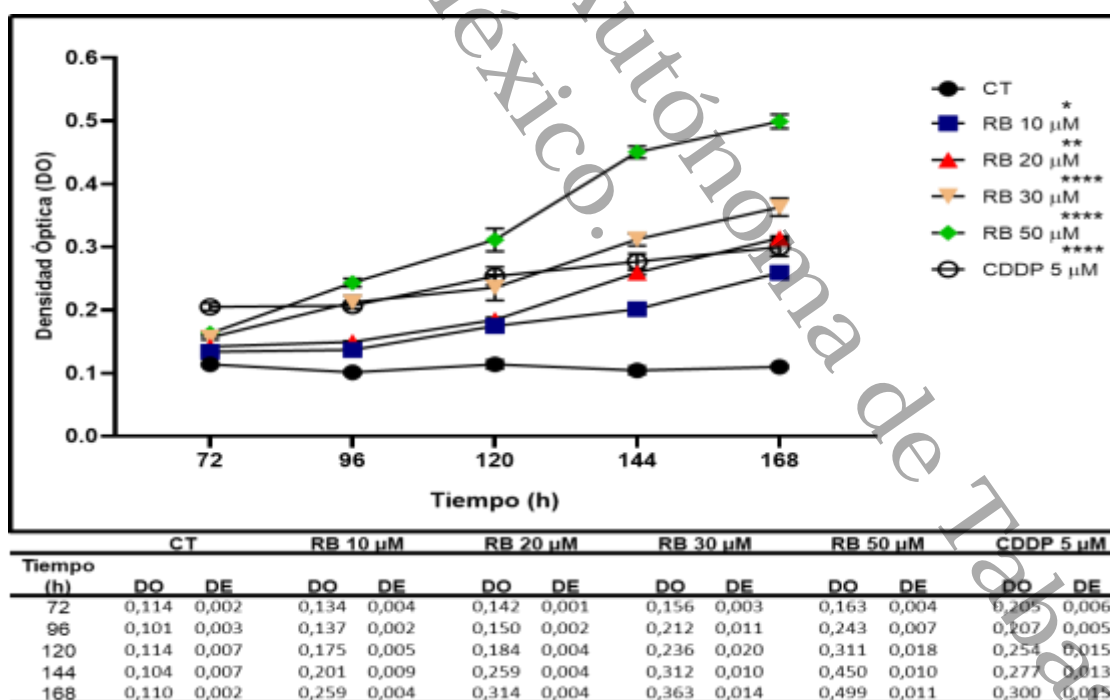


Figura 15. Determinación semicuantitativa de la diferenciación de células K562 por microscopía óptica, CT: control, RB: ribavirina, CDDP: cisplatino. ANOVA con post hoc de Tukey vs grupo CT; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001; las barras representan las medias ± DE.

Se documentó la morfología y la variación de la tinción con bencidina, que se observó en presencia de las diferentes concentraciones de RB (figura 16). Se encontró que las células K562 diferenciadas sin tratamiento (control) exhibieron una tinción tenue lo que indica una baja presencia de hemoglobina, en comparación con el tratamiento con RB de 10 μM que presentó un mayor grado de tinción, demostrando niveles más altos de hemoglobina al incrementar la concentración de RB, como se observa en la células expuestas a 30 μM de RB, donde la tinción abarca toda la célula. Respecto al tratamiento con CDDP (5 μM), el grado de tinción celular fue similar a las concentraciones de 10 y 20 μM de RB. La morfología de las células teñidas con bencidina que fueron expuestas a tratamiento con RB en concentraciones de 30 y 50 μM presentan forma redondeada o ligeramente ovalada, sin la presencia de gránulos con una membrana celular lisa, en comparación de las células no teñidas o parcialmente teñidas que presentan una forma más ovalada irregular, con presencia de gránulos.

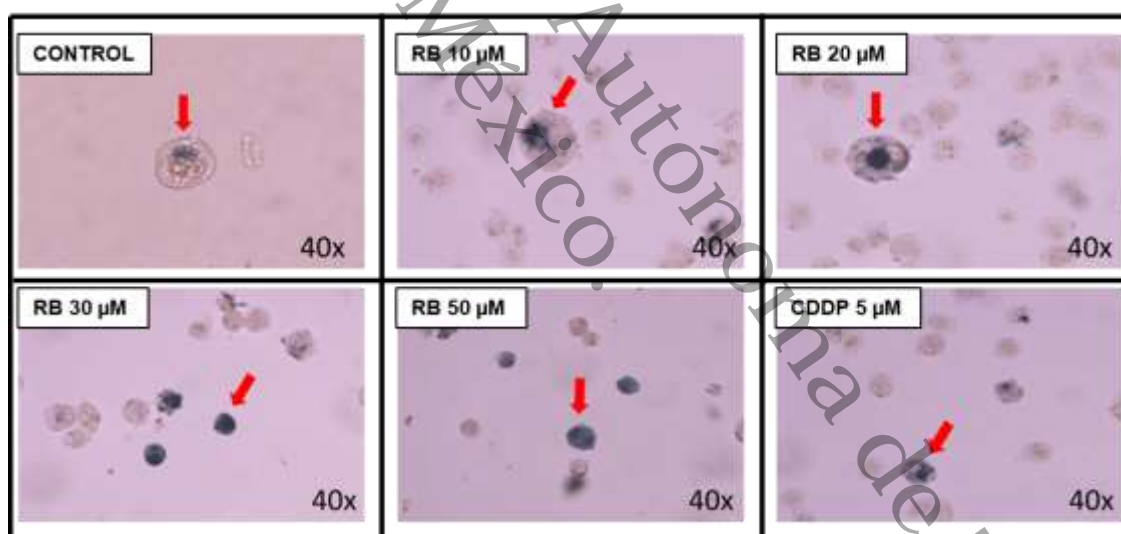


Figura 16. Diferenciación de células K562 con ribavirina, RB: ribavirina, CDDP: cisplatino. Observación morfológica de las células teñidas con bencidina en aumento 40X, las flechas rojas señalan las células bencidina positiva.

La presencia de hemoglobina dentro de la célula es una característica exclusiva de las células eritroides maduras (94). Así que a través de estos resultados se demuestra el potencial inductor de la diferenciación de la RB en concentraciones menores a 50 μM . Estos resultados complementan los descrito por Joshua Casaos y colaboradores, en los cuales se encontró diferenciación eritroide con

RB en concentraciones mayores a 50 μM (12). Con los resultados anteriores podemos determinar que la concentración óptima para inducir diferenciación eritroide es de 30 μM de RB, ya que presenta un mayor nivel de diferenciación celular en referencia al fármaco control CDDP con una diferencia de 55% observado por microscopia óptica y una diferencia de 0.064 DO registrada por espectrofotometría, ambas a 168 h de tratamiento. Además la concentración de 30 μM de RB obtuvo porcentajes similares de diferenciación eritroide que la concentración de RB más alta empleada (50 μM), registrando un 94% de células diferenciadas para ambas concentraciones a 144 h y de 97.5% para 30 μM de RB y 98% 50 μM de RB a 168 h, comprobado por microscopia óptica.

7.2. Evaluación de viabilidad celular con XTT

Con el objetivo de evaluar si el tratamiento con Rb afecta la viabilidad de las células durante la diferenciación, se realizaron evaluaciones mediante XTT durante los diferentes tiempos del tratamiento. En la figura 17, se muestra que a partir de la concentración de 10 μM de RB se alcanzó una inhibición del 23.534% de la viabilidad con respecto a las células control ($p < 0.001$) a las 72 h, obteniendo su máxima inhibición de 41.211% a 120 h. En el caso de la concentración de 50 μM de RB, se presentó el mayor inhibición de la viabilidad celular con un 84.501% a 120 h ($p < 0.0001$). Respecto al efecto del fármaco control CDDP, podemos observar que este tuvo un comportamiento parecido a la concentración de 30 μM de RB, donde ambos a 120 h obtuvieron una inhibición promedio de 67% ($p < 0.0001$). En otras palabras, RB a 30 μM posee la misma eficacia para generar la inhibición la viabilidad de células eritroleucemicas K562 que el fármaco de referencia CDDP a 5 μM , siendo esto desde el punto de vista terapéutico es una gran ventaja ya que un tratamiento antineoplásico con RB exhibiría efectos secundarios menos severos como tos, diarrea, acidez estomacal, piel seca, sarpullido, entre otros no tan graves, comparados con los del CDDP siendo los más significativos la neuropatía óptica, la ototoxicidad, la nefrotoxicidad aguda y crónica (10).

En cuanto a los tiempos de 144 y 168 h, aunque la viabilidad celular fue significativamente menor al control, se observó un aumento gradual en el porcentaje de la viabilidad celular a partir de las 144h. Este comportamiento

podría está relacionado con los cambios morfológicos generados por el proceso de diferenciación eritroide y que afectan el metabolismo del XTT. En este sentido podemos decir que el incremento no está asociado exclusivamente a un mayor número de células diferenciadas, también podría estar relacionado con un metabolismo diferente del formazán en las células diferenciadas, debido a que un eritrocito maduro sufre la pérdida de su núcleo y de sus mitocondrias, ya que es necesario por sus funciones específicas del transporte de oxígeno. Esto conlleva a que sus mecanismos de obtención de energía se basen principalmente en un 95% de la glucólisis y el otro 5% en la vía de las pentosas, esto reduce en gran medida la cantidad de enzimas deshidrogenasas disponibles capaces de metabolizar el XTT a comparación de las células con presencia de mitocondria (95,96).

Estos hallazgos sugieren que como se ha descrito que la RB es un inhibidor de IMPDH, enzima que se encuentra estrechamente relacionada con la transformación y proliferación de células malignas, ya que cataliza el paso limitante de la velocidad de síntesis de novo de GTP, disminuyendo así el potencial proliferativo de las células K562 (81,97). Sin embargo, no se pude descartar el efecto que RB puede tener sobre los múltiples blancos celulares que son afectados directa o indirectamente.

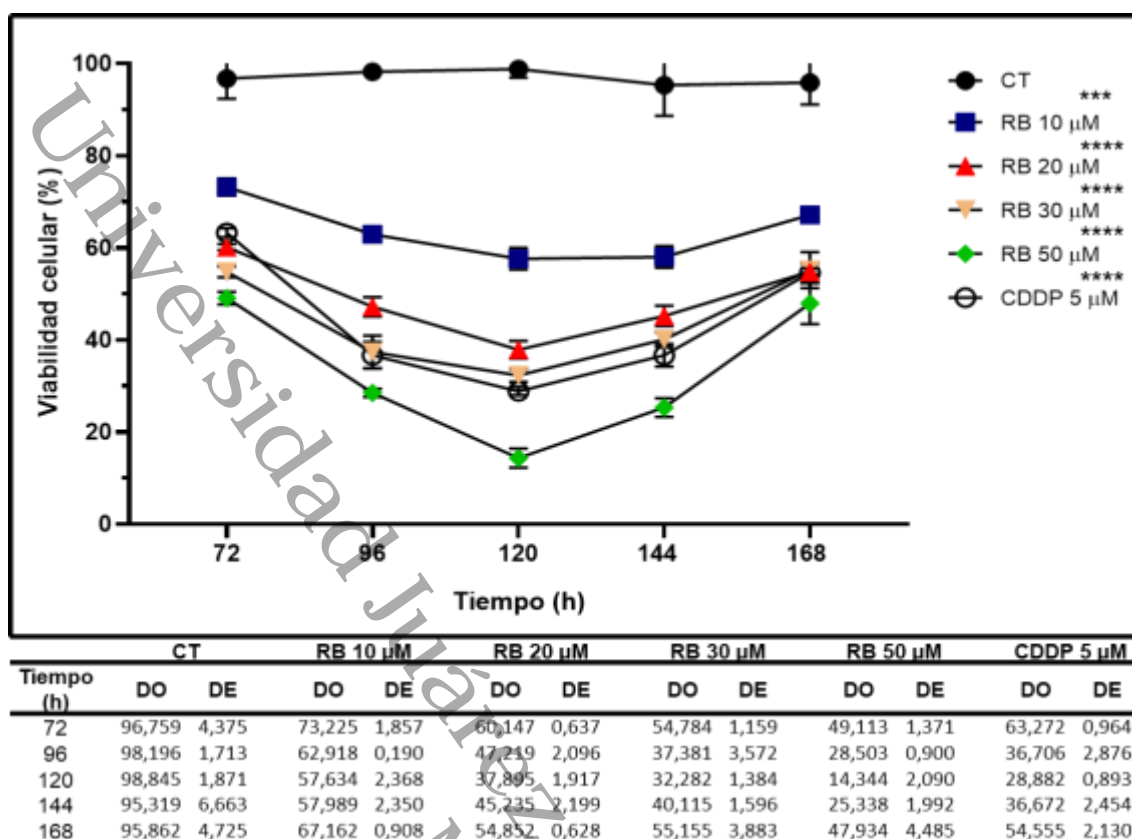


Figura 17. Viabilidad de células K562 con ribavirina, CT: control, RB: ribavirina, CDDP: cisplatino. ANOVA con post hoc de Tukey vs grupo CT; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001; las barras representan las medias ± DE.

7.3. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo

Con el fin de analizar el efecto de RB sobre la transición entre las fases del ciclo celular durante la diferenciación eritroide, se utilizó el análisis de citometría de flujo mediante la tinción con yoduro de propidio. La figura 18 muestra la distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular después de 48 y 72 h de tratamiento. En la cual se demuestra que no existen diferencias significativas en la proporción de células en las fases G1, S y G2/M a las 48 h de tratamiento con RB (p>0.05). Sin embargo, el fármaco de referencia CDDP mostró un arresto significativo de las células en fase G2/M (57.82%) con respecto al control (7.99%) (p<0.0001).

Contrario a los datos obtenidos a 48 h, se puede observar que al tratamiento con RB a 72 h produjo un incremento en la cantidad de células presentes en la fase G2/M. Este incremento fue dependiente de la concentración, ya que a partir de

la concentración de 10 μM mostró un incremento significativo del 17.76% ($p < 0.05$) hasta un 31.99% a los 50 μM ($p < 0.0001$). Este incremento se relacionó con la reducción de la proporción de células en fase S. Mientras que CDDP generó de igual manera el mayor porcentaje de células en la fase G2/M (81.2%) con un incremento importante en la apoptosis celular de 11.88%

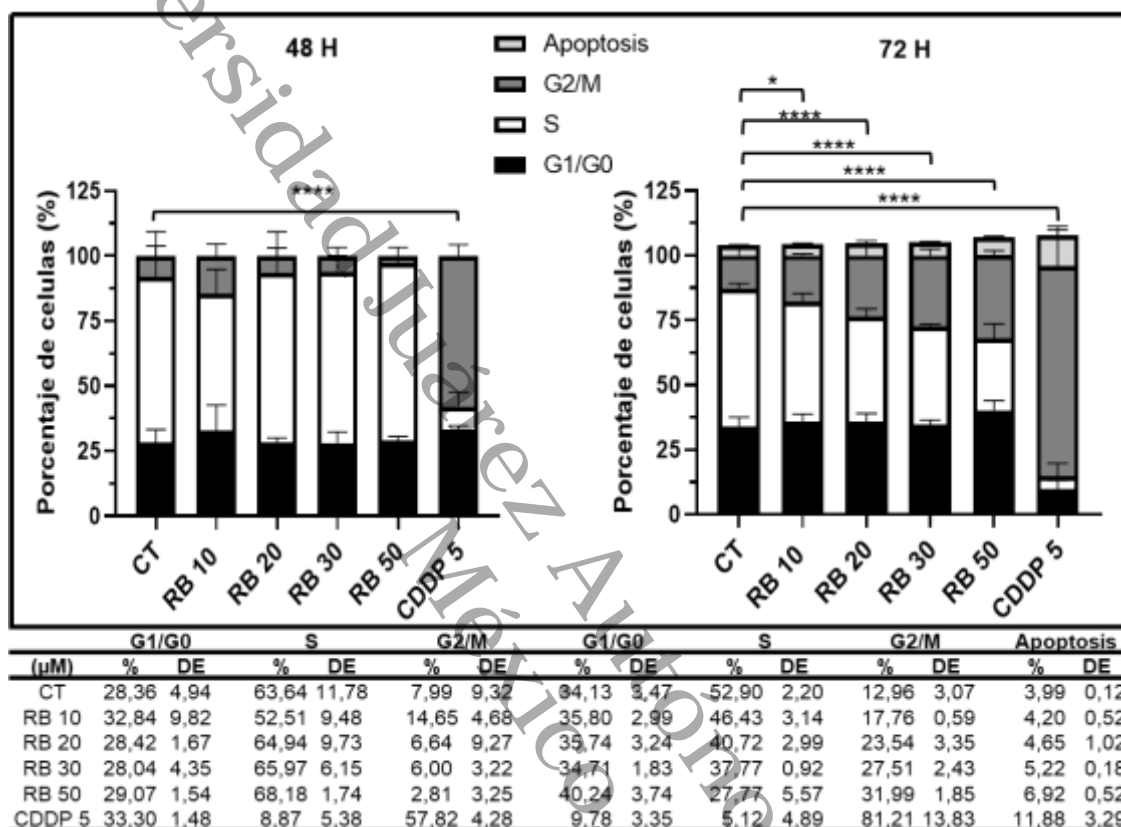


Figura 18. Distribución de las fases del ciclo celular de la línea K562 a diferentes concentraciones de ribavirina, CT: control, RB: ribavirina, CDDP: cisplatino. ANOVA con post hoc de Tukey vs grupo CT; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$; las barras representan las medias \pm DE.

Los resultados obtenidos para CDDP, están relacionados con su mecanismo de acción anteriormente descritos por Lee y Kim, 2005 (98). Consistentes con la actividad del fármaco, ya tiene la capacidad de interactuar con muchos componentes celulares que contengan sitios nucleofílicos, como las proteínas, los fosfolípidos de membrana, los microfilamentos del citoesqueleto, el ARN y el ADN. Siendo esta unión al ADN nuclear la genera los aductos que incluyen entrecruzamientos de ADN entre cadenas e intracadenas y entrecruzamientos de ADN-proteína, siendo el aducto más común el entrecruzamiento intracatenario entre guaninas adyacentes (figura 19). Este efecto se traduce en un daño al ADN inducido por CDDP, lo que provoca la detención del ciclo celular

en el punto de control de la fase G2, evitando la progresión a la fase M hasta que el ADN dañado este reparado. Este mecanismo se activa generando un aumento de la concentración y actividad de la proteína p53, a su vez activa la transcripción de genes que codifican a las proteínas inhibidoras de las cinasas dependientes de ciclinas (Cdk), tales como p21 y p16. Si el daño es demasiado grave como para ser reparado, p53 puede inducir a la célula a su muerte por apoptosis a través de la transcripción de Bax (99). Esto lo vemos reflejado en los resultados de la figura 17, donde se muestra que CDDP reduce la viabilidad celular (58.64%) sin incrementar significativamente la diferenciación eritroide debido al arresto en G2/M e inducción de apoptosis.

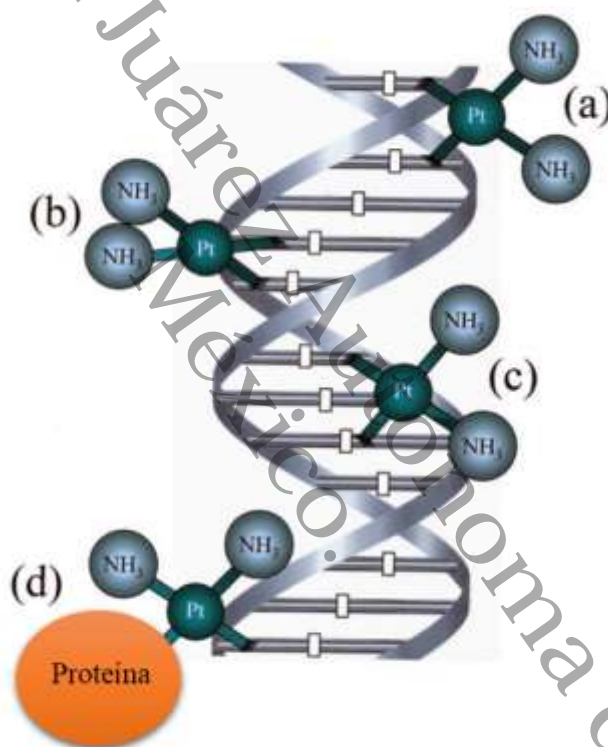


Figura 19. Principales aductos formados en la interacción del cisplatino con el ADN. (a) entrecruzamiento entre hebras; (b) entrecruzamiento intracatenario; (c) enlace cruzado ADN-proteína. Modificado de “Is Cisplatin-Induced Cell Death Always Produced by Apoptosis?”, elaborado por Gonzales y colaboradores, 2001 (100).

En cuanto a RB, el análisis del ciclo celular reveló que a 48 h no se genera efecto significativos respecto al control permaneciendo la mayoría de las células en fase S, lo que significa que no hubo cambios en el comportamiento habitual de las células eritroleucemicas K562 presentes en G1 y G2. Este hallazgo podría estar asociado a que BCR-ABL activa la cinasa dependiente de ciclina Cdk2 a través

de la vía PI3K-AKT induciendo la progresión del ciclo celular desde G1 a S estando la mayor parte de las células en fases S, lo que indica que su potencial proliferativo no se vio afectado a las 44 h (61). No obstante, a las 72 h, RB provocó un desplazamiento significativo de las células de la fase S a la fase G2/M, este cambio se debe a nuestra hipótesis inicial, en el cual las células se encuentran en un estadio diferenciado, lo que promueve que dichas células pierdan su potencial proliferativo (figura 18, 72 h), pero mantengan su viabilidad celular (figura 17), lo que correlaciona con los resultados de la figura 14, en la cual se observa que a 72 h RB presenta un incremento significativo de la diferenciación eritroide desde la concentración más baja (10 μ M).

7.4. Análisis de genes por qPCR

Para establecer la correlación entre los niveles de diferenciación con respecto al nivel de expresión de los marcadores de diferenciación eritroide se analizó la expresión de los genes globina alfa, globina beta, y globina gamma, así como los genes implicados en su regulación: KLF1, TAL1, GATA1, GATA-2, FAM122 y eIF4E. Como se observa en la figura 20, la RB aumentó la expresión del gen de HB-A de manera dependiente de la concentración y del tiempo. Se observa que a partir de 20 μ M hubo un incremento significativo de la expresión de 1.99 veces ($p < 0.05$) con respecto al control a partir de 48 h. A las 72 h la expresión del gen aumentó 3.17 veces con la misma concentración de RB (20 μ M) y finalmente, alcanzó un nivel de expresión del gen HB-A de 7.66 veces a las 96 h ($p < 0.0001$). Este incremento dependiente de la concentración y del tiempo alcanzó un valor máximo de 13.55 veces con la concentración de 50 μ M a 96 h.

A través de estos ensayos se puede proponer que RB es capaz de inducir el incremento de la expresión del gen de HB-A, destacando que esta globina es de suma importancia para la formación de las hemoglobinas Gower III, fetal, adulta 1 y 2, por lo que su síntesis es necesaria para la formación de estas últimas tres y para el correcto transporte de oxígeno y evitar el desarrollo de anemias (18).

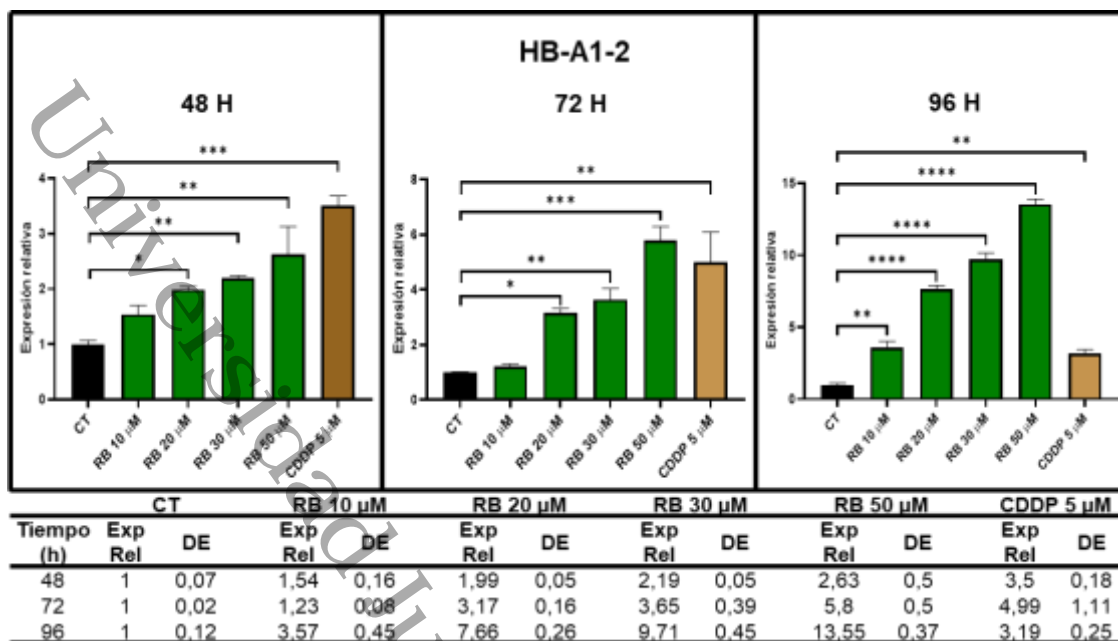


Figura 20. Expresión del gen HB-A1-2, CT: control, RB: ribavirina, CDDP: cisplatino. ANOVA con post hoc de Tukey vs grupo CT; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001; las barras representan las medias ± DE. Los datos obtenidos representan el cambio de veces en relación con la expresión de genes diana en comparación con las células K562 no tratadas (CT).

De acuerdo con el análisis de expresión de la globina beta, se puede describir lo siguiente. La expresión del gen de HB-B tuvo reducción en su expresión a las 48 h de tratamiento; El tratamiento con las diferentes concentraciones de RB disminuyo la expresión de HB-B hasta 0.37 veces en la concentración mayor (50 µM) respecto al control (p<0.05), a diferencia de CDDP que incremento la expresión 1.35 veces (p<0.0001) (figura 21). A las 72 h los niveles de expresión del gen se mantuvieron a nivel control, observando un aumentó de 1.73 veces en el tratamiento con CDDP (p<0.01). Finalmente, el tratamiento a las 96 h con RB genero un aumentó a partir de la concentración de 30 µM de 1.66 veces (p<0.05). Cabe mencionar que CDDP mantuvo un incremento de la expresión mayor a 2 veces (p<0.0001) a partir de las 48h. Teniendo en cuenta estos resultados, se puede observar que RB tiene un menor efecto sobre la expresión del gen de HB-B en comparación con HB-A. No obstante se puede observar que a concentraciones de 30 µM se requieren tiempos prolongados de exposición para generar un aumento modesto de la expresión del gen. En otras palabras, RB promueve la formación de hemoglobina adulta en menor proporción, ya que la síntesis de globina beta alcanzo menores niveles de expresión (53). En cuanto a CDDP, demostró ser un promotor de la expresión del gen HB-B desde las 48

h, esto sugiere que la hemoglobina adulta es la que se encuentra presente en la células diferenciadas por este fármaco.

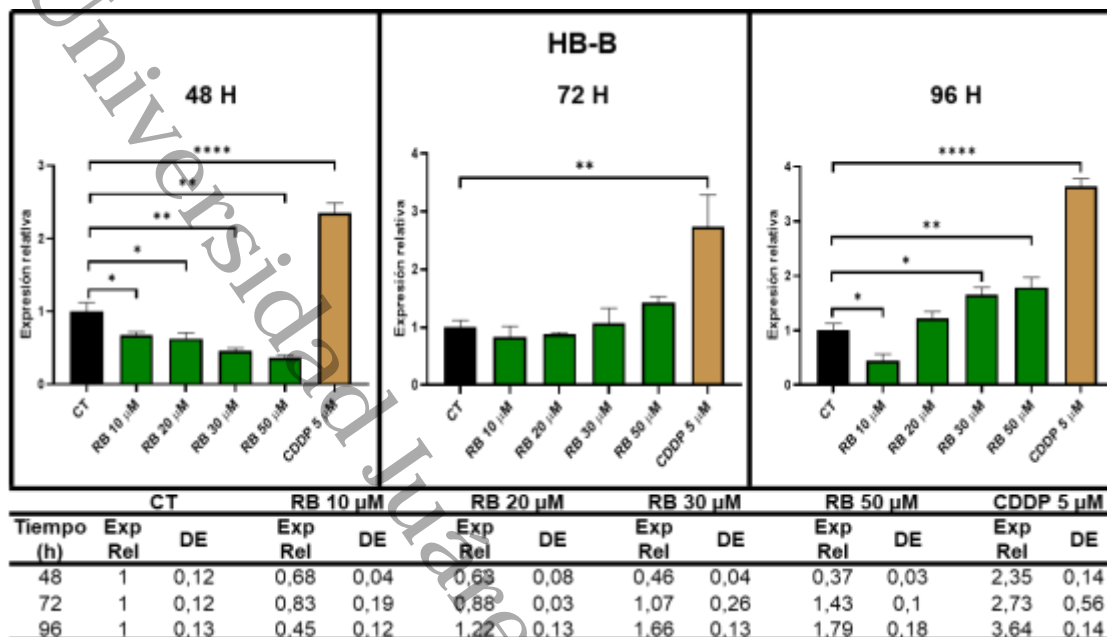


Figura 21. Expresión del gen HB-B, CT: control, RB: ribavirina, CDDP: cisplatino. ANOVA con post hoc de Tukey vs grupo CT; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001; las barras representan las medias ± DE. Los datos obtenidos representan el cambio de veces en relación con la expresión de genes diana en comparación con las células K562 no tratadas (CT).

Para concluir el análisis de expresión de los genes marcadores de diferenciación se analizó el gen de HB-G (figura 22). Se observa que RB no generó cambios en la expresión a 48 h con las diferentes concentraciones, sin embargo, después de 72 h de tratamiento, la expresión del gen se incrementó a partir de 20 µM, alcanzando un nivel de 3.83 veces con 50 µM. En cuanto al tiempo de 96 h aumentó en la expresión de HB-G gen se presentó desde la concentración más baja (10 µM), teniendo un máximo de expresión de HB-G con 50 µM de RB de 13.84 veces (p<0.0001). Por otro lado, CDDP mantuvo un nivel de expresión en promedio de 2 veces con respecto al control durante los tiempos de los ensayos.

Este efecto de la RB sugiere que es capaz de promover principalmente la síntesis de hemoglobina fetal (HbF), ya que esta tipo está conformada por dos cadenas globínicas alfa y dos gamma. La HbF solo se encuentra presente durante la etapa embrionaria y fetal, para luego reducir sus niveles a menos del 0.6% en el adulto, además posee la característica de tener mayor afinidad al oxígeno que la hemoglobina adulta, a pesar de ello se ha descrito que aumentos en su

concentración en pacientes con beta talasemias se asociaron con una tasa reducida de episodios dolorosos agudos, menos úlceras en las piernas, menos osteonecrosis, síndromes torácicos agudos y por lo tanto, menor gravedad de la enfermedad (52).

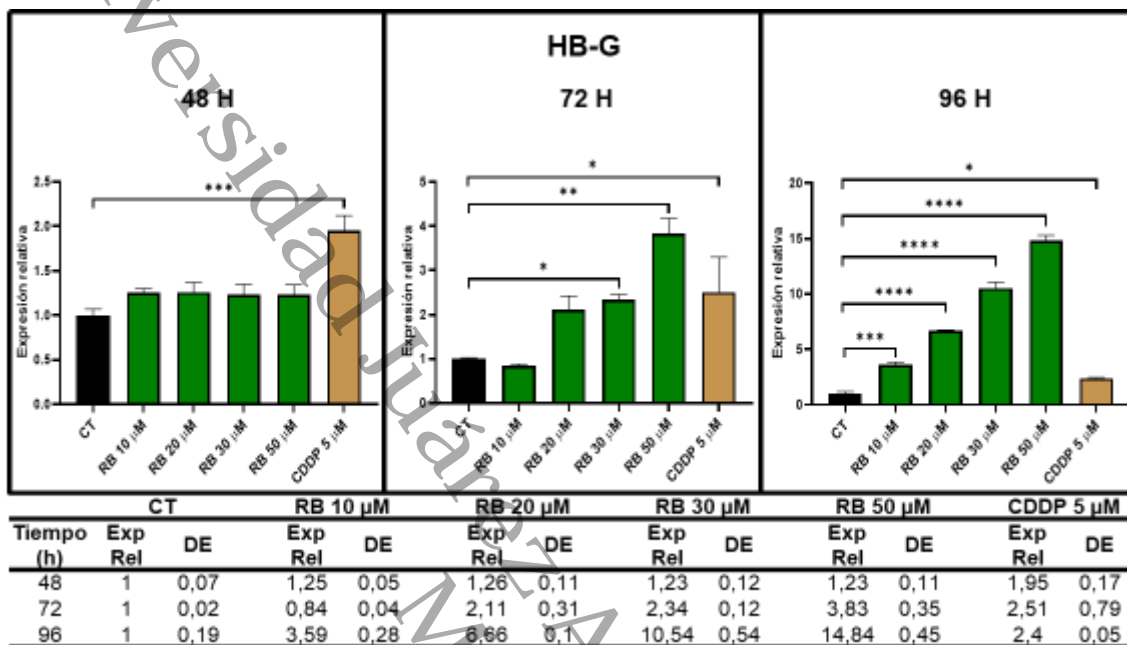


Figura 22. Expresión del gen HB-G, CT: control, RB: ribavirina, CDDP: cisplatino. ANOVA con post hoc de Tukey vs grupo CT; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001; las barras representan las medias ± DE. Los datos obtenidos representan el cambio de veces en relación con la expresión de genes diana en comparación con las células K562 no tratadas (CT).

El análisis realizado a los genes implicados en la regulación de la diferenciación, como es el caso de KLF1 presento los siguientes resultados (figura 23). La concentración de 20 µM de RB incrementa la expresión del gen KLF1 en 1.31 veces respecto al control a las 48 h de incubación, sin embargo solo hasta 50 µM obtuvo una significancia estadística el incremento (p<0.01). A 72 h, las concentraciones de 30 y 50 µM RB una diferencia significativa respecto al control, ya que presentaron un aumento de la expresión del 1.61 (p<0.05) y 1.63 veces (**p<0.01) respectivamente. Mientras que a las 96 h, el tratamiento con RB aumentó la expresión del KLF1 2.2 veces a partir de 20 µM. Estos resultados correlacionan con el comportamiento observado con la expresión de HB-B y HB-G (figuras 21 y 22). Ya que KLF1 es el factor encargado de realizar el cambio de la hemoglobina fetal a la adulta, suprimiendo la expresión del gen de HB-G. Debido a que RB genera un leve aumento en la expresión a las 96 h pareciera

no ser suficiente para generar este cambio en la expresión, inclusive en tiempos prolongados de tratamiento (101). Sin embargo, aunque CDDP, que presento cambios significativos a partir de 48 h donde incremento la expresión 1.63 veces (* $p < 0.05$), en los ensayos a 72 y 96 h no hubo modificaciones en su expresión. Este resultado sugiere que los niveles de expresión de HB-B promovidos por CDDP, se deben a diferentes mecanismos de regulación independientes de la participación de KLF1 como por ejemplo BCL11A o SOX6 (102). BCL11A es capaz de unirse a varias regiones del grupo de genes de HB-B, incluidos los elementos potenciadores distales de la región de control del locus, al propio gen de HB-E, y a las secuencias intergénicas entre la HB-G y la HB-D que se han implicado en la represión de la HB-G. Lo que se traduce en que la expresión de BCL11A en células eritroides favorece la expresión predominante de HB-B reduciendo los niveles de HB-G (103).

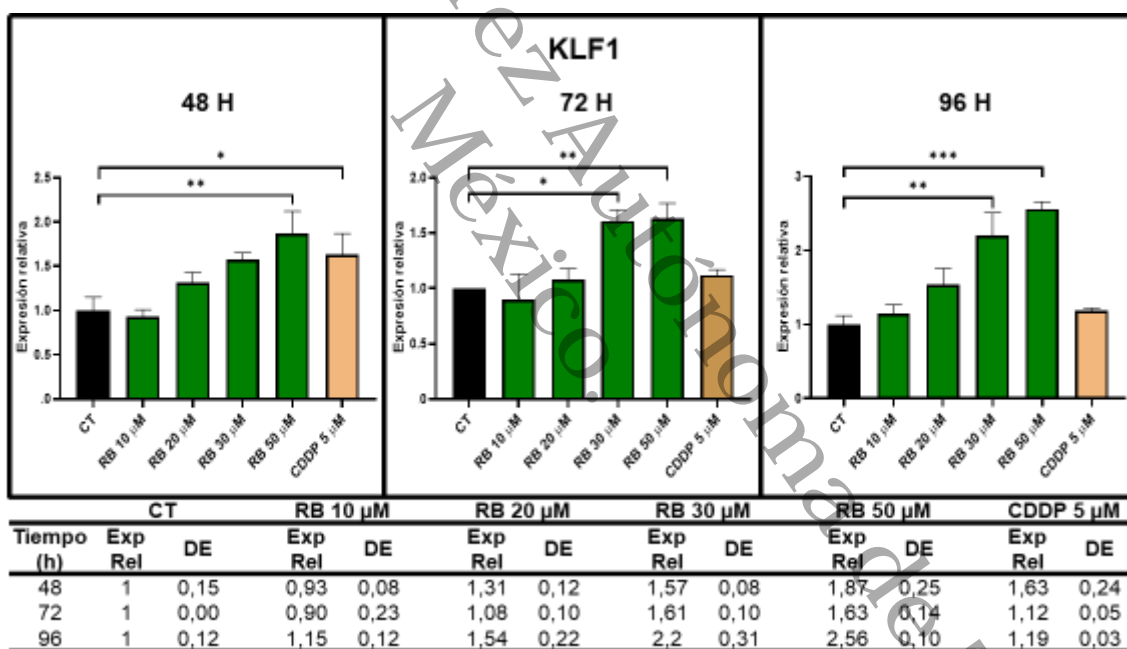


Figura 23. Expresión del gen KLF1, CT: control, RB: ribavirina, CDDP: cisplatino. ANOVA con post hoc de Tukey vs grupo CT; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$; las barras representan las medias \pm DE. Los datos obtenidos representan el cambio de veces en relación con la expresión de genes diana en comparación con las células K562 no tratadas (CT).

Los resultados obtenidos de los ensayo de expresión del gen TAL1 se muestran en la figura 24. La expresión de TAL1 incremento de manera significativa con las concentraciones de RB 30 y 50 μ M desde las 48 h. Sin embargo, este efecto se presentó a partir de la concentración de 10 μ M de RB (1.56 veces), aumentando

de manera significativa hasta 3 veces con la concentración de 50 µM. Por otra parte, el tratamiento con CDDP (5 µM), mantuvo constante la expresión del gen TAL1 conforme a los tres tiempos de los ensayos (48, 72 y 96 h) con un promedio de 1:55 veces (p<0.05).

TAL1 es un gen esencial para la maduración eritroide, ya que las principales funciones de TAL1 es actuar como regulador de los genes: KLF1 y GATA-1, las proteínas de membrana Band 4.2 (EPB4.2), la glicoforina A (GYPA), así como los grupos de genes de HB-A y HB-B. Debido a esto, la falta de este gen conduce a un bloqueo en la eritropoyesis. Según los resultados de la figura 24, RB promueve la expresión de TAL1 de manera dependiente de la concentración y del tiempo, por lo que se deduce que su expresión es importante para la inducción a la diferenciación eritroide generada por RB.

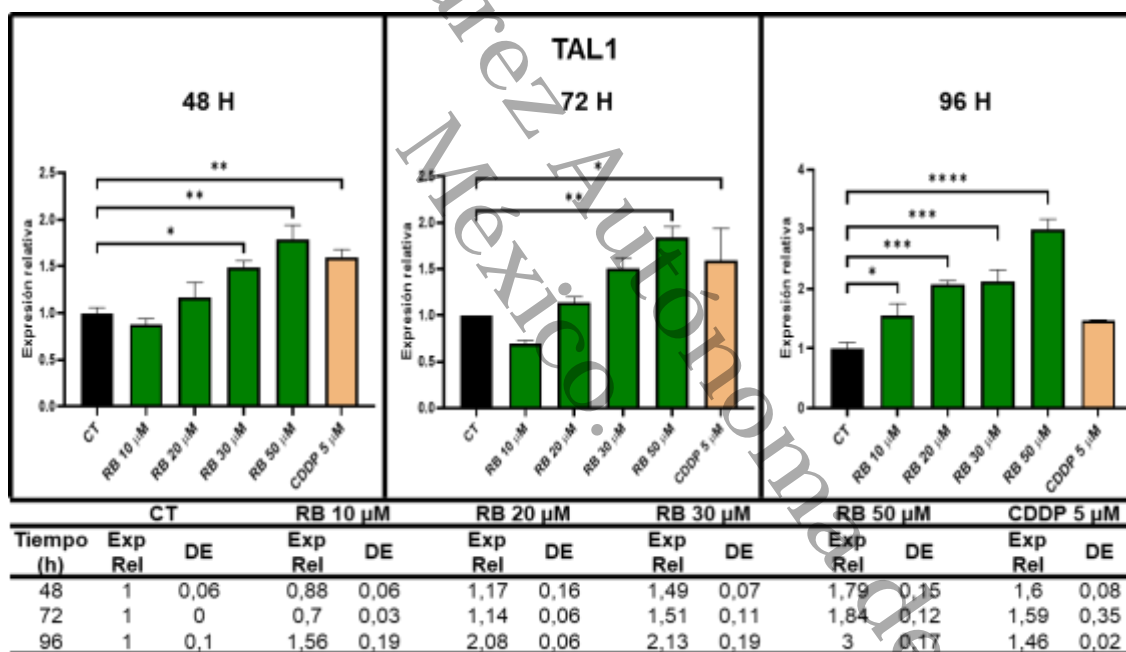


Figura 24. Expresión del gen TAL1, CT: control, RB: ribavirina, CDDP: cisplatino. ANOVA con post hoc de Tukey vs grupo CT; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001; las barras representan las medias ± DE. Los datos obtenidos representan el cambio de veces en relación con la expresión de genes diana en comparación con las células K562 no tratadas (CT).

Debido a la importancia de los genes GATA 1 y 2 en la diferenciación eritroide, se evaluó el efecto de la Rb sobre su expresión. En la figura 25 se puede observar que los niveles de expresión del gen GATA-2, se reducen con el tratamiento de RB a partir de las 24 h de tratamiento, manteniendo niveles promedios de 0.5 veces respecto a las células control. Este efecto se presentó

con CDDP a partir de las 72 h (0.47 veces, $p < 0.05$), manteniéndose hasta las 96 h.

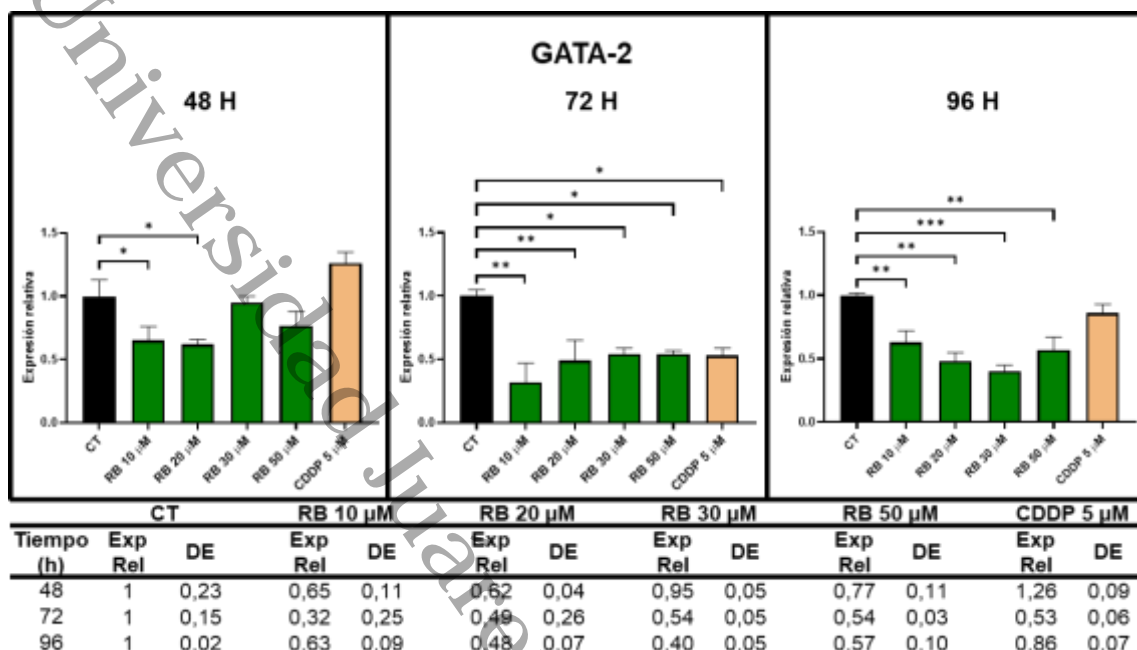


Figura 25. Expresión del gen GATA-2, CT: control, RB: ribavirina, CDDP: cisplatino. ANOVA con post hoc de Tukey vs grupo CT; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$; las barras representan las medias \pm DE. Los datos obtenidos representan el cambio de veces en relación con la expresión de genes diana en comparación con las células K562 no tratadas (CT).

En el caso de GATA-1, los resultados obtenidos revelan que RB produjo la inhibición de la transcripción de GATA-1 a partir de 48 h con un nivel mínimo de 0.18 veces (50 μM). La inhibición de GATA-1 se mantuvo hasta las 72 h los niveles de expresión (figura 26). No obstante, a las 96 h la expresión del gen alcanzó los niveles del control. En cuanto al CDDP, el tratamiento disminuyó la expresión de GATA-1 continuamente hasta las 72 h, finalmente a 96 h la expresión incrementó 1.71 veces (** $p < 0.01$) con respecto al control.

Tomando en cuenta los resultados de expresión de los genes GATA-2 y GATA-1 (figuras 25 y 26), se puede proponer que RB pudiera estar participando en la regulación negativa de la expresión de GATA-2 durante las etapas tempranas de la diferenciación eritroide. Sin embargo, la falta de incremento de GATA-1 sugiere mecanismos independientes de su expresión transcripcional. La expresión de GATA-2 se encuentra elevada en las etapas precoces de la hematopoyesis debido a que promueve la proliferación celular en los estadios de PMC, UFB-E y UFC-E, además GATA-2 promueve la expresión de GATA-1 el

cual incrementa gradualmente sus niveles disminuyendo la expresión de GATA-2, la proliferación celular e induce la diferenciación celular a proeritroblastos, sucesivamente hasta la formación del eritrocito maduro donde disminuirá sus niveles nuevamente (4,42). De hecho, se ha reportado que la sobreexpresión de ambos genes GATA-2 y GATA-1 mantiene a las células en proliferación, genera maduración eritroide defectuosa e inhibe la actividad de diferenciación de GATA-1 (43).

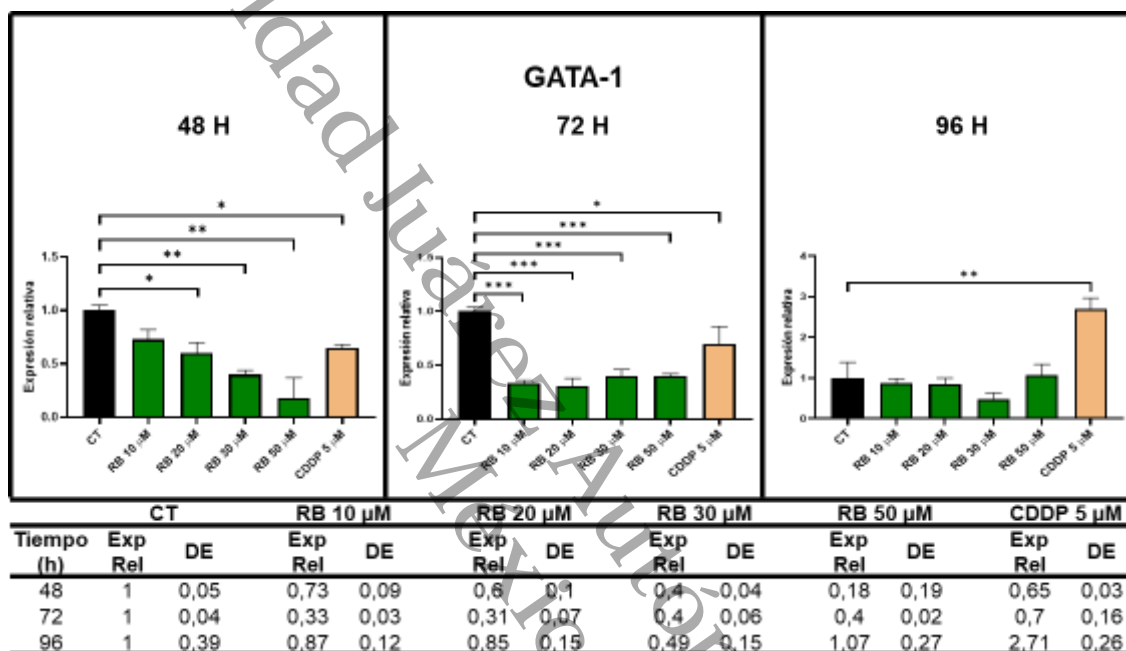


Figura 26. Expresión del gen GATA-1, CT: control, RB: ribavirina, CDDP: cisplatino. ANOVA con post hoc de Tukey vs grupo CT; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001; las barras representan las medias ± DE. Los datos obtenidos representan el cambio de veces en relación con la expresión de genes diana en comparación con las células K562 no tratadas (CT).

Otro gen de interés para este estudio es FAM122 (figura 27), el cual durante el presente una inhibió de manera significativa en la expresión durante las primeras etapas del tratamiento (48 y 72 h). Sin embargo, a las 96 h solo se observó una leve disminución de FAM122 en la concentración de 10 μM (*p<0.05). Este hallazgo fue similar al comportamiento presentado con CDDP en los tiempos evaluados en el ensayo.

FAM122 es un gen que regula negativamente la diferenciación eritroide FAM122, durante este proceso se reduce su expresión. La sobreexpresión inhibe significativamente la diferenciación eritroide debido a que se une al dedo de zinc C-terminal de GATA-1, por lo que bloquea su actividad como factor

transcripcional crítico para la eritropoyesis. Tomando en cuenta lo antes mencionado, se puede considerar que la disminución en la expresión del gen FAM122 con el tratamiento con RB y CDDP está involucrada en la progresión de la diferenciación eritroide como un evento tardío, ya que se observa la reducción a partir de las 72 h, tiempo en el cual se encontró porcentajes significativos de células diferenciadas al realizar la tinción con bencidina (figura 14).

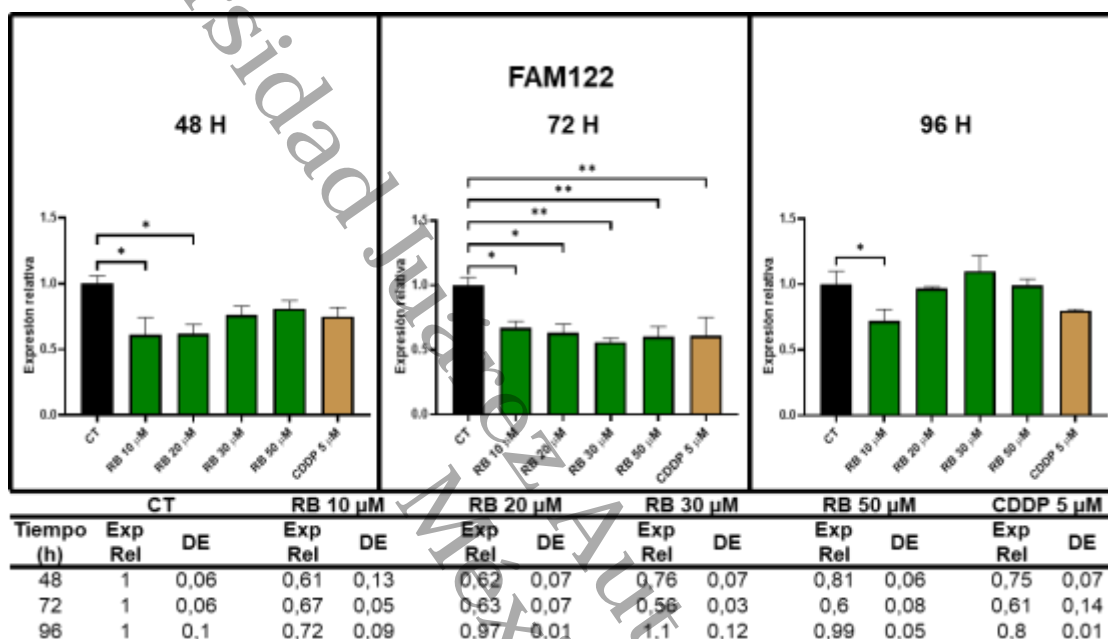


Figura 27. Expresión del gen FAM122, CT: control, RB: ribavirina, CDDP: cisplatino. ANOVA con post hoc de Tukey vs grupo CT; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001; las barras representan las medias ± DE. Los datos obtenidos representan el cambio de veces en relación con la expresión de genes diana en comparación con las células K562 no tratadas (CT).

Para último se analizó los niveles de expresión del gen eiF4E (figura 28), demostrando que RB provocó la regulación a la baja del gen de manera constante con las diferentes concentraciones y durante los tres tiempos de los ensayos. A 48 h de aplicación se observó un promedio de reducción de 0.36 veces (p<0.01), a 72 h de 0.40 veces (p<0.01) y finalmente a 96 h de 0.47 veces (p<0.01) con respecto al control. De manera similar, CDDP mostró tener un efecto inhibitorio de la expresión de eiF4E dependiente del tiempo de tratamiento, teniendo un máximo en la reducción a 96 h de 0.33 veces (p<0.05).

Aunque la inhibición de RB sobre eiF4E a nivel de proteína se ha descrito con anterioridad por Volpon y colaboradores (86), proponiéndose que el control negativo de la expresión de este gen puede ser catalogado como necesario por

su relación con un mal pronóstico de la enfermedad, la transformación maligna y la resistencia a los medicamentos, debido a que eIF4E modula la traducción de un subconjunto de ARNm que están implicados en la proliferación, la supervivencia y la oncogénesis (81).

Otro punto de interés sobre la inhibición de eIF4E a nivel de la transcripción resalta la presencia de un mecanismo adicional de la RB a través del control de la transcripción de manera indirecta. Además del efecto en la reducción del transporte del ARNm de factores como GATA-2, el cual se reduce de manera similar durante los presentes ensayos.

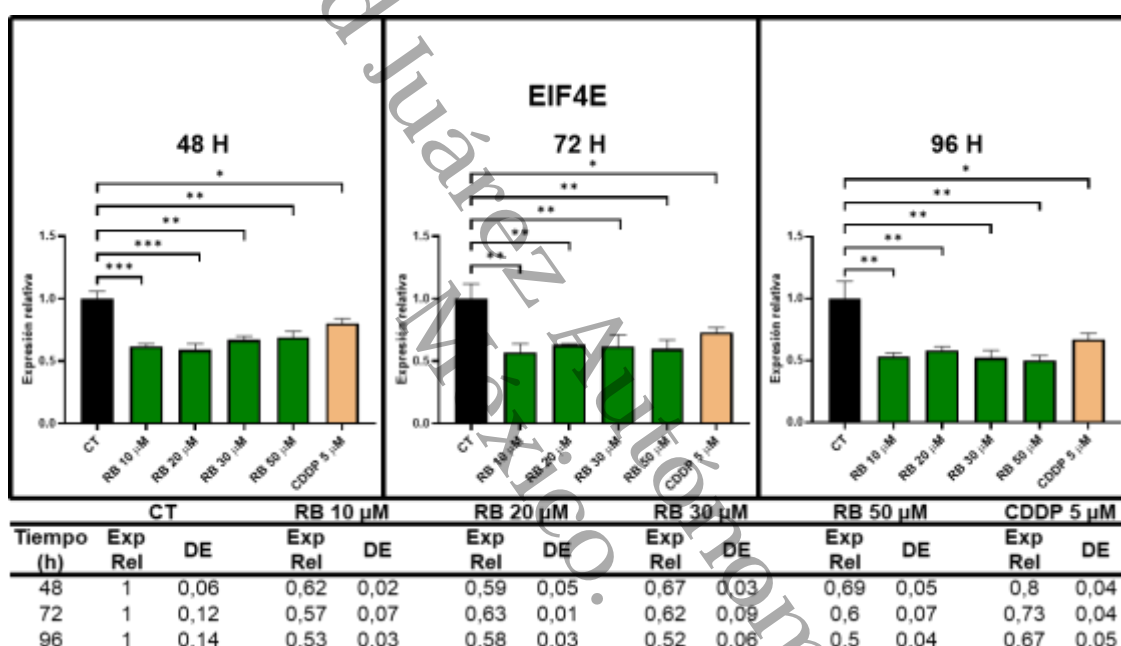


Figura 28. Expresión del gen EIF4E, CT: control, RB: ribavirina, CDDP: cisplatino. ANOVA con post hoc de Tukey vs grupo CT; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001; las barras representan las medias ± DE.

7.5. Análisis de proteínas por western blot

Para complementar los ensayos de expresión de los marcadores de diferenciación y principalmente de las proteínas involucradas en el control de la diferenciación se realizaron ensayos de western blot. Los niveles de expresión de las proteínas de la células K562 expuestas a RB y CDDP durante 72 h se muestran en la figura 29. Se puede observar que el tratamiento con RB presenta mayores niveles de HB-B y de la HB-G de manera dependiente de la concentración, aunque en mayor proporción para la HB-G. Este resultado fue

similar al efecto observado con CDDP, aunque en caso contrario fue mayor para la HB-B que para la HB-G, los resultados correlacionan notablemente con los niveles de expresión del ARNm de estas proteínas.

De manera similar, la RB aumenta los niveles de la proteína TAL1 con respecto a la concentración de RB empleada a las 72 h de tratamiento. En el caso de GATA-1, los niveles de expresión de la proteínas se redujeron en presencia de RB y CDDP, estos resultados se relacionan con los resultados obtenidos a nivel de expresión de los genes, lo cual resalta la participación de TAL1 en la progresión de la diferenciación eritroide mediada por RB.

Debido a los efectos reportados para RB sobre la vía MAPK y AKT/PKB, se analizó la expresión de la proteínas involucradas en ambas rutas a 72 h de tratamiento. Se demostró que RB no afecta los niveles totales de p38, ERK, AKT y EIF4E en las células K562 a las 72 h de tratamiento, pero si afecta la fosforilación de estas proteínas de manera negativa, reduciéndola de manera dependiente de la dosis, esto se traduce en la disminución de la actividad de las proteínas (figura 29).

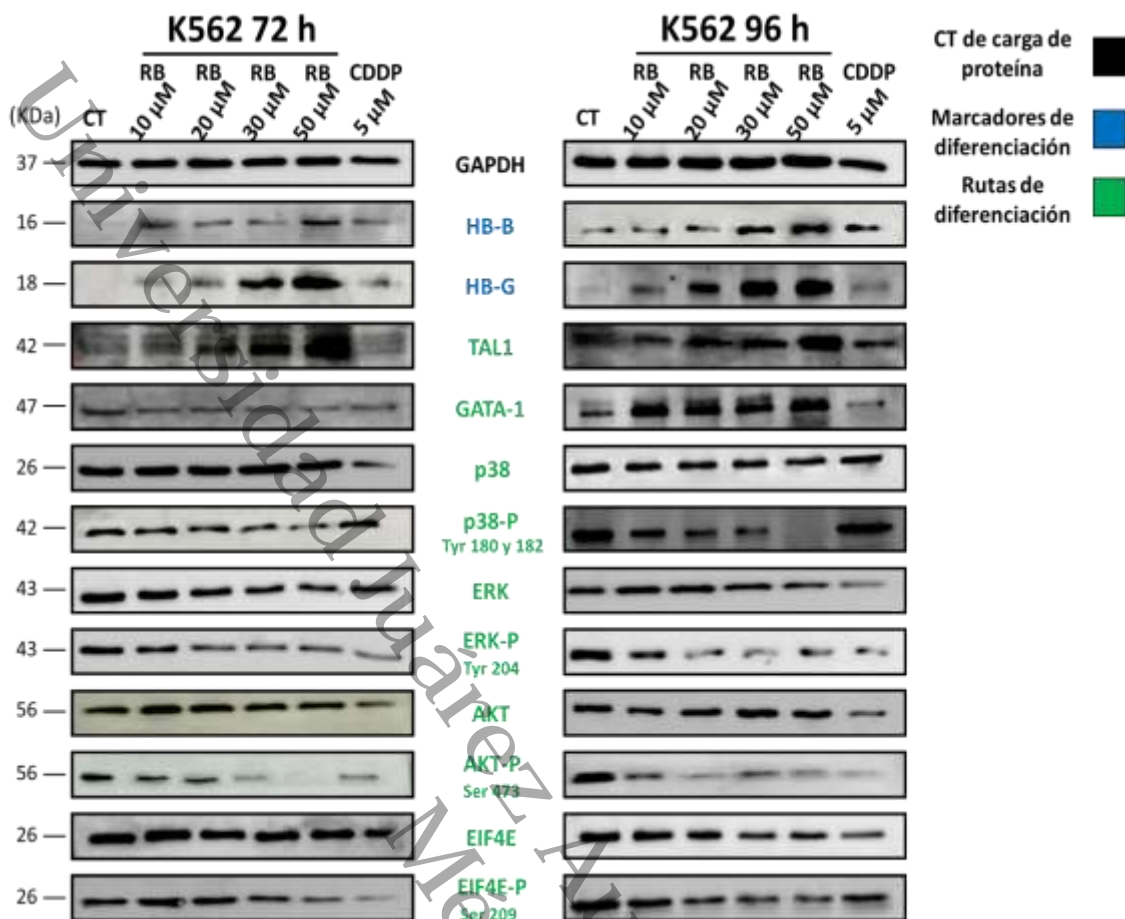


Figura 29. Niveles de expresión de proteínas a 72 y 96 h de tratamiento con ribavirina, CT: control, RB: ribavirina, CDDP: cisplatino.

El análisis de la expresión de las proteínas de las células K562 expuestas a RB y CDDP por 96 H se muestran en la figura 29. Donde se observa que RB aumenta notablemente los niveles de HB-G sobre la HB-B. Esto es congruente con la síntesis principalmente de hemoglobina fetal en las células diferenciadas por RB. La cual, como se mencionó antes, ha resultado una estrategia benéfica para aminorar la sintomatología asociada a las leucemias mieloides y las talasemias, relacionando de manera importante con la expectativa de vida de los pacientes (10). Por el contrario, CDDP aumentó los niveles de expresión de la proteína HB-B sobre HB-G, lo que se traduce en que CDDP promueve la síntesis de la hemoglobina adulta.

Este efecto sobre la síntesis de la HB-B y HB-G se relacionó con la expresión de la proteína TAL1, la cual tuvo un incremento dependiente de la concentración de RB (figura 29), similar al efecto observado en GATA-1. La cual incrementa sus niveles de expresión conforme se incrementan las concentraciones de RB. Este

hallazgo resalta la importancia de ambas proteínas en la diferenciación eritroide, ya que el incremento en ambas es un evento necesario para la progresión debido a que TAL1 forma un heterodímero obligatorio con proteínas hélice-bucle-hélice básicas E2A, como E47, y junto con otras proteínas enumeradas anteriormente (KLF1), nuclea un complejo que incluye GATA-1 unido a su sitio afín (43). Estos complejos formados por GATA-1/TAL1/E2A inducen la expresión génica, mientras que GATA-1 sin TAL1 la reprime. Aunque todavía no se comprende en su totalidad cómo la interacción y la coocupación de varias proteínas en los complejos multiproteicos GATA-1 activan o reprimen la transcripción y por lo tanto, regulan la progresión de la diferenciación eritroide (39).

Por último, la evaluación de la expresión de proteínas involucradas en la ruta de MAPK con 96 H de tratamiento, reveló que RB inhibe la fosforilación de las proteínas p38, ERK, AKT y EIF4E de manera dependiente de la dosis. En otras palabras, RB modula de manera negativa las vías fundamentales para la proliferación y supervivencia, como es MAPK y AKT, respectivamente (104). Estos resultados sugieren que la reducción de la fosforilación puede ocurrir a través de la unión y la modulación directa o de manera indirecta a través de eIF4E, debido a que este factor podría estar implicado principalmente en el control de los genes implicados en la regulación negativa de la diferenciación eritroide y /o en el control de mecanismos epigenéticos como las histonas deacetilasas (HDAC).

Por lo tanto, se puede resumir que los resultados obtenidos en la regulación positiva de la diferenciación eritroide, la síntesis de hemoglobina, la disminución de la viabilidad celular y la regulación del ciclo celular después del tratamiento con RB son en consecuencia de mecanismos directos o indirectos sobre diferentes genes y proteínas, incluyendo EIF4E (figura 30). Al analizar la evidencia disponible, se sugiere que la regulación negativa de RB sobre la expresión del gen y la fosforilación de la proteína EIF4E, está participando en la progresión de la diferenciación eritroide, a través de mecanismos indirectos en el cual se disminuye el transporte de los transcritos de ARNm de factores que impiden la maduración de la células eritroides como por ejemplo MYC (105), LMO2 (106), PU.1 (107), GATA-2 (41), FAM122 (78) y AKT (23). Permitiendo a su vez el incremento en la expresión y la actividad de las proteínas encargadas

de dirigir y promover la formación del eritrocito como GATA-1, TAL1, KLF1, HB-B y HB-G (4).

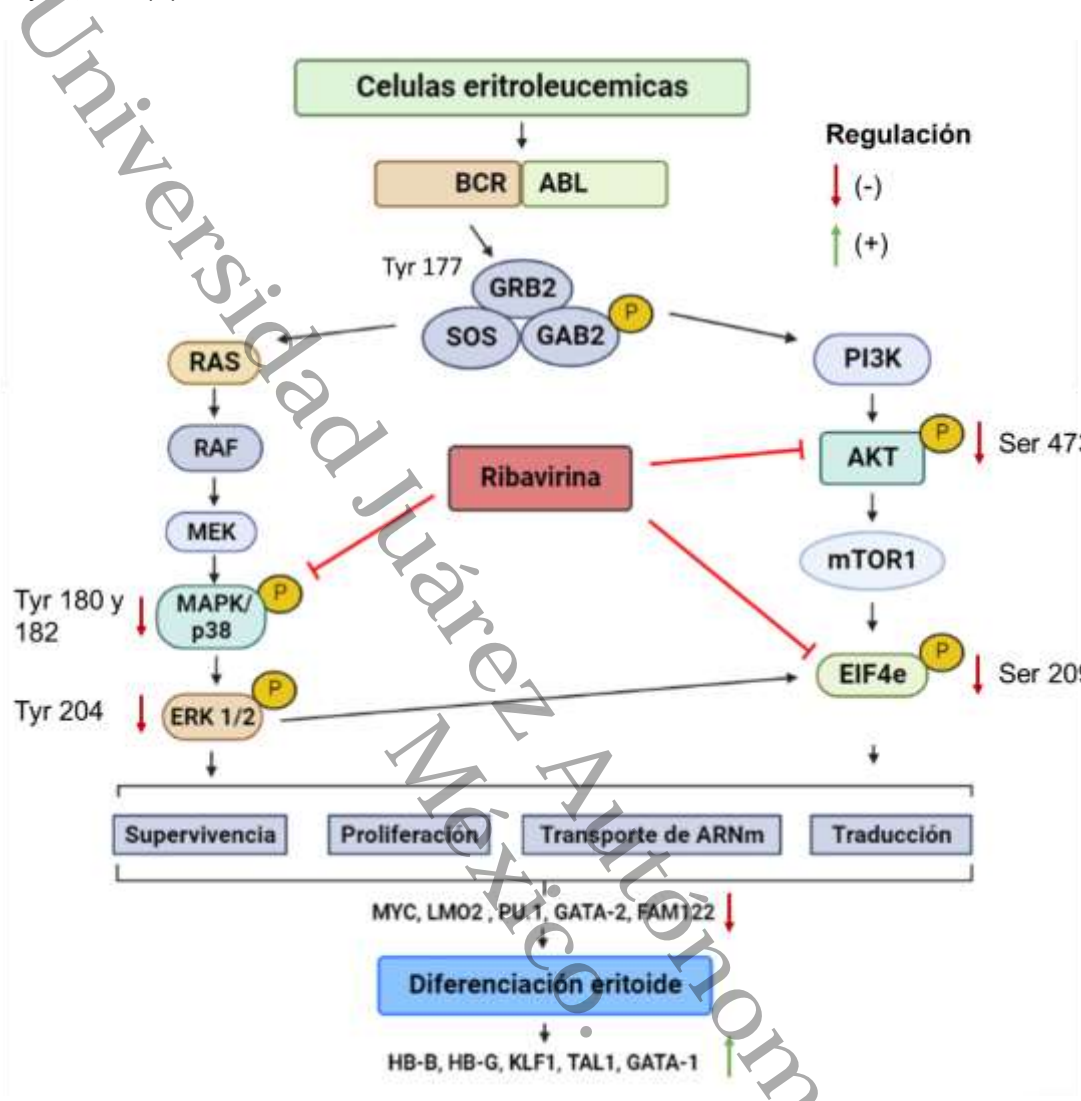


Figura 30. Mecanismo de acción de ribavirina en un modelo de células eritroleucémicas. Creado en Biorender.com.

De igual manera en consideración a los resultados obtenidos al evaluar RB en diferentes concentraciones (10, 20, 30 y 50 μM) se encontró que 30 μM de RB es capaz de promover de manera significativa los cambios en la expresión de los factores asociados a marcadores y rutas de diferenciación eritroide. Siendo una concentración capaz de inducir la diferenciación eritroide menor a lo reportado por Joshua y colaboradores, donde indicaban que RB a 145 μM generaba un porcentaje de alrededor del 50% de células diferenciadas (12).

7.6. Comparación de los efectos de ribavirina con los inhibidores PALOMID 529 y PD184352

PALOMID 529 es un agente no esteroideo, sintético, de molécula pequeña, el cual fue diseñado mediante química computacional, sintética y medicinal (23). Este compuesto posee actividad antitumoral debido a su especificidad al inhibir la ruta de transducción de señales PI3K/AKT/mTORC mediante su inhibición doble TORC1/TORC2 (23). Se ha descrito que la ruta PI3K/AKT/mTORC puede ser activada a través de muchos eventos mutagénicos directos o indirectos que la desregularizan resultando en muchos tipos de cáncer humano. Es por ello por lo que la ruta PI3K/AKT/mTORC se ha vuelto un objetivo atractivo en el diseño de agentes inhibidores para la intervención terapéutica del cáncer. PALOMID 529 ha demostrado la capacidad de inhibir el crecimiento de varias líneas celulares cancerosas del panel de tumores del Instituto Nacional del Cáncer-60 (NCI-60) que incluyen cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de colon, cáncer del sistema nervioso central, melanoma, cáncer de ovarios, cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer de mama y leucemia incluyendo la línea celular K562 (23). Además se ha descrito que PALOMID 529 inhibe al factor 4E de forma dependiente de la dosis en fibroblastos de pulmón humano (108), aunque no se ha reportado si posee potencial diferenciador en células eritroleucemicas.

Por otro lado PD184352 un derivado de benzohidroxamato, es un inhibidor potente y altamente selectivo de MEK1/2 y de manera no competitiva ERK1/2 (91). La cascada MEK/ERK está altamente involucrada en la transducción de señales para una multiplicidad de estímulos proliferativos y productos de protooncogenes que sugiere su papel clave en la mediación de la transformación neoplásica. La sobreexpresión o activación constitutiva de esta vía puede resultar de alteraciones en una o más de sus moléculas de señalización través de la expresión alterada o mutación de elementos aguas arriba es decir, receptores de tirosina quinasa de la superficie celular y/o protooncogenes (BCR-ABL) como se abordó en los capítulos anteriores. Es por ello por lo que PD184352 al ser un inhibidor de MEK/ERK ha demostrado actividad antitumoral preclínica en modelos de tumores de mama, páncreas y colon (91). En otros estudios con PD184352 se ha descrito que promueve la apoptosis de la línea celular eritroleucemica K562, aunque de igual manera que PALOMID 529 no se

ha descrito su efectos en la diferenciación celular. En este contexto, se realizaron ensayos del potencial diferenciador eritroide de células eritroleucemicas K562 tratadas con PALOMID 529 y PD184352 en concentraciones de 100 μM , comparados con el fármaco RB a 30 μM , concentración que demostró tener la mejor actividad promotora de la diferenciación eritroide durante los anteriores experimentos en los tiempos de 72 y 96 h.

En la figura 31 se muestra la comparación de la capacidad de RB a 30 μM con los inhibidores PALOMID 529 y PD184352 ambos usados en concentraciones de 100 μM para inducir la diferenciación eritroide en células K562 tratadas durante 72 y 96 h. Se observa que a 72 y 96 h el fármaco RB mostró diferencias significativas ($p < 0.0001$) con respecto al control (2%) con un máximo de 57.33%, corroborando lo obtenido en la figura 14. Por otra parte, el tratamiento con PALOMID 529 a 96 h presentó un 7% de células diferenciadas ($p < 0.05$). PD184352 no mostró potencial diferenciador en células K562 teñidas con bencidina al evaluarlo por microscopía óptica. Comparando los resultado obtuvimos que RB a 30 μM promovió un 50.33% más de células diferenciadas que PALOMID 529.

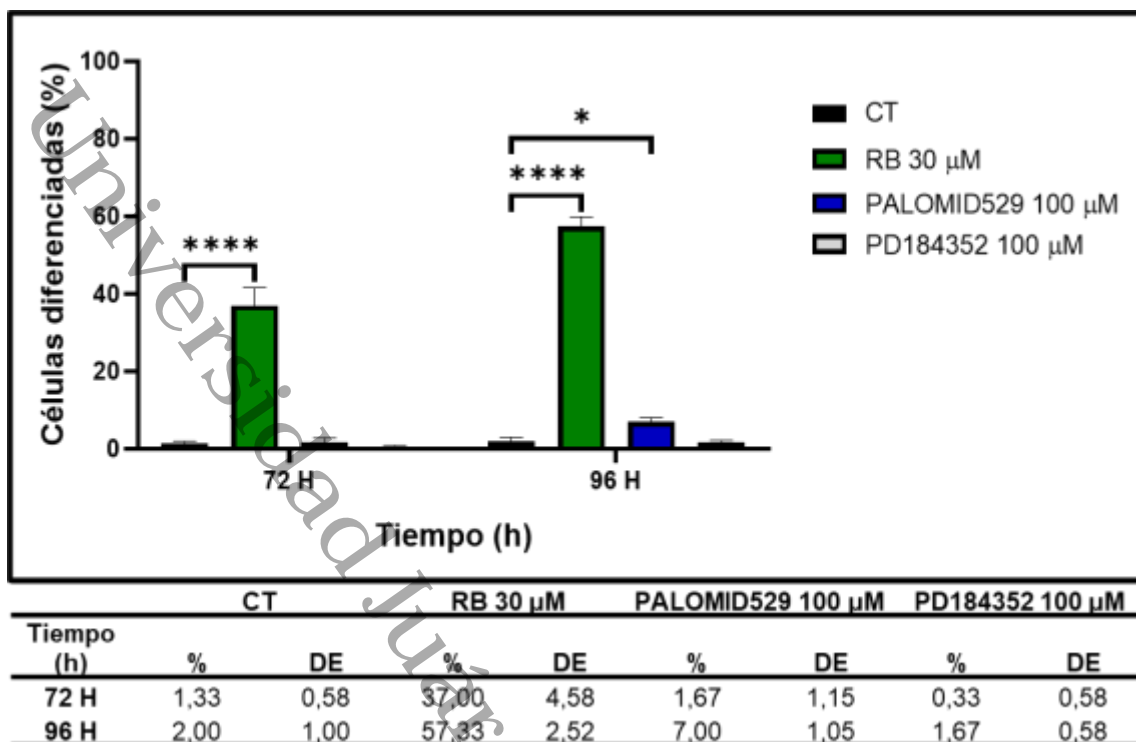


Figura 31. Determinación cualitativa de la diferenciación de células K562 por microscopia óptica con inhibidores de TORC1 y de MEK/ERK, CT: control, RB: ribavirina. ANOVA con post hoc de Tukey vs grupo CT; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$; las barras representan las medias \pm DE.

De igual manera se verificaron los datos obtenidos de las células teñidas con bencidina realizando un ensayo cuantitativo basado en la lectura de la absorbancia de la hemoglobina teñida con bencidina, donde se midió la DO de las células K562 tratadas con RB, PALOMID 529 y PD184352. En la figura 32, se muestra el comportamiento de las células durante la inducción de diferenciación. Describiendo los resultados, RB presentó un máximo en la diferenciación celular de 0.227 DO ($p < 0.0001$) a 96 h de tratamiento demostrando un comportamiento parecido al reportado en la figura 15 con un incremento dependiente del tiempo. Por otra parte, el fármaco PALOMID 529 presentó actividad diferenciadora (0.178 de DO) a 96 h de tratamiento con diferencia significativa respecto al control 0.131 DO ($p < 0.0001$), esta respuesta correlaciona con lo obtenido en la figura 31 por microscopia óptica. Por último, PD184352 registró diferenciación eritroide a 72 y 96 h con 0.177 y 0.152 de DO respectivamente, observando una reducción de la DO.

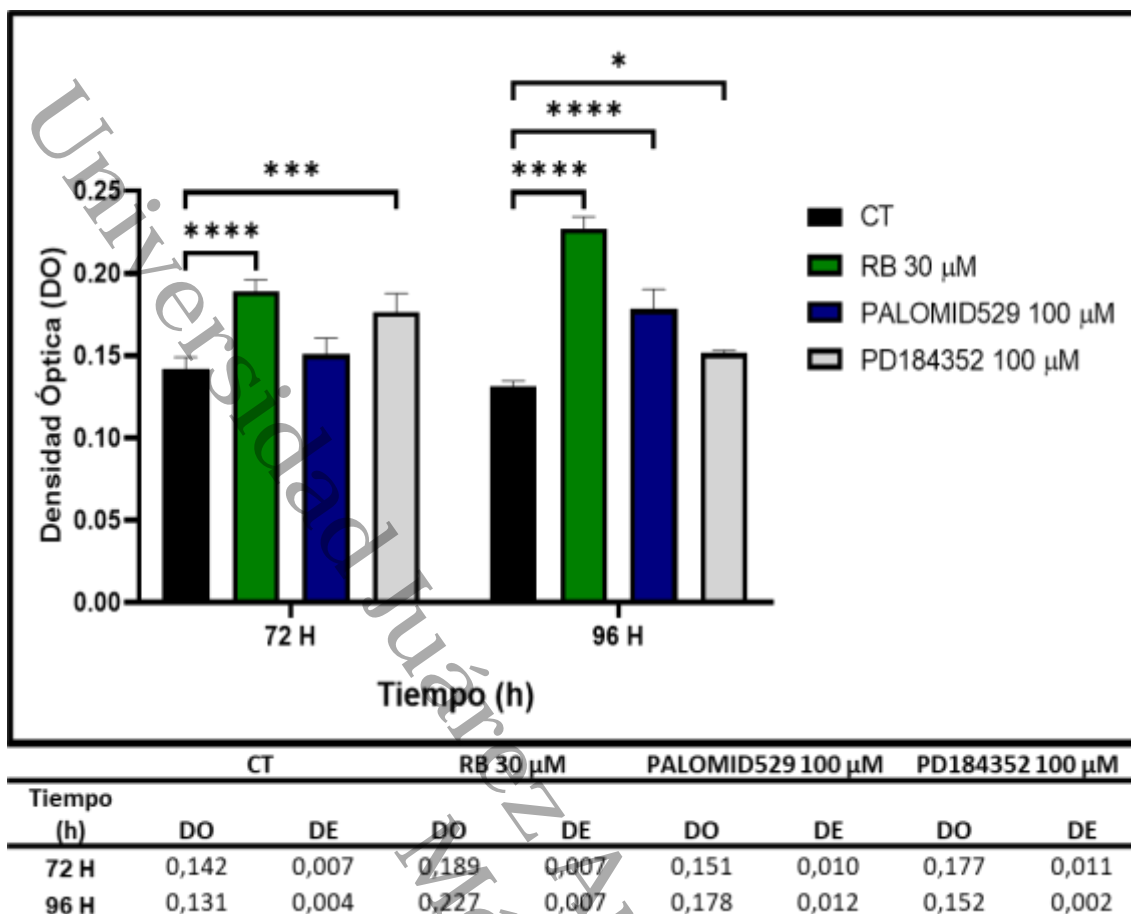


Figura 32. Determinación semicuantitativa de la diferenciación de células K562 por densidad óptica con inhibidores de TORC1 y de MEK/ERK, CT: control, RB: ribavirina. ANOVA con post hoc de Tukey vs grupo CT; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001; las barras representan las medias ± DE.

Los resultados obtenidos en las figuras 30 y 31 demuestran que los fármacos PALOMID 529 y PD184352 poseen potencial inductor de la diferenciación eritroide en concentración de 100 µM. Aunque al realizar la comparación de la actividad diferenciadora de RB contra los fármacos inhibidores PALOMID 529 y PD184352, observamos una clara diferencia donde RB en microscopia óptica presento un 50.33% más de células diferenciadas que el máximo expuesto por el fármaco PALOMID 529 (7%), de igual manera en el ensayo de DO el fármaco RB tuvo una mayor actividad diferenciadora con un máximo de 0.227 de DO lo que se traduce en 21.59% más de células diferenciadas que PALOMID 529 y PD184352 los cuales tuvieron un límite superior de diferenciación de 0.178 y 0.177 de DO respectivamente. Por último, la actividad diferenciadora de PD184352 solo fue registrada por DO lo que demuestra que el ensayo por

espectrofotometría es más sensible y preciso en la obtención de resultados que los observados por microscopia óptica (82).

Se realizó el análisis de expresión de genes implicados en la regulación de la diferenciación eritroide (KLF1, TAL1, GATA-2, FAM122 y eIF4E) con el fin de correlacionar los efectos de RB (30 μ M) con los fármacos inhibidores PALOMID 529 y PD184352 en concentraciones de 100 μ M con 72 h de tratamiento. Como se observa en la figura 33, hubo un incremento significativo de la expresión del gen de KLF-1 por parte de la RB con un aumento de 1.39 veces ($p < 0.05$) con respecto al control. De igual manera se observa que PD184352 provocó una alza de la expresión del gen KLF1 de 1.77 veces ($p < 0.01$) y finalmente el fármaco PALOMID 529 no provocó cambios significativos en la expresión del gen a 72 de tratamiento.

Como se describió anteriormente KLF1 es el encargado de realizar el cambio de la hemoglobina fetal a la adulta, suprimiendo la expresión del gen de HB-G (27). El fármaco inhibidor PD184352 a 100 μ M provocó una alza de la expresión del gen 0.38 veces mayor que RB, lo que se traduce en un 21.47% más que RB 30 μ M. Este incremento de KLF1 está relacionado con el hallazgo de células diferenciadas por espectrofotometría. Con respecto al gen TAL1, el tratamiento con PALOMID 529 en concentración de 100 μ M promovió su expresión en 0.99 veces ($p < 0.001$) y PD184352 en la aumento 9.59 veces ($p < 0.0001$) con respecto al control.

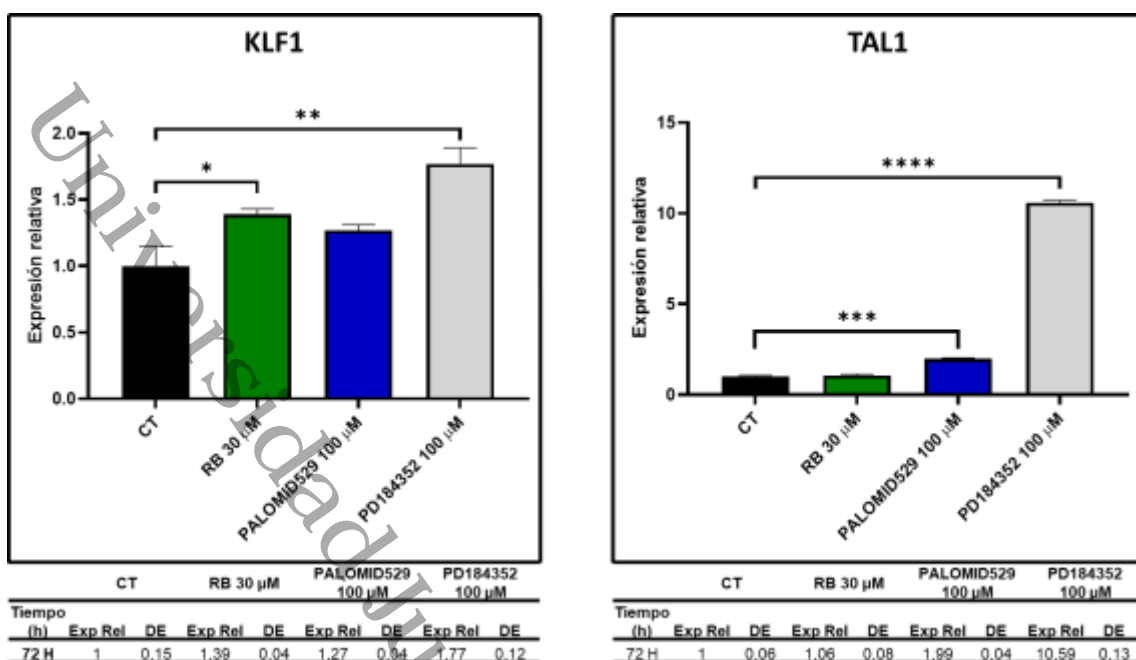


Figura 33. Expresión del gen KLF1 y TAL1, 72 h de tratamiento con inhibidores de TORC1 y de MEK/ERK, CT: control, RB: ribavirina. ANOVA con post hoc de Tukey vs grupo CT; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$; las barras representan las medias \pm DE. Los datos obtenidos representan el cambio de veces en relación con la expresión de genes diana en comparación con las células K562 no tratadas (CT).

GATA-2 es uno de los genes importantes durante la diferenciación eritroide dando paso a la expresión de GATA-1, gen que luego reduce los niveles de expresión de GATA-2, asimismo el gen FAM122 tiene la capacidad de inhibir las funciones de GATA-1 disminuyendo la capacidad de que la células puedan diferenciarse, es por ello por lo que es importante el análisis de ambos genes al utilizar los tratamientos con RB, PALOMID 529 y PD184352 que se muestran en la figura 34. Se encontró que RB a 30 μM y PD184352 a 100 μM partir de las 72 h de tratamiento, disminuyen la expresión del gen GATA-2 en 0.6 ($p < 0.0001$) y 0.85 veces ($p < 0.0001$) respectivamente. En cambio el fármaco PALOMID 529 incremento la expresión de GATA-2 en 0.37 veces ($p < 0.001$). Por otra parte el gen FAM122, solo se vio disminuido por la actividad de RB a 30 μM en 0.54 veces ($p < 0.001$), mientras que PALOMID 529 y PD184352 a 100 μM incrementaron la expresión del gen en 0.13 ($p < 0.05$) y 0.68 veces ($p < 0.0001$) respectivamente.

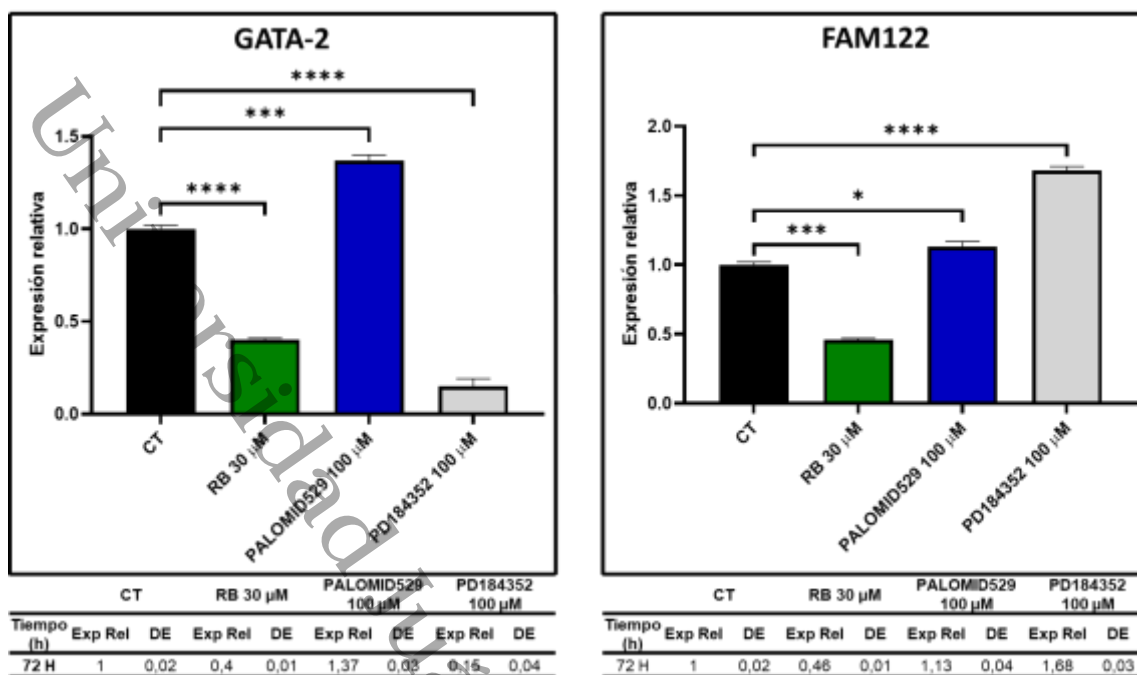


Figura 34. Expresión del gen GATA-2 y FAM122, 72 h de tratamiento con inhibidores de TORC1 y de MEK/ERK, CT: control, RB: ribavirina. ANOVA con post hoc de Tukey vs grupo CT; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$; las barras representan las medias \pm DE. Los datos obtenidos representan el cambio de veces en relación con la expresión de genes diana en comparación con las células K562 no tratadas (CT).

Por último se analizó los niveles de expresión del gen eiF4E a 72 h de tratamiento (figura 35), donde se hayo que RB a 30 μM provocó la regulación a la baja del gen en 0.7 veces ($p < 0.001$) con respecto al control, corroborando lo obtenido en la figura 28. En cambio los fármacos PALOMID 529 y PD184352 en concentración de 100 μM promovieron la expresión del gen eiF4E en 0.1 ($p < 0.05$) y 0.7 ($p < 0.0001$) veces respectivamente.

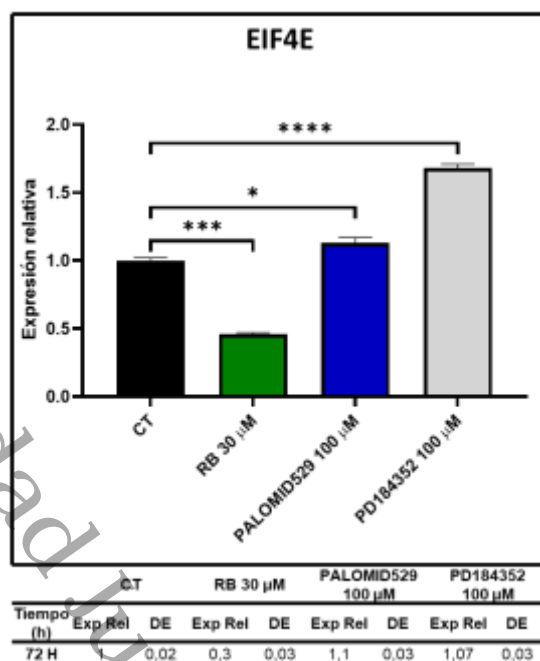


Figura 35. Expresión del gen EIF4E, 72 h de tratamiento con inhibidores de TORC1 y de MEK/ERK CT: control, RB: ribavirina. ANOVA con post hoc de Tukey vs grupo CT; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001; las barras representan las medias ± DE. Los datos obtenidos representan el cambio de veces en relación con la expresión de genes diana en comparación con las células K562 no tratadas (CT).

El análisis de la expresión de las proteínas de las células K562 expuestas a RB, PALOMID 529 y PD184352 por 72 H se muestran en la figura 36. Se observa que RB en concentración de 30 µM aumenta los niveles de HB-B, mientras que PALOMID 529 y PD184352 en concentración de 100 µM no generaron señal de la proteína. Por otro lado el análisis de la proteína GATA-1 muestra que PALOMID 529 presenta los mismos niveles de expresión que RB, al igual que la proteína TAL1, en cambio PD184352 no mostro marca de ninguna de las dos proteínas. El análisis de la proteína EIF4E revelo que RB repitió su comportamiento de la figura 29, inhibiendo la fosforilación de EIF4E, en cambio el tratamiento con PALOMID 529 no se encontraron cambios en la expresión de la proteína con respecto al control, por último PD184352 no genero señal de la proteína EIF4E y ni de su forma fosforilada.

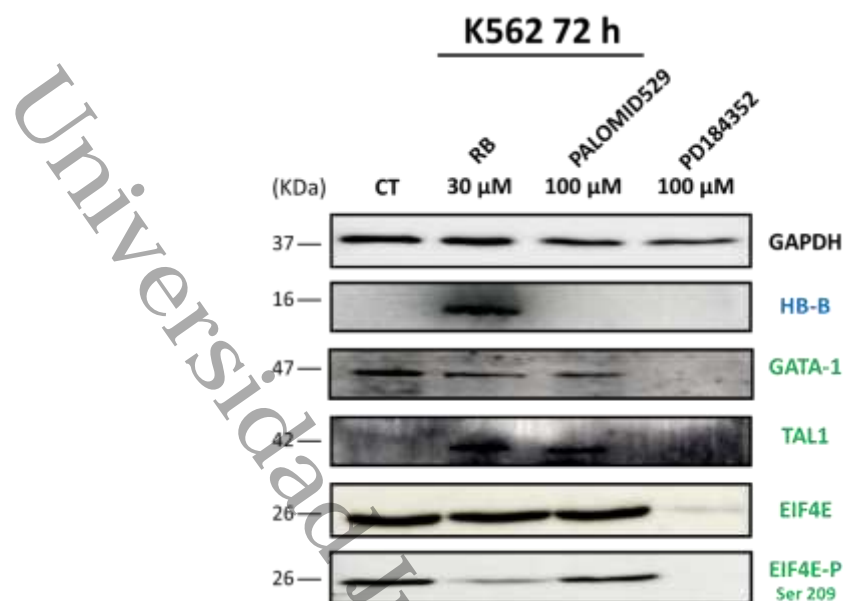


Figura 36. Niveles de expresión de proteínas a 72 h de tratamiento con ribavirina, PALOMID529 y PD184352, CT: control, RB: ribavirina.

Estos resultados demuestran que los mecanismos de diferenciación eritroide usados por RB no dependen solo de la inhibición de PI3K/AKT/mTORC y MEK/ERK, si no que dependen de la modulación de la fosforilación directa e indirecta eIF4E, regulando a la baja la expresión de genes y proteínas que inhiben la diferenciación celular, factores de crecimiento y permitiendo así la progresión sucesiva en la maduración eritroide.

8. Conclusiones

- ❖ Se demostró la capacidad de la ribavirina como inductor de la síntesis de hemoglobina y de la diferenciación eritroide en células eritroleucemicas K562 en concentraciones menores a 50 μ M.
- ❖ Se encontró que la concentración de 30 μ M de ribavirina es la óptima para promover la diferenciación eritroide y la síntesis de hemoglobina.
- ❖ El tratamiento de ribavirina sobre células eritroleucemicas K562, mostró disminución en la viabilidad celular hasta un máximo de 120 h y reducción en la progresión del ciclo celular a 72 h.
- ❖ Los niveles de expresión de genes y proteínas marcadores de diferenciación revelaron que ribavirina promueve en mayor medida la síntesis de hemoglobina fetal (2 HB-A y 2 HB-G) que la hemoglobina adulta (2 HB-A y 2 HB-B).
- ❖ Se observó que ribavirina incrementó la expresión de genes y proteínas que participan en las rutas de diferenciación eritroide (KLF1, TAL1, GATA-1) y disminuyó la expresión de los factores que la regulan de manera negativa (GATA-2, FAM122).
- ❖ Se demostró que ribavirina regula negativamente las vías MAPK / AKT modificando los niveles de fosforilación de eIF4E.
- ❖ Se sugiere que la disminución de eIF4E-P está relacionada con la progresión de la diferenciación eritroide al disminuir el transporte de factores que la regulan de manera negativa (GATA-2, FAM122).

9. Perspectivas

- ❖ Evaluar las fases del ciclo celular en un modelo de células eritroleucemicas K562 expuestas a tratamiento con ribavirina (<50 μ M) en tiempos mayores a 72 h.
- ❖ Analizar por inmunoprecipitación de ARN (RIP) la unión de la proteína EIF4E a los ARNm de factores que inhiben la diferenciación eritroide como MYC, LMO2, PU.1, GATA-2, FAM122 y AKT.
- ❖ Evaluar la unión proteína-proteína por inmunoprecipitación (IP) de EIF4E a los ARNm de factores que inhiben la diferenciación eritroide ejemplo MYC, LMO2, PU.1, GATA-2, FAM122 y AKT.
- ❖ Realizar pruebas de diferenciación de eritroide, de síntesis de hemoglobina, de expresión de genes y proteínas relacionadas a la diferenciación y sus mecanismos, utilizando muestras biológicas de pacientes que padezcan LMC.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

9. Bibliografía

1. Camaschella C, Pagani A, Nai A, Silvestri L. The mutual control of iron and erythropoiesis. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2016; 38(1): p. 20-26.
2. Dzierzak E, Philipsen S. Erythropoiesis: Development and Differentiation. *Cold spring harbor perspectives in medicine*. 2013; p. 1-16.
3. Kong XZ, Yin RH, Ning M, Zheng WW, Dong XM, Yang Y, et al. Effects of THAP11 on Erythroid Differentiation and Megakaryocytic Differentiation of K562 Cells. *PLoS ONE*. 2014; 9(3): p. e91557.
4. Jafari M, Ghadami E, Dadkhah T, Akhavan-Niaki H. PI3k/AKT signaling pathway: Erythropoiesis and beyond. *Journal of Cellular Physiology*. 2018; 243(3): p. 2373-2385.
5. Scheps K, Francipane L, Nash A, Cerrone G, Copelli S, Varela V. Bases moleculares de alfa-talasemia en la Argentina. *Medicina (Buenos Aires)*. 2015; p. 81-86.
6. Bullinger L, Döhner, Döhner H. Genomics of Acute Myeloid Leukemia Diagnosis. *Journal of Clinical Oncology*. 2017;; p. 1-13.
7. Yu-Hsuan F, Da-Liang O, Yi-Ru Y, Kuan-Wei S, Chien-Yuan C, Hwei-Fan T, et al. Cabozantinib promotes erythroid differentiation in K562 erythroleukemia cells through global changes in gene expression and JNK activation. *Cancer Gene Therapy*. 2021;(1-9).
8. Frédéric B. The Present and Future Global Burden of the Inherited Disorders of Hemoglobin. *Hematology/Oncology Clinics*. 2016; 30(2): p. 327-341.
9. García Rodríguez F, Rodríguez Lomo L, Gómez Peña Á, Martínez González O, Martínez Cabriales S, Gonzáles Llano Ó. Epidemiología mundial de las hemoglobinopatías e indicadores de los servicios correspondientes. *Revista de Hematología*. 2010; 11(3): p. 136-140.
10. Bianchi N, Ongaro F, Chiarabelli C, Gualandi L, Mischiati C, Bergamini P, et al. Novel Palladium Complex: Cytotoxicity against Cisplatin-resistant K562 Cells. *Iran J Pharm Res*. 2019; 18(3): p. 1323–1331.
11. Takano M, Higashi M, Baba S, Kawami M, Yumoto R. Transport of ribavirin in human myelogenous leukemia cell line K562. *Pharmazie*. 2020; 75(329-334).
12. Casaos J, Gorelick N, Huq S, Choi J, Xia Y, Serra R, et al. The Use of Ribavirin as an Anticancer Therapeutic: Will It Go Viral? *Molecular Cancer Therapeutics*. 2019; 18(7): p. 1185–1194.
13. Jagannathan-Bogdan M, Zon L. Hematopoiesis. *Development*. 2013; 140(12): p. 2463-2467.
14. Doulatov S, Notta F, Laurenti E, Dick J. Hematopoiesis: A Human Perspective. *Cell Stem Cell*. 2012; 10(120-136).

15. Hoffbrand V, Catovsky D. Postgrado en Hematología. Quinta ed. Oxford: Blackwell Publishing Ltd; 2014.
16. Barminko J, Reinholt B, Baron M. Development and differentiation of the erythroid lineage in mammals. *Dev Comp Immunol.* 2016; 58: p. 18-29.
17. Dulmovits BM, Hom J, Narla A, Mohandas N, Blanc L. Characterization, regulation and targeting of erythroid progenitors in normal and disordered human erythropoiesis. *Curr Opin Hematol.* 2018; 24(3): p. 159-166.
18. Nandakumar SK, Ulirsch JC, Sankaran VG. Advances in understanding erythropoiesis: evolving perspectives. *British Journal of haematology.* 2016; 173(2): p. 206-218.
19. Siatecka M, Bieker J. The multifunctional role of EKLF/KLF1 during erythropoiesis. *Blood.* 2011; 118(8): p. 2044-2054.
20. Binder S, Luciano M, Horejs-Hoec J. La red de citoquinas en la leucemia mieloide aguda (LMA): un enfoque en los mediadores pro y antiinflamatorios. *Reseñas de citoquinas y factores de crecimiento.* 2018; 43: p. 8-15.
21. Vittori D, Chamorro ME, Nesse A. Eritropoyetina como agente eritropoyético y no eritropoyético: consideraciones terapéuticas. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana.* 2016; 50(4): p. 773-782.
22. Wang L, Di L, Tom Noguchi C. Erythropoietin, a novel versatile player regulating energy metabolism beyond the erythroid system. *International Journal of Biological Sciences.* 2014; 10(8): p. 921-939.
23. Weinberg M. RES-529: a PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitor that dissociates the mTORC1 and mTORC2 complexes. *Anticancer Drugs.* 2016; 27(6): p. 475-487.
24. Perreault A, Venters B. Integrative view on how erythropoietin signaling controls transcription patterns in erythroid cells. *Curr Opin Hemato.* 2018; 25(3): p. 189-195.
25. Guo Y, Pan W, Liu S, Shen Z, Xu Y, Hu L. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis (Review). *Experimental.* 2020; 19(3): p. 1997-2007.
26. Hattangadi SM, Wong P, Zhang L, Flygare J, Lodish H. From stem cell to red cell: regulation of erythropoiesis at multiple levels by multiple proteins, RNAs, and chromatin modifications. *Blood.* 2011; 118(24): p. 6258-6268.
27. Varricchio L, Dell'Aversana C, Nebbioso A, Migliaccio G, Altucci L, Mai A, et al. Identification of NuRSERY, a New Functional HDAC Complex Composed by HDAC5, GATA1, EKLF and pERK Present in Human Erythroid Cells. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2015; 50: p. 112-122.
28. Gothwal M, Wehrle J, Aumann K, Zimmermann V, Grunder A, Pahl H. A novel role for nuclear factor-erythroid 2 in erythroid maturation by modulation of mitochondrial autophagy. *Haematologica.* 2016; 101(9): p. 1054-1064.

29. Vassen L, Beauchemin H, Lemsaddek W, Krongold J, Trudel M, Moroy T. Growth Factor Independence 1b (Gfi1b) Is Important for the Maturation of Erythroid Cells and the Regulation of Embryonic Globin Expression. *PLOS ONE*. 2014; 9(5).
30. Guo X, Bazinet JP, Krivega I, Dale R, Dean A. Embryonic erythropoiesis and hemoglobin switching require transcriptional repressor ETO2 to modulate chromatin organization. *Nucleic Acids Res*. 2020; 48(18): p. 10226-10240.
31. Papadopoulos P, Gutiérrez L, Demmers J, Scheer E, Pourfarzad F, Papageorgiou D, et al. TAF10 Interacts with the GATA1 Transcription Factor and Controls Mouse Erythropoiesis. *Molecular and Cellular Biology*. 2015; 35(12): p. 2103-2118.
32. Bianchi E, Zini R, Salati S, Tenedini E, Norfo R, Tagliafico E, et al. c-myb supports erythropoiesis through the transactivation of KLF1 and LMO2 expression. *Blood*. 2010; 116(22): p. 99-110.
33. Woo A, Patry C, Ghamari A, Pregerning G, Yuan D, Zheng K, et al. Zfp281 (ZBP-99) juega un papel funcionalmente redundante con Zfp148 (ZBP-89) durante el desarrollo eritroide. *Blood*. 2019 Agosto; 3(16): p. 2499–2511.
34. Forester C, Woo Byeon G, Osés Prieto J, Barna M, Ruggero D. Regulation of eIF4E Guides a Unique Translational Program to Steer Erythroid Maturation. *Blood*. 2019; 134(1).
35. Bruchova Votavova H, Hoon Yoon D, Prchal J. miR-451 enhances erythroid differentiation in K562 cells. *Leukemia y Lymphoma*. 2010; 51(4): p. 686-693.
36. Sun Z, Wang Y, Han X, Zhao X, Peng Y, Li Y, et al. miR-150 inhibits terminal erythroid proliferation and differentiation. *Oncotarget*. 2015; 6(40): p. 43033–43047.
37. Valent P, Busche G, Theurl I, Uras I, Germing U. Normal and pathological erythropoiesis in adults: from gene regulation to targeted treatment concepts. *Haematologica*. 2018; 103(10): p. 1593–1603.
38. Ezomo O, Takahashi K, Horie Y, Mustak M, Meshitsuka S. Circular Dichroism Studies on C-terminal Zinc Finger Domain. *Yonago Acta médica*. 2010; 53: p. 25-28.
39. Han C, Vinayachandran V, Bataille A, Park B, Chan-Salis KY, Keller C, et al. Genome-Wide Organization of GATA1 and TAL1 Determined at High Resolution. *Molecular and Cellular Biology*. 2016; 36(1): p. 157-172.
40. Kaneko H, Shimizu R, Yamamoto M. GATA factor switching during erythroid differentiation. *Current Opinion in Hematology*. 2010 Mayo; 17(3): p. 163-168.

41. Fujiwara T. GATA Transcription Factors: Basic Principles and Related Human Disorders. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*. 2017; 242(2): p. 83-91.
42. Moriguchi T, Yamamoto M. A regulatory network governing Gata1 and Gata2 gene transcription orchestrates erythroid lineage differentiation. *International Journal of Hematology*. 2014; 100(5): p. 417-424.
43. Gutiérrez L, Caballero N, Fernández-Calleja L, Karkouila E. Regulation of GATA1 levels in erythropoiesis. *IUBMB Life*. 2019; 72(1): p. 89-105.
44. Li Y, Deng C, Hu X, Qiu Y, Marca M, Zhao K, et al. Dynamic interaction between TAL1 oncoprotein and LSD1 regulates TAL1 function in hematopoiesis and leukemogenesis. *Oncogén*. 2012; 31(48): p. 5007-5018.
45. Doré L, Crispino J. Transcription factor networks in erythroid cell and megakaryocyte development. *Blood*. 2011; 118(2): p. 231-239.
46. Tallack M, Perkins A. KLF1 directly coordinates almost all aspects of terminal erythroid differentiation. *IUBMB Life*. 2010; 62(12): p. 886-890.
47. Danieial P, Hess R, Lees J. E2f4 and E2f5 are essential for the development of the male reproductive system. *Cell cycle*. 2015; 15(2): p. 250-260.
48. Reynoso-Noverón N, Torres-Domínguez JA. Epidemiología del cáncer en México: carga global y proyecciones 2000-2020. *Revista Latinoamericana de Medicina Conductual*. 2018; 8(1): p. 9-15.
49. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram, Mathers C. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International Journal of Cancer*. 2018; 144(8): p. 1941-1953.
50. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. [Online].; 2018 [cited 2021 Marzo 25]. Available from: https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2018/cancer2018_nal.pdf.
51. García Rodríguez F, Rodríguez Romo LN, Gómez Peña Á, Martínez González O, Martínez Cabriales SA, González Llano Ó. Anemias hemolíticas hereditarias desde la perspectiva de un laboratorio de referencia del Norte de México. *Revista de Hematología*. 2010; 11(3): p. 136-140.
52. Akinsheye I, Alsultan A, Solovieff N, Ngo D, Baldwin C, Sebastiani P, et al. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. *Blood*. 2011; 118(1): p. 19-27.
53. Angastiniotis M, Lobitz S. Thalassemias: An Overview. *International Journal of Neonatal Screening*. 2019; 5(1): p. 16.
54. Bajwa H, Basit H. Thalassemia. *StatPearls*. 2022.
55. Weatherall D. The Evolving Spectrum of the Epidemiology of Thalassemia. *Hematology/Oncology Clinics*. 2018; 32(2): p. 165-175.

56. Carvajal Alzate M. Beta-Talasemia: Un mundo de complicaciones con nuevas alternativas de tratamiento. *Archivos de Medicina*. 2019; 19(1): p. 148-159.
57. Carson J, Guyatt G, Heddle N. Red Blood Cell Transfusion Thresholds and Storage. *JAMA*. 2016; 316(19): p. 2025-2035.
58. Forrellat Barrios M, Fernández Delgado N, Hernández Ramírez P. Regulación de la hepcidina y homeostasis del hierro: avances y perspectivas. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*. 2012; 28(4).
59. López Santiago N. Terapia de quelación del hierro. *Asociación Mexicana de Medicina Transfusional*. 2010; 3(1): p. 80-86.
60. Floreán C, Schnekenburger M, Granjenette C, Dicado M, Diederich M. Epigenómica de la leucemia: de los mecanismos a las aplicaciones terapéuticas. *Epigenómica*. 2011; 3(5).
61. Gocek E, Marcinkowska E. Differentiation Therapy of Acute Myeloid Leukemia. *Cancers*. 2011;(3):p. 2402-2420.
62. Gómez Almaguer D, Tarín Arzaga LdC. Tratamiento de la leucemia mieloide crónica en fase crónica: una perspectiva mexicana. *Hematología*. 2011;(12): p. 267-275.
63. Morales C, Torres Cárdenas V, Esteban Valencia J, Ribón G. Leucemia mieloide crónica: diagnóstico y tratamiento. *CES Med*. 2010; 1(24): p. 97-108.
64. Jagannathan-Bogdan M, Zon L. Hematopoiesis. *DEVELOPMENT AT A GLANCE*. 2013; 140(12): p. 2463–2467.
65. Instituto Nacional del Cáncer. cromosoma Filadelfia. [Online]. [cited 2023 octubre 10]. Available from: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/cromosoma-filadelfia>.
66. Mattiuzzi C, Lippi G. Current Cancer Epidemiology. *Epidemiol Glob Health*. 2019; 9(4): p. 217–222.
67. Kasemi-Sefat G, Keramatipour M, Vaezi M, Razavi S. Integrated genomic sequencing in myeloid blast crisis chronic myeloid leukemia (MBC-CML), identified potentially important findings in the context of leukemogenesis model. *Nature*. 2022; 12(12816).
68. Meza Espinoza JP, González García JR, Contreras Gutiérrez J, Picos Cárdenas VJ. Leucemia mieloide crónica: Un artículo de divulgación científica. *Revista Médica de la UAS*. 2022; 12(3): p. 257-271.
69. Leyto-Cruz F. Leucemia mieloide aguda. *Rev Hematol Mex*. 2018; 19(1): p. 24-40.

70. Carrà G, Torti D, Crivellaro S, Panuzzo C. The BCR-ABL/NF- κ B signal transduction network: a long lasting relationship in Philadelphia positive Leukemias. *Oncotarget*. 2016; 7(40): p. 66287–66298.
71. Ávila Cabrera O, Espinosa Estrada E, Espinosa Martínez E, Hernández Padrón C, Ramón Rodríguez L, Izquierdo Cano L, et al. Reacciones adversas del imatinib como droga de segunda línea en pacientes con leucemia mieloide crónica. *Cubana Hematol Inmunol Hemoter*. 2010; 26(1): p. 223-227.
72. Sequencing Treatment in Chronic Myeloid Leukemia: The First Choice May Be the Hardest. *Clinical Advances in Hematology and Oncology*. 2014; 12(8): p. 502-508.
73. An X, Tiwari A, Sun Y, Rong Ding P, Ashby C, Sheng Chen Z. BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors in the treatment of Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia: a review. *Leukemia Research*. 2010; 34(10): p. 1255-1268.
74. Yoon J, Yhim H, Kwak J, Anh J, Yang D, Lee J, et al. Minimal residual disease-based effect and long-term outcome of first-line dasatinib combined with chemotherapy for adult Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Annals of Oncology*. 2016; 27(6): p. 1081-1088.
75. Díaz C, Zapata C. Respuesta molecular profunda con ponatinib en leucemia mieloide crónica en fase crónica con resistencia a imatinib y dasatinib: Reporte de caso y revisión de la literatura. *Revista Médica Herediana*. 2022; 33(2): p. 133-138.
76. Stadhouders R, Thongjuea S, Andrieu-Soler C, Palstra R, Bryne JC, Van den Heuvel A, et al. Dynamic long-range chromatin interactions control Myb proto-oncogene transcription during erythroid development. *The EMBO Journal*. 2012; 31: p. 986-999.
77. Vujovic M, Dudazy-Gralla S, Hård J. Thyroid hormone drives the expression of mouse carbonic anhydrase Car4 in kidney, lung and brain. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2015; 416: p. 19-26.
78. Chen J, Zhou Q, Liu MH, Yang YS, Wang YQ, Huang Y, et al. FAM122A Inhibits Erythroid Differentiation through GATA1. *Stem Cell Reports*. 2020; p. 721-734.
79. Alenad A, Al-Jaber, Krishnaswamy S, Yakout S, Alokail M. Achillea fragrantissima extract exerts its anticancer effect via induction of differentiation, cell cycle arrest and apoptosis in chronic myeloid leukemia (CML) cell line K562. *Medicinal Plants Research*. 2013; 7(21): p. 1561-1567.
80. Loustaud-Ratti V, Debette-Gratien M, Jacques J, Alain S, Marquet P, Sautereau D, et al. Ribavirin: Past, present and future. *World J Hepatol*. 2016; 8(2): p. 123–130.

81. Borden K, Culjkovic-Kraljacic B. Ribavirin as an anti-cancer therapy: acute myeloid leukemia and beyond? *Leukemia & Lymphoma*. 2010; 51(10): p. 1805-1815.
82. Laleh S, Modares M, Khanahmad H, Hejazi Z, Tabatabaiefar MA, Salehi M, et al. Comparison of different methods for erythroid differentiation in the K562 cell line. *Biotechnol Lett*. 2016; 38(8): p. 1243–1250.
83. Assouline S, Culjkovic-Kraljacic B, Bergeron J, Caplan S, Cocolakis E, Lambert C, et al. A phase I trial of ribavirin and low-dose cytarabine for the treatment of relapsed and refractory acute myeloid leukemia with elevated eIF4E. *Haematologica*. 2015; 100(1): p. e7–e9.
84. Mazewski C, Plataniias L. A novel approach to overcome drug resistance in acute myeloid leukemia. *haematologica*. 2023;: p. 1-4.
85. Martínez Silva AV, Dinkova TD. Mecanismos de regulación traduccional mediados por el factor de inicio 4E: las dos caras de la moneda. *Educación Bioquímica*. 2010; p. 82-91.
86. Volpon L, Osborne M, Zahreddine H, Romeo A, Borden K. Conformational changes induced in the eukaryotic translation initiation factor eIF4E by a clinically relevant inhibitor, ribavirin triphosphate. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013; 434(3): p. 614-619.
87. Jin J, Xiang W, Wu S, Wang M, Xiao M, Ali D. Targeting eIF4E signaling with ribavirin as a sensitizing strategy for ovarian cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2019; 510(4): p. 580-586.
88. De la Cruz-Hernandez N, Medina-Franco JL, Trujillo J, Chavez-Blanco A, Dominguez-Gomez G, Perez-Cardenas E, et al. Ribavirin as a tri-targeted antitumor repositioned drug. *Oncology Reports*. 2015; 33(5): p. 2384-2392.
89. Isakovic A, Dulovic M, Markovic I, Kravic-Stevovic T, Bumbasirevic V, Trajkovic V, et al. Autophagy suppression sensitizes glioma cells to IMP dehydrogenase inhibition-induced apoptotic death. *Experimental Cell Research*. 2017; 350(1): p. 32-40.
90. Shi F, Len Y, Gong Y, Shi R, Yang X, Naren D, et al. Ribavirin Inhibits the Activity of mTOR/eIF4E, ERK/Mnk1/eIF4E Signaling Pathway and Synergizes with Tyrosine Kinase Inhibitor Imatinib to Impair Bcr-Abl Mediated Proliferation and Apoptosis in Ph+ Leukemia. *PLOS ONE*. 2015; 10(8).
91. Wei C, GE X, WANG Y, LI X. MEK inhibitor CI-1040 induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells in vitro. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2016; 20: p. 1961-1968.
92. Dey P. Nuclei Acid Dye and DNA Content Measurement in Flow Cytometry. *Diagnostic Flow Cytometry in Cytology*. 2021; p. 75-82.

93. Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X. An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath*. 2013; 3(3): p. 71–85.
94. García Gaipo L, Wiesinger A, León J. Effects of the transcriptional regulator CTCF in the control of erythroid cell differentiation. *Ciencia en abierto*. 2018.
95. Ellinger J, Lewis I, Markley J. Role of aminotransferases in glutamate metabolism of human erythrocytes. *Journal of Biomolecular NMR*. 2011; 49: p. 221–229.
96. Kosenko E, Tikhonova L, Montoliu C, Barreto G, Aliev G, Kaminsky Y. Metabolic Abnormalities of Erythrocytes as a Risk Factor for Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neuroscience*. 2018; 11(728): p. 1-17.
97. Naffouje R, Grover P, Yu H, Sendilnathan A, Wolfe K, Majd N, et al. Anti-Tumor Potential of IMP Dehydrogenase Inhibitors: A Century-Long Story. *Cancers*. 2019; 11(9): p. 1346.
98. Suo-fu Y, Yang Y, Wu L, Wei-Wei M, Hui-Hui Z. Ethaselen: a novel organoselenium anticancer agent targeting thioredoxin reductase 1 reverses cisplatin resistance in drug-resistant K562 cells by inducing apoptosis*. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2017; 18(5): p. 373–382.
99. Bernal-Barquero CE, Vázquez Zapién GJ, Mata Miranda MM. Revisión de las alteraciones en la expresión génica y vías apoptóticas provocadas en la nefrotoxicidad inducida por cisplatino. *Nefrología*. 2019; 39(4): p. 339-454.
100. Gonzales V, Fuertes M, Alonso C, Perez J. Is Cisplatin-Induced Cell Death Always Produced by Apoptosis? *Molecular Pharmacology*. 2001; 59(4): p. 657-663.
101. Shariati L, Khanahmad H, Salehi M, Zahra H, Rahimmanesh I, Tabatabaiefar MA, et al. Genetic disruption of the KLF1 gene to overexpress the γ -globin gene using the CRISPR/Cas9 system. *Wiley*. 2016; 18(294-301).
102. Musallam K, Taher A, Domenica Cappellini M, Sankaran V. Clinical experience with fetal hemoglobin induction therapy in patients with β -thalassemia. *Blood*. 2013; 21(121): p. 2199-2212.
103. Bauer D, Orkin S. Hemoglobin switching's surprise: the versatile transcription factor BCL11A is a master repressor of fetal hemoglobin. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2015; 33: p. 62-70.
104. Yen JH. Nobiletin Promotes Megakaryocytic Differentiation through the MAPK/ERK-Dependent EGR1 Expression and Exerts Anti-Leukemic Effects in Human Chronic Myeloid Leukemia (CML) K562 Cells. *Cells*. 2020; 9(4): p. 877.
105. Jayapal SR, Lee KL, Ji P, Kaldis P, Lim B, Lodish H. Down-regulation of Myc Is Essential for Terminal Erythroid Maturation. *Journal of Biological Chemistry*. 2010; 285(51): p. 40252-40265.

106. Liu G, Dean A. Enhancer long-range contacts: The multi-adaptor protein LDB1 is the tie that binds. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*. 2019; 1862(6): p. 625-633.

107. Burda P, Laslo P, Stopka T. The role of PU.1 and GATA-1 transcription factors during normal and leukemogenic hematopoiesis. *Leukemia*. 2010; 24(7): p. 1249–1257.

108. Ferguson K, Torr E, Bernau K, Leet J, Sherris D, Sandbo N. The Novel mTOR Complex 1/2 Inhibitor P529 Inhibits Human Lung Myofibroblast Differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2017; 118(8): p. 2241-2249.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

Luis Eduardo Avalos Priego.pdf

 Universidad Juárez Autónoma de Tabasco

Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid:::3117:579938435

Fecha de entrega

17 abr 2026, 3:56 p.m. GMT-6

Fecha de descarga

17 abr 2026, 4:44 p.m. GMT-6

Nombre del archivo

Luis Eduardo Avalos Priego.pdf

Tamaño del archivo

1.6 MB

107 páginas

23.652 palabras

156.160 caracteres




12% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

Filtrado desde el informe



- ▶ Bibliografía
- ▶ Texto citado
- ▶ Coincidencias menores (menos de 15 palabras)
- ▶ Abstract

Fuentes principales

- 12%  Fuentes de Internet
- 1%  Publicaciones
- 0%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad




N.º de alertas de integridad para revisión

-  **Caracteres reemplazados**
422 caracteres sospechosos en N.º de páginas
Las letras son intercambiadas por caracteres similares de otro alfabeto.
-  **Texto oculto**
207 caracteres sospechosos en N.º de páginas
El texto es alterado para mezclarse con el fondo blanco del documento.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.

Fuentes principales

- 12%  Fuentes de Internet
- 1%  Publicaciones
- 0%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Fuentes principales

Las fuentes con el mayor número de coincidencias dentro de la entrega. Las fuentes superpuestas no se mostrarán.

1	Internet	repositorio.unican.es	5%
2	Internet	eprints.uanl.mx	3%
3	Internet	repository.javeriana.edu.co	<1%
4	Internet	docplayer.es	<1%
5	Internet	www.redalyc.org	<1%
6	Internet	www.scielo.org.ar	<1%
7	Internet	docshare.tips	<1%
8	Internet	ri.ujat.mx	<1%
9	Internet	www.amlcc.org	<1%
10	Internet	doczz.es	<1%
11	Internet	www.revistaecos.net	<1%

12	Internet	hospital.uas.edu.mx	<1%
13	Internet	www.medigraphic.com	<1%
14	Internet	repositorio.unsa.edu.pe	<1%
15	Internet	patents.google.com	<1%
16	Internet	patentae.com	<1%
17	Internet	sitioisraelh.blogspot.com	<1%
18	Internet	www.coursehero.com	<1%
19	Internet	docplayer.com.br	<1%
20	Internet	repositorio.udec.cl	<1%
21	Publicación	Tania Soledad Licona Rivera, Julia María Gámez Alvarado, José Raúl Arita Chávez, ...	<1%
22	Internet	revistas.unal.edu.co	<1%