

Universidad Nacional de Colombia

PKC en un microambiente leucémico con células *stem* mesenquimales: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la protección ante agentes quimioterapéuticos en células de pacientes con Leucemia Linfoide Aguda de precursores B.

Paola Fernanda Ruiz Aparicio, B.Sc.

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina
Departamento de Ciencias Fisiológicas
Bogotá D.C.
2020

PKC en un microambiente leucémico con células *stem* mesenquimales: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la protección ante agentes quimioterapéuticos en células de pacientes con Leucemia Linfocítica Aguda de precursores B.

Paola Fernanda Ruiz Aparicio, B.Sc.

Tesis presentada como requisito parcial para optar por el título:

Magister en Bioquímica

Director

Jean Paul Vernot, Ph.D.

Grupo de Investigación
Fisiología Celular y Molecular

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina
Departamento de Ciencias Fisiológicas
Bogotá D.C.
2020

Agradecimientos

A mis padres y mi hermano, por apostarle a mis sueños convirtiéndolos en los suyos, entregándome desde mi primera formación en el hogar las herramientas más difíciles de aprender: el carácter, la tenacidad, la disciplina, la perseverancia, el cariño por el trabajo. Gracias por confiar siempre, ser el apoyo y el ánimo incondicional desde el primer momento, por acompañarme en cada paso mientras nos damos cuenta que el tiempo vuela, gracias por estar todo el tiempo muy cerca de corazón en la distancia.

Al profesor Vernot, por su ayuda, su guía, sus correcciones, su ejemplo invaluable. Por haber sembrado en mi la inquietud y la curiosidad del conocimiento en un área fascinante, haberme permitido coincidir en su laboratorio, abrirme un espacio ahí y haber hecho de estos años una experiencia enriquecedora con un balance siempre positivo.

A mis compañeros de laboratorio, los de ahora y los de antes, por hacer agradable el tiempo en el lugar que se convirtió en un segundo hogar, por enseñarme y colaborar conmigo siempre que lo necesité.

A mis amigos de toda la vida, que sin entender completamente lo que hacía, se alegraban de mis logros como si fuesen propios.

A todos los que han seguido mi proceso de formación personal y profesional, personas que llegan y se van, no sin antes haber aportado en alguna medida a ese crecimiento.

A la Universidad Nacional y la Facultad de Medicina. Este trabajo fue financiado con recursos del Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación (COLCIENCIAS) (Contrato 58257), y por la División de Investigación y Extensión (Proyecto 40181)

Resumen

El tratamiento de pacientes con Leucemia Linfocítica Aguda (ALL) ha logrado unos porcentajes elevados y significativos de remisión completa. Sin embargo, un grupo reducido de pacientes recae, debido en parte a la presencia de células leucémicas residuales que escapan a la terapia. Las células madre mesenquimales (MSC) son importantes no sólo como soporte funcional para las células madre hematopoyéticas (HSC) sino también como un factor que promueve la supervivencia de las células leucémicas y el desarrollo de la enfermedad. La interacción entre las MSC y las células leucémicas desencadena la activación de diferentes vías de señalización, lo que lleva a la remodelación del denominado “nicho leucémico” y la supervivencia de las células leucémicas. La proteína quinasa C (PKC) es un factor importante que media el soporte de las MSC. Aquí se estudió el papel de PKC en un modelo *in vitro* de nicho leucémico, utilizando MSC de individuos sanos y células leucémicas de pacientes pediátricos con ALL-B (n = 22). Se empleó el péptido quimérico HKPS, como estrategia para inhibir la PKC tanto en las células ALL-B como en las MSC. En primer lugar, se determinó mediante ensayos con MTT una reducción en la viabilidad de las células ALL-B después de 2 h de tratamiento con 40 μ M de HKPS; 7 de 22 muestras mostraron una mayor susceptibilidad al tratamiento con HKPS (casi un 50% de inhibición); 7 pacientes no fueron susceptibles a HKPS mientras que 8 pacientes mostraron una respuesta intermedia. En los co-cultivos se determinó que el pretratamiento de las MSC con HKPS no afectó significativamente la viabilidad de las MSC, pero abolió el efecto protector de las MSC en ALL-B. Se estableció que las interacciones célula a célula son esenciales para la viabilidad de las células de ALL-B. El tratamiento con Enzastaurina, un inhibidor comercial de PKC, redujo la adhesión celular; sin embargo, esta función se vio más afectada después del tratamiento con HKPS. Se encontró que ICAM-1 y VLA-5, moléculas que se sobreexpresaron en las MSC después del co-cultivo, fueron reguladas negativamente por HKPS, lo que explica la pérdida de adhesión de las células ALL-B y la pérdida de viabilidad. Además, se observaron cambios en la activación de las vías de señalización de FAK y AKT cuando las MSC fueron pretratadas con HKPS. Curiosamente, HKPS indujo la regulación negativa de las vías ERK y NF- κ B que se activaron en respuesta a la quimioterapia. La inhibición de PKC en el soporte de MSC aumentó la susceptibilidad de las células leucémicas al tratamiento con Dexametasona, Vincristina y Metotrexate. HKPS también inhibió la actividad de aldehído deshidrogenasa en las MSC e indirectamente indujo un aumento en la actividad de los principales transportadores de fármacos de la familia ABC. Estos resultados demuestran la importancia de la comunicación intercelular en el nicho leucémico y el papel de la PKC en el soporte leucémico. El uso del péptido quimérico HKPS podría ser una nueva estrategia para aumentar la susceptibilidad a la terapia al afectar directamente la viabilidad de las células ALL-B y alterar las señales pro-supervivencia que a estas les confieren las MSC.

Abstract

The treatment of patients with Acute Lymphoid Leukemia (ALL) has achieved significant high percentages of complete remission. However, a low percentage of patients relapses, due in part to the presence of residual leukemic cells that escape therapy. Mesenchymal *stem* cells (MSCs) have been described not only as a functional support for hematopoietic *stem* cells (HSC) but also as a promoting factor for leukemic cell survival and development of the disease. The interaction between MSC and leukemia cells triggers the activation of different signaling pathways, leading to remodeling of the so-called leukemic niche and survival of leukemic cells. Protein kinase C (PKC) has been described as an important factor in this MSC support. Here, we have studied the role of PKC in an *in vitro* leukemic niche model using MSC from healthy individuals and leukemic cells from pediatric ALL-B patients (n=22). A chimeric HKPS peptide, previously described, was employed as a strategy to inhibit PKC in both ALL-B cells and MSC. First, a reduction in the viability of ALL-B cells after 2 h of treatment with 40 μ M of HKPS was determined by the MTT assay; 7 out of 22 samples showed an increased susceptibility to HKPS treatment (almost 50% inhibition); 7 patients were not susceptible to HKPS while 8 patients showed an intermediate response. In the co-culture system, we determined by flow cytometry that the pre-treatment of the MSC with HKPS did not significantly affect MSC viability, but it abolished the protective effect of MSC on ALL-B. We have established that cell-to-cell interactions are essential for ALL-B viability. The treatment with Enzastaurin, a commercial PKC inhibitor, reduced cell adhesion, but this function was more affected after the treatment with HKPS. It was found that ICAM-1 and VLA-5, molecules that were over-expressed in MSC after the co-culture, were down regulated by HKPS, explaining the loss of ALL-B cells adhesion. Furthermore, we have observed changes in the activation of FAK and AKT signaling pathways when MSC were pre-treated with HKPS. Interestingly, HKPS induced the down regulation of ERK and NF- κ B pathways that were activated in response to chemotherapy. Inhibition of PKC in the MSC support increased the susceptibility of leukemic cells to treatment with Dexamethasone, Vincristine and Methotrexate. HKPS was also able to abolish the aldehyde dehydrogenase activity of MSC and indirectly to promote an increase in the activity of the main drug ABC transporters. Together, these results demonstrate the importance of intercellular communication in the leukemic niche and the role of PKC in leukemic support. We suggest that the use of the chimeric HKPS peptide could be a novel strategy for increasing susceptibility to therapy by directly affecting the viability of ALL-B cells and altering the pro-survival signals conferred to them by MSC.

Contenido

| | Página |
|--|-----------|
| Resumen | IV |
| Abstract | V |
| 1. Marco Teórico | 1 |
| 1.1. <u>Leucemia linfocítica aguda</u> | 1 |
| 1.1.1. Regímenes de Tratamiento para ALL-B | 1 |
| 1.1.2. Recaída y Enfermedad mínima residual | 2 |
| 1.2. <u>Microambiente o Nicho leucémico</u> | 4 |
| 1.2.1. Papel de las MSC en quimiorresistencia | 5 |
| 1.2.2. Mecanismos de quimiorresistencia | 7 |
| 1.2.3. Moléculas de adhesión y resistencia | 8 |
| 1.3. <u>Proteína Quinasa C (PKC)</u> | 11 |
| 1.3.1. Bioquímica | 11 |
| 1.3.2. PKC clásicas y cáncer | 11 |
| 1.3.3. PKC y resistencia a la quimioterapia | 12 |
| 1.3.4. Estrategias de Inhibición | 14 |
| 2. Planteamiento del problema | 17 |
| 3. Objetivos e Hipótesis | 18 |
| 4. Materiales y Métodos | 19 |
| 5. Resultados | 27 |
| 5.1. HKPS y la citotoxicidad diferencial en blastos de pacientes con ALL-B | 27 |
| 5.2. La inhibición de PKC con HKPS en las MSC y la viabilidad de las células ALL-B | 31 |
| 5.3. HKPS y su selectividad por las células ALL-B | 32 |
| 5.4. La interacción directa de MSC/ALL-B y el mantenimiento de la supervivencia | 33 |
| 5.5. Influencia de PKC en la adhesión funcional | 36 |
| 5.6. HKPS y la desregulación de moléculas de adhesión | 37 |
| 5.7. Rutas de señalización activadas por el contacto MSC/ALL-B | 40 |
| 5.8. Inhibición de PKC y la sensibilidad a la quimioterapia | 45 |
| 5.9. HKPS y la actividad ALDH en MSC | 49 |
| 5.10. Señalización en respuesta a la quimioterapia | 50 |

| | |
|---|-----------|
| 5.11. HKPS y la actividad de los transportadores ABC en células ALL-B | 55 |
| 6. Discusión | 59 |
| 7. Conclusiones | 65 |
| 8. Perspectivas | 66 |
| 9. Anexos | 67 |
| 10. Bibliografía | 73 |

Lista de Abreviaturas

| | |
|---------------|---|
| MSC | Célula <i>stem</i> mesenquimal |
| HSC | Célula <i>stem</i> hematopoyética |
| MO | Médula ósea |
| ALL-B | Leucemia Linfoide Aguda tipo B |
| CLL | Leucemia Linfoide Crónica |
| AML | Leucemia Mieloide Aguda |
| MNC | Células Mononucleares |
| SFB | Suero Fetal Bovino |
| ESTAU | Estaurosporina |
| ENZA | Enzastaurina |
| DEXA | Dexametasona |
| VINC | Vincristina |
| MTX | Metotrexate |
| PKC | Proteína Quinasa C |
| ALDH | Aldehído deshidrogenasa |
| EMR | Enfermedad Mínima Residual |
| MDR | Resistencia a múltiples fármacos |
| SNC | Sistema nervioso central |
| CAM-DR | Resistencia a medicamentos mediada por adhesión |

Marco Teórico

1. LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA

La leucemia linfocítica aguda (ALL, por sus siglas en inglés) comprende un espectro de desórdenes hematológicos que incluye diferentes subtipos definidos por el linaje celular (células B o T), el estatus de diferenciación y la anomalía genética. Representa la neoplasia más frecuente en niños y adolescentes (Inaba et al., 2013), con alrededor de un 80% de casos correspondientes a la ALL de precursores B (BCP-ALL, por sus siglas en inglés), que tiene un pico de incidencia entre los 2-5 años de edad. En niños, la prevalencia de la enfermedad es de 3-4 casos por cada 100.000 al año; la prevalencia en adultos es menor, alrededor de 1 caso por cada 100.000 al año (Chiarini et al., 2016), con opciones más reducidas de tratamiento y tasas de curación inferiores al 40% (Kantarjian et al., 2004; Samra et al., 2020). El pronóstico en adultos es menos favorable, en parte asociado a la presencia del rearrreglo génico BCR-ABL y el fenotipo BCR-ABL like (Thomas et al., 1998); otros subtipos de alto riesgo, incluyen fusiones KMT2A-AFF1 y TCF3-HLF, hipodiploidías, reordenamiento de CRLF2 y delección de IKZF1, los cuales, se han asociado con bajas tasas de supervivencia (Mullighan et al., 2012). En las últimas décadas ha mejorado de manera significativa la tasa de supervivencia en niños diagnosticados con la enfermedad. Desde los años 60 a la actualidad, este porcentaje de supervivencia ha pasado del 10 al 85-90% (Hunger et al., 2012). A pesar de ello, entre el 10 y 15% de los pacientes recaen (Bhojwani & Pui, 2013). Algunos de estos tienen una segunda remisión, sin embargo, alrededor del 55% recaerá nuevamente (Sun et al., 2018).

1.1 Regímenes de tratamiento para la ALL-B

Aunque cada vez, los tratamientos son más personalizados y en los últimos años se han dado grandes avances en cuanto al desarrollo de inhibidores específicos y también progresos en el campo de la inmunoterapia, los regímenes de quimioterapia convencional siguen siendo la primera línea de tratamiento para los pacientes con ALL, donde el éxito en el caso de los pacientes pediátricos puede alcanzar hasta un 90% (Hunger et al., 2012). El tratamiento que puede durar entre 2 y 3 años donde se pueden usar diez o más quimioterapéuticos diferentes, sigue diferentes fases: inducción, consolidación y mantenimiento. El objetivo de la terapia de inducción reside en restaurar la función hematopoyética normal, alcanzando una remisión completa (Scavino et al., 1976); en esta fase se administra ciclofosfamida, daunorrubicina o doxorubicina, una dosis semanal de vincristina, dos de L-asparaginasa y tres semanas de corticosteroide, generalmente prednisona (Larson et al., 1995). La fase de consolidación busca eliminar células tumorales residuales, en este caso se siguen diferentes

PKC en un microambiente leucémico con células MSC: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la resistencia a la quimioterapia en células ALL-B

protocolos, dependiendo las características del paciente, pero en general es frecuente el uso de ciclofosfamidias, citarabina y tiopurinas (Rudin et al., 2017). Dependiendo del riesgo del paciente es frecuente la profilaxis a nivel del sistema nervioso central (SNC) con quimioterapia intratecal o irradiación. En estos pacientes, se ha observado una mejor respuesta al administrar en la fase de inducción dexametasona en lugar de prednisona, dado que en el SNC se pueden alcanzar concentraciones más altas; sin embargo, su alta biodisponibilidad también se asocia con mayores efectos adversos (Hurwitz et al., 2000). Si los pacientes no responden a la fase de inducción, se evalúa el posible trasplante de médula ósea (MO); los que responden, avanzan a la fase de consolidación y mantenimiento, esta última por lo general incluye dosis diarias de 6-mercaptopurina, una semanal de metotrexate y vincristina y un pulso de prednisona cada 3 meses. La fase de mantenimiento puede extenderse por varios años y busca esencialmente reducir el riesgo de recaída después del tratamiento (Terwilliger & Abdul-Hay, 2017). Entre un 30 – 50% de los pacientes pediátricos diagnosticados con BCP-ALL que han sufrido recaída podrán superar la enfermedad con regímenes de quimioterapia agresiva (Bhojwani et al., 2013), no obstante, estos regímenes no mejoran considerablemente la tasa de supervivencia y, al contrario, pueden presentar una toxicidad elevada, un hecho que deja entrever la urgente necesidad de desarrollar nuevas estrategias de tratamiento. Entender los mecanismos que generan variación en las células leucémicas en respuesta a la quimioterapia ha sido complejo, no sólo por la heterogeneidad genética de la enfermedad o la heterogeneidad intercelular en términos de la capacidad proliferativa y la sensibilidad a los agentes quimioterapéuticos, sino por el régimen de quimioterapia empleado, que puede conllevar a la selección de subclones resistentes que proliferan con el tiempo y dan lugar a la recaída (Liu et al., 2018).

1.2 Recaída y Enfermedad mínima residual (EMR)

En muchos pacientes la mayoría de las células responden a la quimioterapia, pero otras, sobreviven causando recaídas y siendo una indicación de un mal pronóstico (Gökbuget et al., 2012). De hecho, después de la quimioterapia se ha observado un incremento en células tumorales que no se dividen (Lutz et al., 2013). Otras poblaciones exhiben una actividad elevada de la enzima Aldehído deshidrogenasa (ALDH), permaneciendo insensibles a la quimioterapia (Venton et al., 2016). Algunas recaídas también se han asociado con la presencia de células leucémicas durmientes, que pueden ser menos sensibles a la quimioterapia convencional que tiene como blanco generalmente células con altas tasas de proliferación (Zhou et al., 2009; Luskin et al., 2018). La existencia de estas poblaciones puede explicar en parte la eficacia de la terapia de mantenimiento, que se puede extender como se

describió anteriormente por varios años y que se ha demostrado, mejora el pronóstico de los pacientes (Schrappe et al., 2000). Esta terapia, de hecho, puede erradicar células con potencial de iniciar la leucemia, las cuales permanecen quiescentes por períodos prolongados de tiempo, sin que estas poblaciones quiescentes correspondan necesariamente con células *stem* leucémicas (Ebinger et al., 2016; Senft & Jeremias, 2018).

La recaída medular es el obstáculo tal vez más importante en la cura de alrededor del 15% de los pacientes jóvenes con ALL (Bailey et al., 2008). Los valores de enfermedad mínima residual detectados en la MO han sido un factor pronóstico de predicción de recaídas en leucemias crónicas, agudas y linfomas (Berry et al., 2017; Böttcher et al., 2012). Gran parte de las recaídas tempranas proceden de células residuales presentes en el primer diagnóstico, lo que está de acuerdo con estudios que indican que células presentes en el microambiente soportan la supervivencia de células iniciadoras de la leucemia en regiones específicas de la MO. De esta manera, una estrategia efectiva para erradicar estas poblaciones de células resistentes a la quimioterapia ha consistido en promover su movilización alterando las características que promueven su mantenimiento en el nicho (Ebinger et al., 2016). Otras recaídas, están relacionadas con la adquisición de nuevas mutaciones en las células leucémicas volviéndolas menos susceptibles a la quimioterapia. Cuando ocurre la recaída a nivel medular, se recomienda un tratamiento con dosis más elevadas y regímenes más intensivos que los empleados en la terapia después del diagnóstico inicial. En muchos casos, el trasplante de MO es la principal elección en lugar de la continuación del régimen de quimioterapia (Bailey et al., 2008).

Dependiendo del agente quimioterapéutico empleado, se han descrito diferentes mecanismos de resistencia en células de ALL. Estos incluyen cambios en la expresión de los genes de resistencia a medicamentos MDR1 y MRP1, la disminución en la expresión del receptor de glucocorticoides, cambios en el metabolismo de la célula tumoral, desregulación de transportadores de medicamentos, cambios en el estado de fosforilación y en la expresión de genes que regulan la apoptosis, así como mutaciones en elementos importantes del citoesqueleto que mejoran la estabilidad estructural de la célula (Bakker et al., 2016).

2. MICROAMBIENTE O NICHOS LEUCÉMICOS

El concepto de nicho fue propuesto en el año 78 por Schofield como una unidad reguladora que protegía las células *stem* hematopoyéticas (HSC, por sus siglas en inglés) del estrés del microambiente, mantenía y modulaba sus propiedades de autorrenovación, quiescencia y diferenciación (Schofield, 1978). Desde entonces, muchos trabajos han aportado a la identificación de diferentes poblaciones celulares que convergen en el mismo espacio, así como al entendimiento de las múltiples interacciones que allí ocurren (Pinho & Frenette, 2019). En la MO residen diferentes poblaciones celulares, no sólo de naturaleza hematopoyética. Dos nichos con características diferentes se han descrito previamente: el primero, el nicho endosteal, donde residen osteoblastos y osteoclastos, así como células gliales de Schwann y T-regs. El segundo, denominado vascular o sinusoidal que se ha asociado con la presencia predominante de poblaciones de células endoteliales, células reticulares abundantes en CXCL12 (CAR, por sus siglas en inglés), células *stem* mesenquimales (MSC, por sus siglas en inglés) y otras células perivasculares (Chiarini et al., 2016).

Aunque ambas regiones no están estrictamente separadas y son más un continuo, se considera aún que estos dos nichos son funcionalmente diferentes pues regulan diferencialmente la fisiología de las HSC (Méndez-Ferrer et al., 2020). Las HSC transmigran a través del nicho vascular (Itkin et al., 2016), donde se encuentran las poblaciones más activas de la MO, células sensibles al estrés genotóxico inducido por la radiación o la quimioterapia y encargadas del mantenimiento de la hematopoyesis. El nicho vascular proporciona oxígeno, nutrientes y factores de crecimiento a las HSC promoviendo su proliferación y diferenciación (Tamma & Ribatti, 2017). El nicho endosteal al contrario, es menos susceptible al daño y se ha descrito como relevante en los procesos de regeneración hematopoyética (Zhao et al., 2019). Se ha sugerido que las HSC residen cerca de esta región, donde a través de diferentes factores son retenidas entre otras por las células osteoblásticas, promoviendo su estado quiescente. Diferentes moléculas de adhesión, intervienen en la unión de las HSC a estas otras poblaciones presentes en el nicho, que, en condiciones normales, intervienen en los procesos de movilización y anidamiento de las HSC (Chiarini et al., 2016).

Existe aún controversia respecto a si es el microambiente el que influye de alguna forma la transformación maligna de las células hematopoyéticas o si se da preferencialmente por cambios intrínsecos en la célula leucémica, no obstante, en los últimos años los resultados de intensos estudios han podido concluir que definitivamente, después de la transformación, las células leucémicas remodelan el microambiente a su favor (Konopleva & Jordan, 2011; Civini et al., 2013; Méndez-Ferrer et al., 2020). Hace más de una década Walkey aportó evidencias importantes de cambios en el

microambiente que contribuían a los procesos de transformación, promoviendo la aparición de leucemia mieloide aguda (AML, por sus siglas en inglés). Suprimir la expresión del receptor del ácido retinóico gamma (RAR γ) en el estroma, más que en las células hematopoyéticas promovía la aparición de la neoplasia (Walkey et al., 2007). Otros estudios posteriores mostraron que la delección de los genes que codificaban para las proteínas Rb1, Mib1, Dicer, Crebbp o I κ B α en células del microambiente conducía a la aparición de neoplasias mieloproliferativas (Rupec et al., 2005; Kim et al., 2008; Raaijmakers et al., 2010; Zimmer et al., 2011), las cuales se han descrito como de alto riesgo por su alto potencial de transformación en leucemias (Deininger et al., 2017). Lo anterior indica que, el microambiente no sólo desempeña un papel importante en el mantenimiento de las características intrínsecas de las HSC normales, sino que las interacciones que allí ocurren son reguladas finamente y alteraciones en la comunicación intracelular en el microambiente pueden promover escenarios de desarrollo de la enfermedad.

Aunque recientemente las interacciones en el microambiente leucémico se han estudiado más profundamente, los cambios producto de estas interacciones se han reportado más en las células leucémicas, donde se puede inducir la secreción de factores de crecimiento y algunas rutas de señalización que involucran moléculas antiapoptóticas de la familia BCL-2, inhibidores de caspasas, genes de reparación del DNA, genes ribosomales, oncogenes entre otros (Mcmillin, 2010; 2013); sin embargo, los eventos que tienen lugar en las células del estroma y que hacen parte de los mecanismos no autónomos que promueven la supervivencia de las células leucémicas, han sido menos abordados.

2.1 Las MSC en el microambiente y su papel en la quimioresistencia

Para determinar *in vitro* la susceptibilidad y la resistencia de las células leucémicas a diferentes quimioterapéuticos, últimamente se ha tenido en cuenta el soporte de las MSC. Esto debido a que la presencia del estroma preserva la heterogeneidad de las diferentes muestras respecto a su capacidad proliferativa y los patrones de sensibilidad observada *in vivo* en modelos de xenoinjertos. (Frismantas et al., 2017). La intercomunicación que tiene lugar en el microambiente entre las células leucémicas y las MSC ocurre de formas diferentes; sin embargo, se ha visto que, especialmente el repertorio de factores solubles, así como el contacto directo entre los dos tipos de células, contribuyen de manera significativa a la quimiorresistencia (Tsfai et al., 2012; Bakker et al., 2016). Las MSC regulan de forma positiva moléculas antiapoptóticas en las células leucémicas apoyando su proliferación y supervivencia. Se ha descrito en modelos *in vitro* con soporte estromal que las células mesenquimales protegen a las leucémicas de la apoptosis inducida por citarabina, así como la apoptosis por privación de suero (Konopleva et al., 2002). Existe una relación entre la protección

que ejerce el microambiente con la respuesta al tratamiento quimioterapéutico. El co-cultivo de células de pacientes con AML en presencia del estroma, alteró la expresión de los transportadores ABC en un proceso dependiente del factor similar a la insulina (Benabbou et al., 2004), conduciendo a la aparición de un fenotipo de multirresistencia a drogas (MDR, por sus siglas en inglés). Se ha descrito también que las MSC pueden mantener la supervivencia y la quimiorresistencia de blastos de AML mediante la inducción de un fenotipo “side population” (SP, por sus siglas en inglés). Este mecanismo de quimiorresistencia se relacionó también con un fenotipo quiescente y la activación de transportadores ABC, responsables del eflujo activo del fármaco mitoxantrona. Además, de una capacidad de expansión y clonogenicidad limitadas, la capacidad de las MSC de pacientes con AML para promover el fenotipo SP en los blastos fue similar e incluso mejor que la de las MSC de donantes sanos. Esta observación sugiere que el estroma de la MO de los pacientes puede adaptarse para promover la protección o supervivencia a los blastos apoyando el hecho de que existe una estrecha intercomunicación entre las poblaciones del microambiente (Boutin, 2020).

Se considera que las MSC juegan un papel importante en la resistencia extrínseca de las células leucémicas a la quimioterapia, ya que al ser un elemento importante del microambiente confiere una ventaja en la supervivencia de la célula tumoral, que por lo general puede traer consigo cambios en su perfil transcripcional (Meads et al, 2008). En este contexto, numerosas evidencias se han encontrado en diferentes tipos de neoplasias hematológicas (Houthuijzen et al., 2012). En efecto, células de leucemia mieloide crónica (CML, por sus siglas en inglés) se protegieron de la muerte celular inducida por imatinib por el co-cultivo con MSC, a través de la secreción del factor 1 derivado de células estromales (SDF-1 α , por sus siglas en inglés), seguido por la activación del receptor de quimiocinas C-X-C tipo 4 (CXCR4) en las células leucémicas y una consecuente disminución en la actividad de caspasas (Vianello et al, 2010). Esta expresión aumentada de CXCR4 se ha asociado también con un incremento en la capacidad de migración de las células leucémicas promoviendo un fenotipo de resistencia (Jin et al, 2008). En leucemia linfocítica crónica (CLL, por sus siglas en inglés) se ha observado que el tratamiento quimioterapéutico puede erradicar células leucémicas circulantes, sin embargo, las que residen en la MO o son co-cultivadas con MSC, son menos sensibles al tratamiento (Balakrishnan et al, 2010). En el estroma se pueden inducir fenómenos de estrés oxidativo durante el desarrollo de la leucemia (Moschoi et al., 2016), al tiempo que las mismas células contribuyen al influjo de calcio en las células ALL y a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés). Sin embargo, las células estromales contribuyen al balance redox de las células leucémicas proporcionándoles metabolitos empleados por la célula tumoral para producir productos antioxidantes favoreciendo así la quimiorresistencia (Liu et al., 2015). Se ha descrito que

PKC en un microambiente leucémico con células MSC: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la resistencia a la quimioterapia en células ALL-B

las MSC de la MO pueden convertir la cistina en cisteína, un producto metabolizado por las células CLL a glutatión. La ausencia de este efecto del estroma contribuye a una sensibilidad aumentada de las células leucémicas a la quimioterapia (Zhang et al., 2012). En el mismo sentido, en ALL las MSC pueden conferir resistencia al tratamiento con asparaginasa, supliendo los requerimientos de las células leucémicas de asparagina, que de otra forma sería insuficiente para su supervivencia y proliferación (Iwamoto et al., 2007; Laranjeira et al., 2012).

2.2 Mecanismos que median la quimiorresistencia

Como se mencionó anteriormente las MSC pueden ejercer un efecto promotor de la supervivencia en las células leucémicas a través de diversos mecanismos. Muchos de esos efectos se ven reforzados por la activación de otras rutas de señalización en presencia de agentes quimioterapéuticos. Además, se ha reportado el papel de CXCL12/CXCR4 en la regulación de complejos de adhesión celular, así como en procesos de migración y “homing”, mediados entre otros por la enzima PKC (Spiegel et al., 2004), ruta de señalización que también está involucrada en la resistencia de las células leucémicas. Una expresión elevada de CXCR4 en blastos de BCP-ALL se ha asociado con un mal pronóstico (Schneider et al., 2002; Van den Berk et al., 2014). Modelos murinos que recibieron trasplantes con células BCP-ALL y que fueron tratados con vincristina y un antagonista de CXCR4, mostraron una reducción en la infiltración de las células tumorales (Parameswaran et al., 2011). Otros estudios además indican que en respuesta a diferentes agentes quimioterapéuticos líneas celulares de ALL-B sobre-regulan la expresión en superficie del receptor CXCR4; el empleo del inhibidor AMD3100 en estas células leucémicas pretratadas disminuyó la protección ejercida por las MSC (Sison et al., 2014). De forma interesante y en respuesta a dicha inhibición, *in vivo* las células sobre-expresaron CD49a (VLA-5 α) y CXCR7.

En otro escenario, las rutas de señalización Notch3 y 4 indujeron quimiorresistencia en células ALL-B posterior al tratamiento con corticosteroides. Ambas moléculas se sobre-expresaron tanto en las células leucémicas como en las MSC en condiciones de co-cultivo, y su inhibición por el tratamiento con el inhibidor GSI XII redujo la viabilidad de las células ALL (Kamdje et al., 2011). Además de Notch 3 y 4 se encontró que los efectos del soporte eran también mediados por Jagged-1/2 a través del contacto directo con las MSC. Esa alteración en la señalización de NOTCH por el co-cultivo de células ALL con MSC va en detrimento de la expresión de marcadores propios del linaje osteogénico, resultando en un remodelamiento del microambiente *in vivo* (Yang et al., 2015). En modelos de mieloma, la misma ruta promueve además la producción de factores como la interleuquina 6 (IL-6), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento similar a la insulina tipo

1 (IGF1) que refuerzan el efecto protector del estroma sobre las células leucémicas (Colombo et al., 2016).

En condiciones de co-cultivo tanto las células MSC como las ALL-B pueden expresar altos niveles de WNT, que mantiene la proliferación de las células leucémicas y la progresión del ciclo celular a través de la expresión de E2F1, MYBL2 and CDC25B (Khan et al., 2007). En presencia de citarabina las MSC protegieron de la apoptosis tanto a líneas celulares leucémicas como muestras primarias de pacientes con ALL-B. Esto se relacionó con un incremento en la expresión de diferentes moléculas que participan en la señalización de WNT, entre ellas, Lef1, c-Myc, y CCNDBP1, contrario a lo que se observó en los cultivos sin MSC (Yang et al., 2013). El tratamiento con XAV939, un inhibidor de β -catenina, sensibilizó a las células leucémicas tanto *in vivo* como *in vitro* al tratamiento con citarabina.

La regulación de las funciones de las células leucémicas por parte de las MSC puede darse además a través de la secreción de factores solubles producidos por el contacto directo entre las dos poblaciones celulares (Cheung & Van Ness, 2001). De manera interesante, la expresión de diferentes citoquinas está además influenciada por el tratamiento quimioterapéutico (Wu et al., 2005). Factores de crecimiento y citoquinas como IL-6 producidos por las MSC pueden ser capaces de proteger células leucémicas de la apoptosis inducida por glucocorticoides, a través de la sobre-regulación de moléculas como Bcl-XL y otras asociadas con el ciclo celular. Cuando la producción de IL-6 se inhibió en el co-cultivo la sensibilidad al fármaco aumentó. Las MSC no protegieron de igual forma a las células leucémicas en presencia de doxorrubicina (Cheung, 2001 & Van Ness, 2001). En el mismo sentido, células de pacientes con ALL-B co-cultivadas con células estromales mostraron un incremento en la proliferación modulada por IL7, IL3 y CXCL12, efecto que se vio acompañado por la fosforilación de PI3K/Akt, p38MAPK y MEK/ERK (Juarez et al., 2007). Adicionalmente, las células leucémicas a través de la expresión aumentada de IL-8 y CCL2, incrementaron su capacidad de adhesión al soporte, promoviendo además la supervivencia de las MSC y contribuyendo al establecimiento de un microambiente leucémico propicio para la progresión de la enfermedad (De Vasconcellos et al., 2011). Lo anterior apoya la idea que las interacciones célula-célula, los factores solubles, la quimioterapia y también los defectos genéticos, pueden contribuir en la respuesta a la terapia. Es de suma importancia entender cómo todas esas variables pueden relacionarse entre sí.

2.3 Moléculas de adhesión y resistencia

Del mismo modo que el microambiente tiene un papel importante en la transformación maligna, así mismo las células leucémicas pueden remodelarlo en pro de su supervivencia creando un

PKC en un microambiente leucémico con células MSC: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la resistencia a la quimioterapia en células ALL-B

microambiente “permisivo” que interfiere de diferentes maneras con la hematopoyesis normal (Ishikawa et al. 2007; Colmone et al., 2008, Schepers et al., 2013). En modelos experimentales de ALL, las células leucémicas, en presencia de agentes quimioterapéuticos, pueden reestructurar su microambiente reclutando células MSC, a través de la sobre-expresión de la quimiocina ligando 3 (CCL3) y factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1) y el factor de diferenciación y crecimiento 15 (GDF15). Lo que indica que las células leucémicas liberan factores al microambiente en respuesta a la terapia, conduciendo a la remodelación del microambiente alterando las funciones de las MSC que entonces confieren un mejor soporte para el crecimiento de las células leucémicas (Duan et al., 2014).

La inhibición de la apoptosis, tanto espontánea como inducida, por la quimioterapia se ha reportado que se debe en parte a la presencia de las MSC. Estudios previos han mostrado que la adhesión al soporte de las células ALL-B puede protegerlas de la muerte, un fenómeno descrito como resistencia a medicamentos mediada por adhesión celular (CAM-DR, por sus siglas en inglés) (Damiano et al., 1999). A diferencia de los tumores sólidos, en las neoplasias hematológicas las células leucémicas no crecen como esferoides, las interacciones célula-célula o célula matriz extracelular se dan con componentes del microambiente de la MO, donde diferentes moléculas de adhesión participan mediando el crecimiento, la diferenciación, supervivencia y “homing” de las células hematopoyéticas y leucémicas (Consoli, 1998; Hazlehurst & Dalton, 2001; Levesque & Winkler, 2016).

Estudios en CLL mostraron que el soporte mesenquimal promueve la supervivencia de las células leucémicas en presencia de Dexametasona y Ciclofosfamida (Kurtova et al., 2009); el contacto directo fue indispensable en dicha protección, ya que al separar las células el efecto se revertía. Se ha reportado que líneas celulares de ALL presentan una adhesión diferencial al estroma (Moses et al., 2016) donde las células más adherentes exhiben una menor sensibilidad a agentes quimioterapéuticos, se caracterizan por su estado quiescente y además presentan una alteración en su metabolismo. En la búsqueda de potenciales agentes terapéuticos han sido relevantes los estudios que demuestran la sobrerregulación en las células leucémicas de moléculas de adhesión, como CXCR4, VLA4 y CD44 (Nervi et al., 2009; Matsunaga et al., 2003; Jin et al., 2006). Una expresión elevada de FAK se ha relacionado con el aumento en la capacidad de adhesión en algunas leucemias Ph+ con mutaciones en IKZF1, un fenotipo asociado además con una relocalización de estas células hacia la región periarteriolar de la MO y la agresividad de este subtipo en particular (Churchman et al., 2016). La inhibición de FAK combinada con inhibidores de BCR-ABL alteró la adhesión de las células leucémicas y su crecimiento *in vivo*.

PKC en un microambiente leucémico con células MSC: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la resistencia a la quimioterapia en células ALL-B

La señalización mediada por la interacción directa entre las MSC y las células leucémicas a través de integrinas, activa otras rutas de señalización que favorecen la supervivencia de la célula tumoral. En este escenario, la serina/treonina quinasa ILK (“Integrin-linked kinase”) juega un rol central en la activación de rutas de señalización mediadas por integrinas. Dicho contacto induce la activación de las rutas ILK/Akt, ERK1/2, y STAT3 en las MSC en una manera dependiente de PI3K, protegiendo a las células leucémicas de la apoptosis en modelos tanto de ALL como de AML (Tabe, 2007). Recientemente, se demostró que ILK puede también ser activada en las células leucémicas a través de una expresión elevada en las MSC del gen POSTN, que codifica para la proteína de matriz extracelular periostina, activando un “loop” de retroalimentación que involucra ILK/NF- κ B, finalizando con la producción de CCL2 y promoviendo la progresión de la leucemia (Ma et al., 2019).

La adhesión de células leucémicas a la MO contribuye además a la quimiorresistencia de las células tumorales residuales (Nwajei & Konopleva, 2013) cuya presencia está relacionada con las recaídas. Moléculas de adhesión como osteopontina, VLA-4/VCAM, LFA-1/ICAM-1 y N-cadherina que median el contacto directo entre las células MSC y las HSC en condiciones de homeostasis, se convierten en elementos importantes teniendo en cuenta que pueden también contribuir a la protección de las células leucémicas en su microambiente, siendo moduladores claves de la sensibilidad a los agentes quimioterapéuticos convencionales. Al respecto, se ha descrito que la integrina- α 4 (CD49d o VLA4) además de estar involucrada en el proceso de “homing” de las células leucémicas a la MO (Shishido et al., 2014) también participa mediando su adhesión al estroma. Esta molécula se ha identificado como un factor de riesgo en ALL dado que reduce la sensibilidad de las células a Doxorrubicina a través de la activación de la ruta NF- κ B (Liu et al., 2013). De igual forma se ha observado que la activación de NF- κ B tanto en las MSC como en las células leucémicas participa en la quimioresistencia de líneas celulares de ALL-B dependiente de la interacción entre VLA-4 (en las células leucémicas) y VCAM-1 (en las MSC) (Jacamo et al., 2014). Más recientemente, en modelos de BCP-ALL y AML el papel de algunas tetraspaninas como CD9 y CD82 también se ha relacionado con la regulación de la sensibilidad de las células leucémicas a la quimioterapia mediada por el estroma bien a través de la señalización VLA-4/VCAM-1 (Leung et al., 2019) o a través de PKC α , la consecuente activación de la integrina β 1 y la señalización mediada por p38 MAPK (Floren et al., 2020).

Lo anteriormente expuesto en este capítulo soporta la idea de que el microambiente y particularmente las MSC promueven en las células leucémicas, un fenotipo menos sensible a los agentes quimioterapéuticos debido en parte a través del contacto directo entre las dos poblaciones de células. En este fenómeno, las rutas NF- κ B, MAPK, PI3K/AKT parecen jugar un papel importante,

PKC en un microambiente leucémico con células MSC: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la resistencia a la quimioterapia en células ALL-B

y en los tres casos además PKC puede ejercer un efecto regulador de su señalización (Lutzny et al., 2013; Kolch et al., 1993; Amigo-Jiménez et al., 2015).

3. PROTEÍNA QUINASA C (PKC)

3.1 Bioquímica

La PKC ha sido blanco de intensos estudios desde hace más de treinta años cuando se descubrió que la enzima era un receptor celular de los ésteres de forbol, agentes con características pro-tumorales (Kikkawa et al., 1983). Al respecto, la complejidad del estudio de las vías de señalización de esta proteína reside en el amplio repertorio de isoformas estructuralmente relacionadas pero que difieren en su papel biológico (Garg et al., 2014). La PKC comprende una familia de 10 isoenzimas, codificadas por 9 genes, localizados en diferentes cromosomas, y categorizadas en 3 familias diferentes: isoenzimas clásicas cPKC (α , β I, β II y γ), nuevas nPKC (δ , ϵ , η y θ) y atípicas aPKC (ζ , ι). Todas las isoformas comparten un dominio de homología o de unión a ATP (C3) y un dominio catalítico (C4). Las cPKC y nPKC comparten además un dominio C1 rico en cisteínas al cual se une el diacilglicerol (DAG); sólo las convencionales presentan el dominio C2 (o de unión a Ca^{2+}); las isoformas atípicas pueden ser activadas por interacción proteína-proteína a través de su dominio PB1. Las isoenzimas cPKC y nPKC son activadas mediante fosforilación, en un estricto orden en tres sitios específicos (Newton, 2003). Un segmento pseudosustrato mantiene a PKC en una conformación autoinhibida, la cual es revertida por la unión de un segundo mensajero. Las cPKC son activadas por unión a DAG y Ca^{2+} , mientras que las nPKC son únicamente activadas por DAG. (Takai et al. 1979; Nishizuka 1986; Mochly-Rosen et al. 1991). La activación de PKC promueve su translocación del citosol a las membranas en la célula, dicha localización es mediada específicamente por proteínas RACK (“receptor for active C-kinases”). Adicionalmente, PKC se activa por transfosforilación, autofosforilación o por proteólisis (Parekh et al., 2000).

3.2 PKC clásicas y cáncer

Las PKC clásicas (α , β I, β II y γ) se han relacionado típicamente con el desarrollo, mantenimiento y progresión de los tumores malignos. PKC α y β se consideran reguladores críticos de la supervivencia, la proliferación, migración e invasión celular en una variedad de tumores (Griner & Kazanietz 2007). Sin embargo, está claro que las funciones específicas de las isoformas de las PKC dependen del tipo de célula y del contexto, de modo que las diferentes isoformas pueden ejercer efectos opuestos bien sea promoviendo o reprimiendo la tumorigénesis. La isoforma PKC α se activa en respuesta a muchos

estímulos fisiológicos diferentes; está implicada en la progresión del cáncer debido a su capacidad para aumentar el crecimiento celular y la migración, así como para promover la actividad antiapoptótica. En tumores sólidos, las isoformas de PKC β se han relacionado con la progresión de diferentes tipos de cáncer, entre ellos cáncer de seno, colon, próstata y glioblastoma (Isakov et al., 2018).

En neoplasias hematológicas, la isoforma α juega un papel indispensable en la supervivencia de poblaciones de células B (Keenan et al., 1999; Barragan et al., 2002); se ha reportado que diferentes miembros de la familia PKC se expresan en células *stem* leucémicas y desempeñan funciones importantes en la leucemogénesis (Nakagawa et al., 2006). El inhibidor TDZD-8, que afecta la integridad de la membrana anulando la señalización de PKC, induce la muerte específica de células progenitoras leucémicas de AML, CML, ALL y CLL (Guzman et al., 2007).

La señalización de PKC también se ha visto implicada en la modulación de vías de supervivencia activadas en células leucémicas en parte a través de la activación de JAK2 (Abrams et al., 2007). Se ha demostrado que la PKC β II está sobreexpresada y presenta una alta actividad en células de cultivos primarios de muestras de pacientes con CLL. En efecto, en células con mutaciones en JAK2 el tratamiento con el inhibidor de PKC Go6976 reduce adicionalmente la actividad de PKC (Grandage et al., 2006), sugiriendo que existen mecanismos de intercomunicación entre las rutas de señalización que podrían ser intervenidos terapéuticamente a través de la inhibición específica de PKC.

3.3 PKC y resistencia a la quimioterapia

La expresión de PKC se ha asociado con el fenómeno de MDR en diferentes tipos de cáncer sólido y en neoplasias hematológicas (Basu, 2010). Algunas isoenzimas regulan, a través de diferentes mecanismos, la sensibilidad de las células a agentes quimioterapéuticos, la mayoría de ellos pertenecientes a las familias de las antraciclina, vinca alcaloides, taxanos y antibióticos, todos comúnmente usados en el tratamiento del cáncer. En células MCF-7 de cáncer de seno con resistencia a doxorubicina se observó un incremento en la expresión de PKC (Fine et al., 1998). Células de la línea HL-60 de leucemia promielocítica y la línea MOLT3 de leucemia linfoblástica que desarrollaron *in vitro* MDR mostraron también un incremento en la actividad de la PKC (Aquino et al., 1988; Schwartz et al., 1991). En otros casos además se constató que dicho incremento en su actividad estaba relacionado con una disminución del medicamento a nivel intracelular (Ido et al., 1986), sugiriendo que la PKC desempeña una función importante en la resistencia intrínseca de las células a la quimioterapia. Muchos estudios muestran que la isoforma PKC α contribuye a la MDR a través de

PKC en un microambiente leucémico con células MSC: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la resistencia a la quimioterapia en células ALL-B

una sobre-regulación de su expresión tanto a nivel transcripcional como postranscripcional (Basu, 2010). En otros escenarios se ha descrito que a diferencia de las isoformas clásicas α y β que se sobre-expresan en células que adquirieron el fenotipo de resistencia, las isoformas nuevas ϵ y δ se redujeron (Blobe et al., 1993), indicando que la contribución a la MDR de PKC está restringida sólo a algunas de las isoenzimas, siendo además esta característica dependiente del tipo celular.

Existen diversos mecanismos a través de los cuales se promueve la MDR y la PKC en dicho fenotipo, puede participar a diferentes niveles. Se ha demostrado que la activación de PKC α induce la fosforilación de la glicoproteína P (Chambers et al., 1992), una bomba dependiente de ATP responsable de la expulsión de los medicamentos desde el interior de la célula, induciendo al mismo tiempo la expresión del gen MDR1 a través de los factores de transcripción NF- κ B y c-Jun (Ratnasinghe et al., 2001; Kameyama et al., 2008). En otro trabajo, la sobre expresión de PKC β I promovió el fenotipo MDR, sin embargo, la expresión de la glicoproteína P no se alteró (Fan et al., 1992), indicando que PKC puede actuar a través de otros mecanismos. En ese sentido, PKC también juega un papel importante en el proceso de apoptosis, alterando la función de reguladores claves en la promoción de la supervivencia. Se considera que las isoformas α , ϵ , ζ y η de PKC funcionan indirectamente también como proteínas antiapoptóticas (Basu, 2010). La activación de PKC α o su expresión ectópica en células REH (ALL) induce su translocación a la membrana mitocondrial donde fosforila Bcl-2 (Ruvolo et al., 1998). La activación de PKC además inhibe la fosfatasa PP2A (Jiffar et al., 2004), una enzima que modula directamente su actividad. Esta regulación dual sobre la función de Bcl-2 por parte de PKC conlleva a una reducción en la sensibilidad de las células a los medicamentos. Finalmente, aunque los dos mecanismos mencionados anteriormente son los principales mediadores del fenotipo de resistencia, otras moléculas diana de estos fármacos también son reguladas por PKC, es el caso de las topoisomerasas I y II las cuales son fosforiladas por acción de la enzima (Samuels et al., 1989; Mouchel & Jenkins, 2006).

No necesariamente el papel de PKC en cuando a la resistencia se da como se detallaba anteriormente de forma directa sobre otras moléculas a través de una fosforilación. Existen reportes que sugieren una interrelación mucho más compleja entre el microambiente, las moléculas de adhesión, PKC, la quimiorresistencia y la supervivencia de las células leucémicas. En co-cultivo células de CLL con diferentes tipos de células estromales, se observó la activación de diferentes quinasas (Lyn, ERK, Akt y PKC), así como de factores de transcripción (NF- κ B y STAT3). Ahí, la inhibición de PI3K o de PKC eliminó el efecto protector del estroma, volviendo sensibles a las células leucémicas al tratamiento con trióxido de arsénico. Esa protección involucró el contacto físico entre la célula estromal y la

PKC en un microambiente leucémico con células MSC: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la resistencia a la quimioterapia en células ALL-B

leucémica. El bloqueo de las integrinas $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha L\beta 2$ fue suficiente también para abolir la protección ejercida por el microambiente (Amigo-Jiménez et al., 2015).

Una de las evidencias más importantes del papel de PKC en el microambiente, específicamente en las MSC, la aportó con su trabajo Lutzny y colaboradores en el 2013, donde células B leucémicas indujeron la expresión de la isoforma PKC β II en células MSC, la activación de NF- κ B, siendo esta señalización indispensable para la supervivencia de las células leucémicas ALL-B *in vivo* (Lutzny et al., 2013). NF- κ B se ha descrito como uno de los factores transcripcionales centrales en la producción de citoquinas, así como en la regulación de la expresión moléculas de adhesión en favor de la proliferación y supervivencia de las células leucémicas (Karin, 2006). Además, recientemente se describió que la inhibición de PKC- β en las MSC aumenta la sensibilidad de las células de ALL-B a la quimioterapia (Park et al., 2020). Empleando inhibidores de PKC se observó una quimiosensibilización *in situ* de las células B, alterándose la expresión de proteínas como VCAM1 que participan en los mecanismos de adhesión celular. Se halló una relación importante entre PKC y la biogénesis lisosomal mediada por el factor TFEB, clave en el mantenimiento de la integridad de la membrana celular, donde se expresan justamente estas moléculas que median la interacción célula-célula y célula matriz extracelular. Parte de estos resultados están de acuerdo con los hallazgos que describimos aquí y que publicamos recientemente (Ruiz-Aparicio et al., 2020).

3.4 Estrategias de inhibición de PKC

El hecho de que PKC tanto en células normales como en células malignas participe en diferentes procesos de la fisiología celular hace indispensable un estudio detallado de la función de cada isoforma. Se ha descrito que, así como algunas de las isoenzimas tienen un papel protumorigénico (Jiffar et al., 2004), otras actúan como supresores de la proliferación (Redig et al., 2008). Eso hace que sea importante la búsqueda de inhibidores específicos. Los principales retos residen en el sustancial grado de homología entre las diferentes isoenzimas y sus similitudes a nivel estructural (Isakov, 2018). Las diferentes estrategias de inhibición de PKC comprenden moléculas que compiten por el sitio de unión de ATP o el dominio C1 de unión a DAG; otras se basan en la inhibición de la interacción de PKC con sus efectores empleando además de moléculas pequeñas, oligonucleótidos y péptidos (Mochly-Rosen et al., 2012).

Inicialmente se identificaron varias moléculas que regulaban corriente arriba la actividad de PKC, el hecho de inhibirlas implicaba también inhibir la activación de la mayoría de isoenzimas. PDPK1 un regulador de quinasas fue una de esas moléculas blanco, sin embargo, su inhibidor UCN-01 en

PKC en un microambiente leucémico con células MSC: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la resistencia a la quimioterapia en células ALL-B

ensayos de fase I/II no mostró la efectividad esperada (Sato et al., 2002; Welch et al., 2007). Adicionalmente y partiendo de la base que mTOR participa en la fosforilación de residuos tanto en las isoenzimas convencionales como nuevas, se desarrolló el compuesto AZD2014, el cual inhibió el crecimiento de diferentes tipos de células tumorales (Pike et al., 2013); otros inhibidores de mTOR mostraron escasos beneficios, con respuestas poco durables en los pacientes. En ambos casos, inhibir PDK1 o mTOR no fue selectivo, teniendo en cuenta que estas moléculas fosforilan residuos bastante conservados entre las diferentes isoenzimas (Isakov, 2018). De mayor relevancia, han sido los inhibidores que compiten con ATP. No obstante dificultades parecidas respecto a la homología no sólo entre isoenzimas, sino en general con otros cientos de proteínas quinasas hacen de esta estrategia también un reto para los investigadores. Estaurosporina (ESTA) es uno de los inhibidores competitivos quizás más ampliamente conocido y estudiado. Este compuesto se une a todas las isoformas de PKC y a otras quinasas (Steinberg et al., 2008), sin embargo, por su falta de selectividad no ha sido usado a nivel clínico. Con el tiempo, otros compuestos con mayor eficacia y especificidad fueron desarrollados; Midostaurina, un derivado de la ESTA se ha evaluado en monoterapia y terapia combinada mejorando en algunos casos la supervivencia de los pacientes (Lazarus et al., 2016). El compuesto Enzastaurina (ENZA), inhibidor de la isoforma β , ha sido evaluado en diferentes modelos tumorales tanto sólidos como hematológicos, encontrándose en el último caso varias evidencias que apoyarían su evaluación también en ALL. De los estudios empleando este inhibidor, se destaca el trabajo en el 2007 de Podar y colaboradores, quienes evaluaron *in vivo* e *in vitro* los potenciales efectos citotóxicos de ENZA sobre líneas celulares y células aisladas de pacientes diagnosticados con mieloma múltiple con un fenotipo MDR, se encontró que el compuesto inhibía tanto la proliferación como la supervivencia de estas células, y su efecto citotóxico era sinérgico con otros agentes quimioterapéuticos. De forma importante, en el contexto de la MO, la ENZA inhibió la activación de la PKC asociada a secreción de factores de crecimiento y citoquinas por parte de las células estromales, afectando además la adhesión mediada por VEGF e IGF-1 de las células mieloides (Podar et al., 2007). Este inhibidor se reportó inicialmente como específico para la isoforma β (Graff et al., 2005); sin embargo, estudios posteriores indicaron que también inhibía la isoenzima α promoviendo la apoptosis en células de AML, disminuyendo la fosforilación de Bcl-2 y la activación de la proteína ERK (Ruvolo et al., 2011). En otros estudios, el uso de Enzastaurina redujo la fosforilación de AKT y GSK3 β (Saba et al., 2012). Las briostatinas, son moléculas inhibidoras del dominio C1 de las isoenzimas convencionales y nuevas, antagonizan con los esteroides de forbol, promoviendo una rápida degradación de PKC (Isakov et al., 1993). En neoplasias del tejido hematopoyético se ha demostrado su capacidad de promover la diferenciación celular e inhibir la

PKC en un microambiente leucémico con células MSC: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la resistencia a la quimioterapia en células ALL-B

proliferación de muestras primarias de pacientes con leucemia (Drexler et al., 1989). Péptidos que inhiben la interacción proteína – proteína, importantes mediando la translocación de PKC hacia diferentes compartimentos de la célula se han desarrollado como una de las aproximaciones más exitosas buscando la inhibición específica de las diferentes isoformas de la enzima. El diseño de estas moléculas se basa en el hecho de que las diferentes isoenzimas de PKC interactúan con proteínas RACKs que tienen una función de anclaje y selectivamente se unen a PKC en un estado activo en diferentes compartimentos subcelulares. Estas secuencias derivadas del dominio C2 de PKC pueden inhibir la interacción de PKC con RACK selectivamente (Stebbins et al., 2001; Mochly-Rosen et al., 2012); otras de las aproximaciones empleando péptidos se han desarrollado para inhibir la interacción entre PKC ϵ y actina o entre PKC ϵ y HSP90 (Isakov, 2018).

Basados en el conocimiento estructural de PKC y especialmente en los mecanismos de regulación de su actividad por la secuencia pseudosustrato (PS) amino-terminal, el grupo de Fisiología Celular y Molecular (FCM) desarrolló el péptido quimérico HKPS (Perdomo-Arciniegas et al., 2008). La molécula comprende dos secuencias, la secuencia HK de características hidrofóbicas capaz de permear la membrana celular e internalizarse en la célula, actuando como una secuencia cargo (Liu et al., 1996; Torgerson et al., 1998; Cubillos & Vernet, 2007) y la secuencia PS que se transloca en la célula e inhibe la PKC. Esa inhibición puede ocurrir a través a través del bloqueo del sitio catalítico de PKC mediado por la secuencia PS o mediante la regulación alostérica de la enzima por la secuencia HK. Se determinó mediante ensayos enzimáticos empleando la enzima recombinante que HKPS inhibe la actividad de isoformas clásicas de PKC (Perdomo-Arciniegas et al., 2008).

Estudios *in vitro* en el grupo de FCM, han demostrado la capacidad del péptido HKPS de inhibir el crecimiento de diferentes líneas celulares leucémicas en condiciones de monocultivo. La evidencia sugiere que PKC además de participar en la promoción de la supervivencia de las células leucémicas, también es un elemento importante en el soporte que confieren las MSC. Se plantea en el presente trabajo la evaluación del péptido HKPS junto con otros inhibidores convencionales de PKC en un modelo de nicho leucémico. Se pretende evaluar el papel de la inhibición de la enzima como un mediador importante de la viabilidad celular mediada por el soporte, como en la supervivencia de las células leucémicas derivadas de pacientes con ALL y su papel en la sensibilidad de la célula tumoral frente al uso de agentes quimioterapéuticos comúnmente usados en el tratamiento de la enfermedad.

Planteamiento del Problema

Aunque el tratamiento para los pacientes con ALL-B ha tenido en los últimos años un incremento en las tasas de supervivencia, alrededor del 20% de los pacientes recaen después de la quimioterapia y otro porcentaje sufre efectos adversos por la toxicidad de los medicamentos. La EMR, relacionada con la presencia en muy bajas frecuencias de células malignas después de que el paciente ha alcanzado la remisión completa, está también asociada con el riesgo de recaída (Luskin et al., 2018), indicando que, células leucémicas no susceptibles a la terapia con agentes quimioterapéuticos podrían ser responsables de la reaparición de la enfermedad.

En ese sentido, se ha reportado que el desarrollo de la leucemia y la respuesta a la quimioterapia están influenciados no sólo por las características intrínsecas de las células leucémicas que dan cuenta de una alta heterogeneidad, sino también de las interacciones de las células leucémicas con su microambiente (Tesfai et al., 2012). En especial, las MSC del estroma de la MO desempeñan un papel fundamental en la supervivencia y expansión de los blastos leucémicos primarios *in vitro* (Manabe et al., 1992; Mudry et al., 2000); sin la presencia de estas células y su función de soporte, las células leucémicas activarían procesos de apoptosis de forma espontánea.

En diferentes tipos de leucemia son varios los fenómenos mediados por las células MSC del estroma que se han asociado entre otros, a mecanismos de quimiorresistencia. Estos van desde la adaptación redox mitocondrial (Liu et al., 2015), la quiescencia (Wang et al., 2017), la expresión de moléculas de adhesión (Matsunaga et al., 2003; Jacamo et al., 2014), la sobre-regulación de moléculas antiapoptóticas (Konopleva et al., 2002; Lwin et al., 2007), la comunicación a través de vesículas extracelulares (Chen et al., 2019) y recientemente, la transferencia mitocondrial (Moschoi et al., 2016; Wang et al., 2018). Aunque diferentes, estos mecanismos parten de un hecho en común: la coexistencia y la interacción física entre las células leucémicas y su soporte con la consecuente activación de rutas de señalización que son importantes en la protección ejercida por el microambiente. Una estrategia que permitiera lograr una disrupción específica de la comunicación intercelular en el microambiente, interviniendo sobre moléculas claves, que como PKC β , participan no sólo en la promoción de la supervivencia de las células leucémicas sino siendo parte importante de la función de soporte en las MSC, permitiría junto con la administración de fármacos de uso convencional, erradicar de forma más eficiente las células leucémicas y al mismo tiempo, se podría disminuir la toxicidad potencial causada por la quimioterapia, la que por sí sola, puede no acabar por completo la población de células tumorales (Zeng et al., 2009).

Objetivos

General

Evaluar el efecto de la inhibición de la enzima PKC sobre la función de soporte de las células MSC a las células leucémicas, la viabilidad de las células de ALL-B y el papel de la enzima en la respuesta de las ALL-B ante agentes quimioterapéuticos y los posibles mecanismos involucrados.

Específicos

1. Determinar el efecto de la inhibición de la enzima PKC sobre la viabilidad de las células ALL-B en presencia o ausencia de MSC.
2. Evaluar el papel de la PKC relacionado con las funciones de soporte que confieren las MSC a las ALL-B en presencia de agentes quimioterapéuticos.
3. Determinar la contribución de la PKC en la sensibilidad de las células ALL-B al tratamiento con agentes quimioterapéuticos mediante la evaluación de la actividad de MDR1, MRP1, ABCG2 y ALDH.
4. Evaluar la participación de las vías de señalización de NF- κ B, MAPK, AKT/PI3K en la resistencia a fármacos en el nicho leucémico.

Hipótesis

La interacción directa entre las células ALL-B y las células MSC del estroma permite la supervivencia de las células leucémicas de una manera dependiente de la expresión de la enzima PKC, cuya inhibición bloquea las señales de supervivencia en las ALL-B, volviendo a estas células más susceptibles a agentes quimioterapéuticos.

Materiales y Métodos

Síntesis de péptidos

Se sintetizaron las siguientes secuencias peptídicas: el péptido quimérico HKPS (AAVALLPAVLLALLAPRKGALRQY), inhibidor de PKC, y como controles, las dos secuencias que lo componen: la secuencia hidrofóbica HK, derivada del sarcoma de Kaposi (AAVALLPAVLLALLAP) y la secuencia pseudosustrato PS (RKGALRQY) conservada en las isoformas clásicas de PKC. En algunos experimentos, se empleó la quimera formada por la secuencia HK y una secuencia desordenada de PS (*scramble*, HKPSscr). Los péptidos fueron sintetizados por el Laboratorio de Síntesis y Aplicación de Moléculas Peptídicas del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias, por la técnica de síntesis múltiple en fase sólida, utilizando resina MBHA y aminoácidos t-Boc; se purificaron por HPLC y se caracterizaron por espectrometría de masas. Todos se usaron con una pureza >90% (Anexo, Fig. S1).

Obtención de MSC y caracterización

Las MSC se obtuvieron a partir de aspirados de MO de pacientes pediátricos sanos y se hizo con el correspondiente consentimiento informado de los padres. Las células mononucleares (MNC) se aislaron mediante gradiente de centrifugación con Ficoll (Ficoll-Paque, d=1.077 g/ml, Sigma-Aldrich, USA) y se sembraron a una densidad de 10^6 células/mL en medio Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, por sus siglas en inglés) suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB) 10%, aminoácidos no esenciales y piruvato de sodio. Después de alcanzar una confluencia del 90% se tripsinizaron y caracterizaron mediante inmunotipificación por la presencia de los marcadores CD73, CD105, CD90, CD44, CD13 en ausencia de marcadores de células hematopoyéticas CD34 y CD45 por FACS. Las MSC se utilizaron para los diferentes experimentos entre los pases 3 y 5. En el laboratorio previamente se habían también caracterizado las muestras de acuerdo a su potencial multipotente hacia los linajes osteogénico, adipogénico y condrogénico (Anexo, Fig. S2).

Obtención de muestras de pacientes con ALL-B y aislamiento de células ALL-B

Los pacientes con ALL-B se diagnosticaron en la Fundación Hospital de la Misericordia (HOMI) en el servicio de oncohematología pediátrica, lo que incluye una inmunofenotipificación por citometría de flujo utilizando varios paneles de diagnóstico de Euroflow (<https://www.euroflow.org/>). El diagnóstico se estableció de acuerdo con los criterios de la OMS (Arber et al., 2016). Para esta

PKC en un microambiente leucémico con células MSC: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la resistencia a la quimioterapia en células ALL-B

evaluación, se tomó una parte (1 ml) de las muestras recolectadas para la evaluación diagnóstica de laboratorio de los pacientes que aceptaron participar en este estudio y que su(s) padre(s) o acudientes firmaron el consentimiento informado. Los comités de ética de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia y de la HOMI aprobaron los protocolos (Resolución 007-080-17, 11 Mayo 2017). Se utilizaron muestras de MO de pacientes con una infiltración elevada (> 80%) de blastos leucémicos, de primer diagnóstico que no hubieran empezado el tratamiento con corticoides. El aislamiento de MNC de muestras de pacientes con ALL-B, se realizó por centrifugación por gradientes de densidad (Ficoll-Paque, $d=1.077$ g/ml, Sigma- Aldrich, USA).

Líneas celulares de ALL-B

Para algunos experimentos se utilizaron las líneas celulares de ALL-B RS4;11 t(4,11) (ATCC; CRL-1873), REH (ATCC CRL-8286) y SUP-B15 (ATCC CRL-1929), de la ATCC. Las células se mantuvieron bajo condiciones estándar de cultivo en medio RPMI-1640 (RS4;11 y REH) o en IMDM (SUP-B15) suplementado con 10% de SFB, 1% de aminoácidos no esenciales, 1% de piruvato de sodio y en el caso de SUP-B15, 0.05 mM de 2-mercaptoetanol.

Establecimiento del co-cultivo de MSC con ALL-B

Para el establecimiento del co-cultivo, 5×10^4 células ALL-B /100 μ L (líneas celulares o muestras de pacientes) se sembraron en placas de 96 pozos directamente sobre una capa de MSC cultivadas 24 h antes en medio IMDM con suplementos (densidad 1×10^4 células/100 μ L, confluencia entre 70-80%). Dependiendo del experimento, los cultivos se mantuvieron por 6, 24, 48 o 72 h en medio RPMI-1640 con suplementos. Cumplido el tiempo se hicieron las respectivas evaluaciones. Como controles se emplearon células ALL-B o MSC solas en medio RPMI-1640 o IMDM con SFB 10%, piruvato de sodio y aminoácidos no esenciales 1%.

En los ensayos de selectividad del péptido HKPS se co-cultivaron MSC y MNC a las mismas densidades indicadas previamente y luego se determinaron los cambios en la viabilidad de las MNC por citometría de flujo como se describe más adelante. De forma parecida, en estos ensayos de selectividad, células REH y MNC fueron co-cultivadas en proporciones iguales sobre las MSC confluentes por 72 h.

Ensayos de citotoxicidad por MTT

Se determinó la citotoxicidad de los péptidos mediante el ensayo de MTT (Mosman, 1983), inicialmente en blastos de pacientes con leucemia. Las células leucémicas se sembraron a una

PKC en un microambiente leucémico con células MSC: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la resistencia a la quimioterapia en células ALL-B

densidad de 5×10^4 células/100 μL y el tratamiento se hizo durante 2 h empleando concentraciones de 20 y 40 μM de los diferentes péptidos. Como control de muerte celular se empleó el inhibidor ESTAU a una concentración de 2 μM . Para determinar el papel del soporte (MSC) en la viabilidad de las células leucémicas, se evaluó el efecto citotóxico de estos compuestos sobre: 1) las ALL-B en monocultivo; 2) las MSC en monocultivo; 3) el co-cultivo después de 2 y 24 h de tratamiento y finalmente, 4) la viabilidad de las células leucémicas después del co-cultivo con las MSC pretratadas. Cumplidos los tiempos, se adicionó el MTT a una concentración final de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se incubó por 4 h más si la viabilidad a evaluar era únicamente en las MSC. Para los co-cultivos el tiempo de incubación con el MTT se extendió por 18 h teniendo en cuenta el tiempo que demoraron las células ALL-B en metabolizar el compuesto. Luego se adicionaron 100 μL de DMSO por 15 min para la solubilizar los cristales de formazán. Posteriormente, se midió la absorbancia a 550 nm en un lector de ELISA. Como control se empleó Dimetil sulfóxido (DMSO) a las concentraciones utilizadas para la disolución de los péptidos.

Evaluación de la viabilidad en ALL-B por citometría de flujo

La viabilidad de las células leucémicas se determinó mediante marcación con el reactivo LIVE/DEAD Aqua. (Molecular Probes). Después de la incubación de MSC con los inhibidores de PKC, los co-cultivos se establecieron durante los períodos de tiempo indicados, se tripzinizaron y marcaron con CD19 FITC y LIVE/DEAD Aqua. La línea celular leucémica RS4; 11 se evaluó sola o en co-cultivo con MSC pretratadas o no con los inhibidores de PKC ESTAU y ENZA En otros experimentos, las células ALL-B de pacientes se sembraron a una densidad de 5×10^4 células/100 μL en microplacas de 96 pozos que contenían MSC confluentes y que se habían tratado previamente con los inhibidores convencionales o los péptidos. La viabilidad celular se determinó después de 2 y 48 h de incubación. Las mediciones se llevaron a cabo en un citómetro FACSAria IIIup (Becton Dickinson Biosciences). Los datos se analizaron con el software FlowJo.

Evaluación de la capacidad de soporte de las MSC

La capacidad de soporte de las células MSC se determinó mediante ensayos funcionales de adhesión y la expresión de moléculas de adhesión por citometría de flujo. 5×10^4 células obtenidas de pacientes con ALL-B se cultivaron en placas de 96 pozos sobre una capa de MSC confluyente, pretratada por 2 y 48 h con ENZA, ESTAU, el péptido HKPS y sus respectivos controles (PS, HK y HKPSscr). Las células de ALL-B se dejaron adherir sobre las MSC durante 6 h en condiciones de cultivo estándar. Posteriormente, el medio se removió y las células se lavaron con PBS 1X. La evaluación de la

PKC en un microambiente leucémico con células MSC: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la resistencia a la quimioterapia en células ALL-B

capacidad de adhesión se determinó teniendo en cuenta el número de células leucémicas de partida y calculando el número de células no adheridas por conteo en cámara de Neubauer. Los co-cultivos se fijaron y tiñeron con cristal violeta, y luego se disolvió la tinción con EDTA al 0.1% en PBS 1X. La absorbancia, como una medida de las células presentes en el co-cultivo, se determinó en un espectrofotómetro a 450 nm.

Contribución de los factores solubles a la supervivencia de las células ALL-B

Los medios condicionados se obtuvieron a partir de co-cultivos de MSC con células B-ALL o a partir de MSC en monocultivo durante 72 h, en ambos casos en presencia de medio RPMI suplementado con 5% de SFB. Tres días después, se recogió el sobrenadante, se centrifugó a 700 g durante 5 min para eliminar las células de B-ALL no adheridas y finalmente se filtró usando un filtro de 0,22 μ M (Corning Incorporated). Para los experimentos de viabilidad, las células B-ALL se resuspendieron en los medios acondicionados frescos durante 72 h; a las 36 h se adicionó nuevo medio condicionado fresco. Las células B-ALL solas o los co-cultivos de MSC con células leucémicas en RPMI y 5% de SFB se incluyeron como controles. La viabilidad de las células B-ALL se evaluó mediante citometría de flujo usando doble tinción con LIVE/DEAD Aqua y un anticuerpo monoclonal contra CD19 producido en ratón (anti-human CD19 APC-H7, BD Pharmigen) a las 24, 48 y 72 h.

Para los experimentos de Transwell (TW), se sembraron las células MSC y B-ALL en la cámara superior del inserto (tamaño de poro de 5 μ m, 6.5 mm de diámetro, Corning Incorporated) a densidades de 1×10^4 y 5×10^4 células, respectivamente. También en otra condición, solo se sembraron MSC en la cámara superior del inserto. La cámara inferior se llenó con 600 μ L de RPMI suplementado con SFB al 5% que contenía 1.5×10^4 células de pacientes con ALL-B. Las células leucémicas solas o los co-cultivos en la cámara inferior se incluyeron como controles. La viabilidad de las células B-ALL se evaluó a las 24, 48 y 72 h mediante citometría de flujo como se describió anteriormente.

Análisis de la expresión moléculas de adhesión en células MSC y ALL-B

La expresión de las moléculas VLA-4, VLA-5, VCAM, ICAM-1, CD44 y CXCR4 se determinó mediante citometría de flujo. Las MSC fueron pre-tratadas por 2 h con los péptidos o inhibidores ENZA y ESTAU y luego los co-cultivos se establecieron con células leucémicas por 6 h. Cumplido el tiempo, las células ALL-B no adheridas se removieron por lavado con PBS 1X. Los co-cultivos se tripsinizaron y las células se marcaron con los correspondientes anticuerpos monoclonales. Las MSC y células ALL-B se identificaron mediante marcación con los anticuerpos monoclonales APC mouse anti-human CD105

PKC en un microambiente leucémico con células MSC: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la resistencia a la quimioterapia en células ALL-B

(clon SN6, Invitrogen) y con APC-H7- mouse anti-human CD19 (clon SJ25C1, BD Pharmingen) o FITC-mouse anti-human CD19 (clon HIB19, BD Pharmingen) respectivamente. Para las diferentes moléculas de adhesión se emplearon los anticuerpos PE mouse anti-human CD49e (clon IIA1, BD Pharmingen), APC mouse anti-human CD49d (clon 9F10, BD Pharmingen) or BV711 mouse anti-human CD49d (clon 9F10, BD Horizon) APC mouse anti-human CD54 (clon REA266, Miltenyi Biotec), PE mouse anti-human CD106 (VCAM-1) (clon REA269, Miltenyi Biotec) o BV605 mouse anti-human CD106 (Clon 51-10C9, BD Horizon), FITC mouse anti-human CD44 (clon G44-26, BD Pharmingen) o APC mouse anti-human CD44 (clon G44-26) y PE CD184 (CXCR4) (clon 12G5, Miltenyi Biotec). Para el análisis de datos se empleó el software FlowJo v10.0.

Evaluación del estado de activación de rutas de señalización en MSC y células ALL-B

Se determinó la activación de las rutas de señalización FAK, AKT, STAT3, NF- κ B y ERK1/2 mediante Phosflow (BD Biosciences). Las células leucémicas se sembraron sobre una monocapa confluyente de MSC pretratadas previamente o no con el vehículo, HKPS 40 μ M, ENZA 20 μ M, ESTAU 1 μ M y después de 2 y 4 h de co-cultivo se retiraron las células ALL-B no adheridas al soporte mediante lavado con PBS 1X. Los co-cultivos o las células MSC solas se tripsinizaron, colectaron y lavaron con PBS para su posterior marcación. Las células se fijaron inmediatamente con 300 μ L de *Fix Solution Buffer* (Biolegend) e incubaron en la oscuridad a temperatura ambiente por 30 min. Se adicionó 1 mL de 1X *Perm Buffer* (Biolegend) a cada tubo y se hicieron lavados mediante dos rondas de centrifugación a 600 x g por 5 min. Las células se incubaron por 30 min en la oscuridad y a TA con los anticuerpos monoclonales BD Phosflow PE Mouse Anti-Akt (pT308), BD Phosflow Alexa Fluor 647 Mouse anti-Akt (pS473), BD Phosflow Alexa Fluor 488 Mouse Anti-ERK1/2 (pT202/pY204), BD Phosflow Alexa Fluor 647 Mouse Anti-Stat3 (pY705), BD Phosflow PE Mouse anti-FAK (pS910) y BD Phosflow PE Mouse anti-NF- κ B p65 (pS529). La adquisición de datos un citómetro FACs Aria IIIup (BD Biosciences) y el análisis de datos usando el software FlowJo.

Evaluación de la capacidad protectora de las MSC ante agentes quimioterapéuticos

Para evaluar la sensibilidad de las células ALL-B a la quimioterapia en presencia del soporte las células ALL-B se trataron durante 6 h con dexametasona (DEXA) 250 nM, vincristina (VINC) 250 nM o metotrexate (MTX) 6.25 μ M. Luego se co-cultivaron conjuntamente con MSC confluentes pretratadas o no durante 2 h con 40 μ M HKPS, HK o 20 μ M ENZA. Tres días después, se recogieron las células ALL-B no adheridas y se mezclaron con las células tripsinizadas de los co-cultivos. Para las mediciones por citometría de flujo, las células se marcaron con CD19 FITC (clon HIB19, BD

PKC en un microambiente leucémico con células MSC: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la resistencia a la quimioterapia en células ALL-B

Pharmingen y el reactivo LIVE/DEAD Fixable Aqua (Molecular Probes). Las evaluaciones y análisis se realizaron empleando el citómetro FACSaria IIIup (Becton Dickinson Biosciences) y los datos se analizaron empleando el software FlowJo.

Actividad de los transportadores ABC

Empleando el EFLUXX-ID® *Gold multidrug resistance assay* kit (ENZO Life Sciences), se determinó mediante citometría de flujo la actividad los transportadores MDR1, ABCG2 y MRP1. Después del establecimiento de los co-cultivos las células ALL-B y MSC se trataron con DEXA (250 nM) en medio RPMI suplementado con 10% de SFB, 1% de amino ácidos no esenciales y 1% de piruvato de sodio. Después de 72 h de co-cultivo se removieron las células ALL-B mediante un lavado con PBS 1X y los co-cultivos se tripsinizaron. En tubos separados se adicionaron 2 µL del inhibidor de MDR1 (Verapamilo 300 nM), 2.5 µL del inhibidor de MRP (MK-571 750 nM) y 1 µL del inhibidor de BCRP (Novobiocina 1.5 µM) completando a 125 µL con PBS; luego se adicionó 250 uL de la suspensión celular ($2-5 \times 10^5$ células) en cada tubo y se incubó con los inhibidores por 5 min. Como control de actividad basal se empleó DMSO 5%. Se agregaron 125 µL de la solución Gold Dye (1µL por cada 125 µL de PBS) y 2 µL de los anticuerpos CD19 APC-H7 y 4 µL de CD73 PE para la identificación de las poblaciones de células ALL-B y MSC, respectivamente, después de incubar los tubos 30 min a 37°C, se adicionaron 10 µL de yoduro de propidio, se midió la actividad de los transportadores en el citómetro. El análisis de datos se llevó a cabo empleando el software FlowJo y la actividad de cada transportador se calculó como el factor de actividad de resistencia a múltiples fármacos (MAF, por sus siglas en inglés) considerando los valores de intensidad de fluorescencia media de las células en presencia del inhibidor específico para cada transportador y el control de actividad con el vehículo.

Determinación de la actividad de la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH)

La actividad de la enzima ALDH se determinó mediante citometría de flujo empleando el AldeRed ALDH Detection Assay (Merck KGaA). Las MSC se pre-trataron por 2 h con HKPS, PS (40 µM), ENZA (20 µM) o el vehículo (DMSO 0.4%) en medio sin suplementos. Los tratamientos se retiraron mediante un lavado con medio incompleto y se establecieron los co-cultivos con células leucémicas de un paciente con ALL-B, en medio RPMI con suplementos. Los co-cultivos se trataron o no con DEXA (250 nM) durante 72 h. Cumplidos los 3 días del co-cultivo, las células leucémicas no adheridas se removieron mediante un lavado con PBS 1X y los co-cultivos con las MSC y ALL-B adheridas se tripsinizaron, recogieron y lavaron mediante dos centrifugaciones sucesivas a 500 g por 5 min para su posterior marcación. Entre 1 y 2×10^5 células fueron incubadas por 40 min a 37°C con Verapamilo

PKC en un microambiente leucémico con células MSC: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la resistencia a la quimioterapia en células ALL-B

el reactivo fluorescente AldeRed 588, un sustrato de ALDH que difunde fácilmente en las células e intracelularmente es convertido mediante una reacción de oxidación en AldeRed 588-A, un producto que se retiene en el citoplasma, siendo la fluorescencia una medida directa de la actividad ALDH en las células. La fluorescencia basal se determinó incubando las células con AldeRed 588 y el inhibidor DEAB (N,N-diethylamino-benzaldehyde), específico de ALDH1. Después de la incubación y un lavado de las células se midió la actividad ALDH en el citómetro y los datos se analizaron empleando el software FlowJo.

Evaluación de la actividad de fosfoquinasas y la ruta NF- κ B

Se determinó la activación en las MSC de la ruta NF- κ B empleando el *Proteome Profiler Human NF- κ B Pathway Array* (ARY029, R&D Systems) y el estado de fosforilación de 43 quinasas usando el *Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Array* (ARY003B, R&D Systems) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, 1.2×10^6 MSC se sembraron en medio IMDM con suplementos en cajas de 75 cm² hasta alcanzar confluencia del 90%. Según el caso, las MSC se pretrataron con HKPS 40 μ M por 2 h y al cabo de ese tiempo se establecieron los co-cultivos con células ALL-B por 2 h adicionales. En algunos casos, los co-cultivos se trataron con los agentes quimioterapéuticos DEXA o VINC (500 nM). Las células leucémicas se removieron mediante 4 lavados con PBS 1X y uno con PBS 1X + EDTA, las MSC se lisaron por 30 min a 4°C con 800 μ L del *buffer* de lisis del Kit y la proteína se cuantificó mediante el método del ácido bicinónico (Thermo Scientific). Las membranas se bloquearon durante 1 h y se incubaron toda la noche a 4°C con 200 (NF- κ B) o 350 μ g (Fosfo quinasas) de proteína. Al día siguiente, las membranas se lavaron e incubaron a temperatura ambiente por 1 h con el correspondiente cocktail de anticuerpos y después de otra serie de lavados se incubaron por 30 min con estreptavidina-HRP. Para el revelado, las membranas se cubrieron con 1 ml de Chemi Reagent Mix proveído en el kit y se expusieron entre 1 a 15 min en un casete de autorradiografía (Kodak), las películas se revelaron empleando un revelador fotográfico. Las fotografías se tomaron empleando el software Syngene Tools y los análisis se llevaron a cabo en Image J, empleando el macro Protein Array Analyzer (V.1.1.c).

Análisis estadístico.

Los valores se expresaron como la media \pm error estándar (SEM). La significancia estadística se evaluó mediante un análisis de varianza no paramétrico de una vía (ANOVA) con la prueba de Kruskal-Wallis para experimentos de viabilidad o cuando se evaluó la adhesión de células B-ALL. El análisis agrupado de todas las muestras de pacientes que definen los rangos de respuesta al tratamiento con HKPS fue hecho usando ordinary ANOVA de una vía. Las comparaciones entre los tratamientos HKPS y STAU en el grupo más susceptible a HKPS se realizaron utilizando la prueba de Wilcoxon. Para las comparaciones entre diferentes grupos combinando inhibición del soporte y quimioterapia se empleó ANOVA de dos vías. En cada experimento se detallan las pruebas estadísticas utilizadas. Los análisis se realizaron utilizando el software Prism 6.0 y 8.0 $p = 0.05$ (*), $p = 0.01$ (**), $p = 0.001$ (***) y $p = 0,0001$ (****) fueron considerados estadísticamente significativos

Resultados

El tratamiento con HKPS induce cambios morfológicos y una citotoxicidad diferencial en blastos de pacientes con ALL-B

Teniendo evidencia de que el péptido HKPS inhibió el crecimiento de diferentes líneas celulares leucémicas (datos no mostrados), se evaluó en muestras de pacientes con ALL-B el efecto del tratamiento con HKPS. Las células se obtuvieron a partir de aspirados de MO de los pacientes, quienes al diagnóstico tenían una infiltración de blastos leucémicos superior al 80% ($93.14\% \pm 4.63$) (Anexo, Tabla 1). Después de 2 h de tratamiento con $40 \mu\text{M}$ de HKPS las células perdieron su morfología típica redondeada en cultivo volviéndose más irregulares y presentando además extrusión de contenido intracelular al medio de cultivo (Fig. 1A). Las células leucémicas tratadas con ESTAU fueron apreciablemente más opacas, sin embargo, no perdieron su morfología típica. El tratamiento con ESTAU redujo su viabilidad de manera importante, pero este efecto fue inferior al observado cuando las células que se trataron con HKPS. Esto sugiere que la diferencia en los mecanismos de inhibición de PKC tienen un efecto diferente sobre la muerte celular en las células leucémicas. Los péptidos HK y PS no tuvieron ningún efecto (Fig. 1A). Se evaluaron 22 muestras en ensayos de citotoxicidad observándose una heterogeneidad en la respuesta al tratamiento. Los pacientes ($n=7$) que mejor respondieron al tratamiento con HKPS mostraron reducciones en la viabilidad entre 40 y 55% (Fig. 1B). Una proporción igual ($n=7$) no respondió al tratamiento y la viabilidad no se redujo por debajo de 75%; 8 de las muestras presentaron una respuesta intermedia (Fig. 1C). De forma interesante, en los 7 pacientes que mejor respondieron al tratamiento con el péptido, se observó que el efecto de HKPS fue superior al del inhibidor clásico de PKC ESTAU (Fig. 1D).

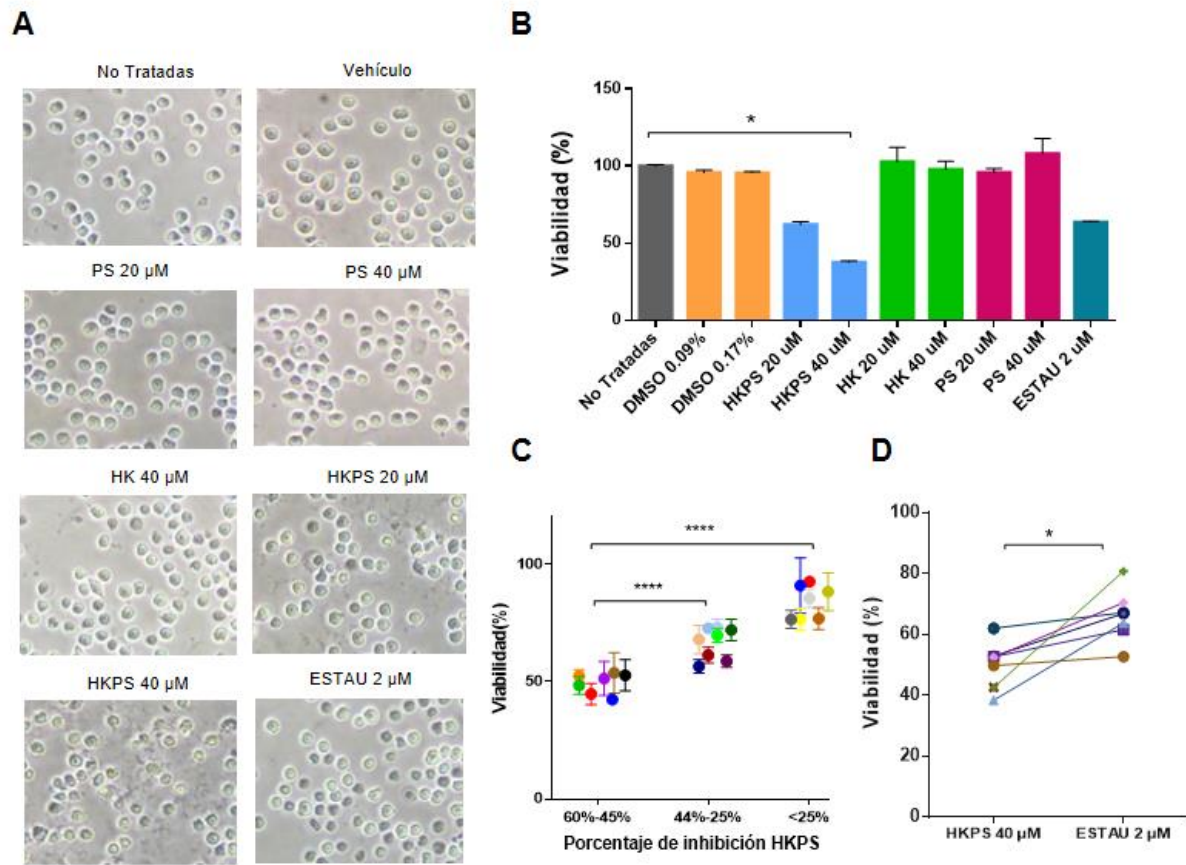


Fig. 1 Efecto de HKPS sobre la morfología y la viabilidad de células leucémicas obtenidas de pacientes con ALL-B. **A)** Microfotografías representativas de células MNC derivadas de MO de un paciente pediátrico con ALL-B tratadas por 2 h con el vehículo (DMSO), HKPS, HK, PS o el inhibidor ESTAU a las concentraciones indicadas. Magnificación de las microfotografías 40x. **B)** Las células ALL-B se trataron con el vehículo, los péptidos, o el inhibidor ESTAU por 2 h como se muestra, la viabilidad se determinó mediante ensayo MTT. **C)** Distribución de las 22 muestras de pacientes con ALL-B de acuerdo con el porcentaje de inhibición de la viabilidad después de 2 h de tratamiento con HKPS 40 μ M. **D)** Comparación del efecto de HKPS 40 μ M con el de ESTAU 2 μ M en la viabilidad de un grupo de 7 pacientes que mejor respondió al tratamiento con el péptido, empleando ensayo MTT. Los porcentajes de viabilidad se normalizaron respecto a los vehículos. Datos expresados como el promedio \pm SEM (non-parametric one way ANOVA (B), Wilcoxon test (D) * $p < 0.05$).

La inhibición de PKC con HKPS en las MSC afecta la viabilidad de las células ALL-B.

El establecimiento de los co-cultivos permitió evidenciar que las células leucémicas se adhieren fuertemente a las MSC y que las células que no lo hacen presentan una morfología diferente y mueren rápidamente (Fig. 2A). Se determinó que la presencia de las células *stem* mesenquimales es indispensable para la supervivencia de las células leucémicas, que de otra forma sin soporte alcanzarían altos porcentajes de muerte celular a los 3 días (Fig. 2B). Esto está de acuerdo con lo reportado en la literatura donde se ha descrito que las MSC favorecen la progresión de la enfermedad, protegiendo a las células malignas, en parte a través de la activación de PKC (Lutzny et al., 2013). Por lo tanto, se evaluó si la inhibición de PKC, enzima blanco del péptido quimérico HKPS, en las MSC afectaba la supervivencia de las células de ALL-B. Además del ensayo de MTT, se utilizó la marcación con LIVE/DEAD Aqua y análisis por citometría de flujo para determinar cambios en la viabilidad celular.

Se realizó el tratamiento con el péptido HKPS así: 1) células leucémicas solas; 2) co-cultivo por 2 h; 3) co-cultivo 24 h; y 4) pre-tratamiento de las MSC por 2 h y establecimiento del co-cultivo por 24 h. En general, las muestras mostraron dos comportamientos: un efecto inhibitorio a 20 μM y más a 40 μM durante un período de incubación de 2 h con HKPS, con un efecto protector de las MSC tanto en las concentraciones de HKPS como en 2 h o 24 h de co-cultivo (Fig 2C, superior). En otras muestras HKPS a 20 y 40 μM indujo casi un 50% de inhibición. En el sistema de co-cultivo, la inhibición de HKPS fue abolida a 20 μM de HKPS pero no a 40 μM . Cuando el tratamiento se extendió a 24 h, la viabilidad se redujo a ambas concentraciones de HKPS, pero, aun así, fue mayor a 20 μM . El pretratamiento de MSC con HKPS redujo la viabilidad a casi los mismos valores (Fig. 2C, inferior).

PKC en un microambiente leucémico con células MSC: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la resistencia a la quimioterapia en células ALL-B

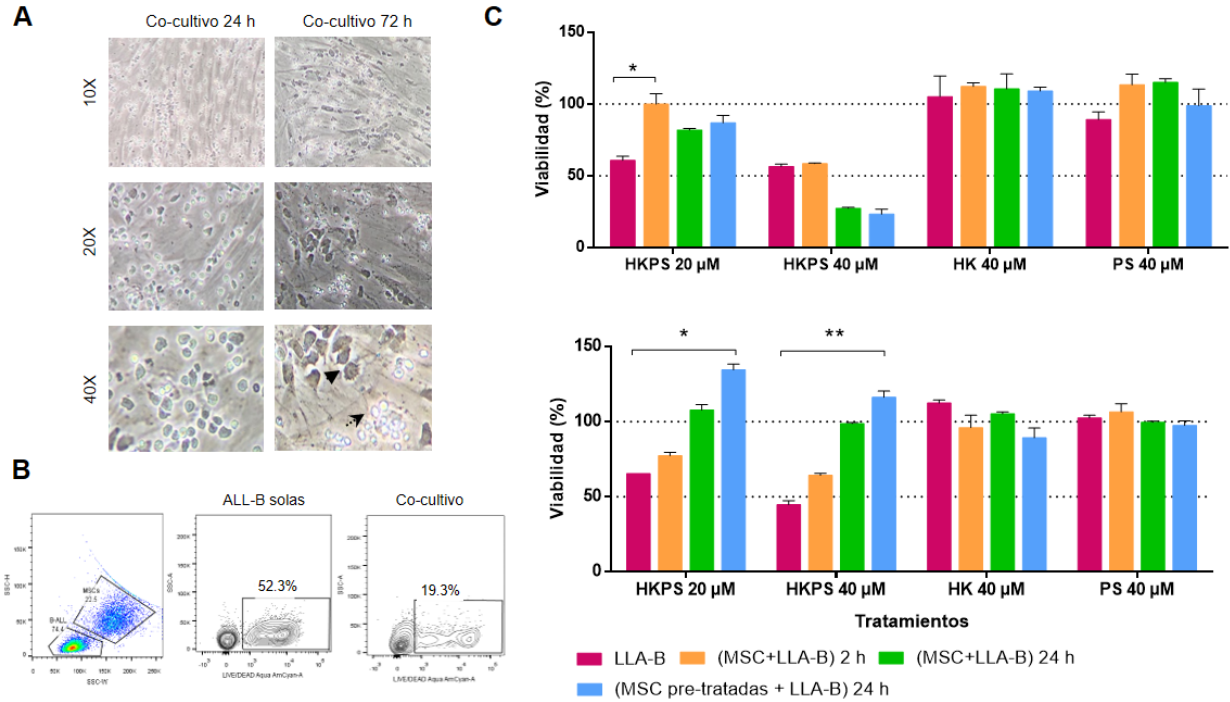


Fig. 2 Cambios morfológicos en las células ALL-B por el co-cultivo y en su viabilidad por efecto de la inhibición del soporte con HKPS **A)** Modelo *in vitro* de co-cultivo de células MSC con ALL-B 24 y 72 h después de su establecimiento. Las flechas sólida y punteada señalan las células leucémicas adheridas a las MSC y las no adheridas respectivamente. **B)** Influencia de la presencia del soporte mesenquimal sobre la supervivencia de células ALL-B. Los cultivos se establecieron por 3 días en presencia o no de MSC, la viabilidad fue determinada por citometría de flujo mediante la marcación con el reactivo LIVE/DEAD Aqua . **C)** Porcentajes de viabilidad de células ALL-B y co-cultivos, después de los tratamientos con HKPS o los péptidos control, en las condiciones indicadas. El efecto se determinó a través de ensayos de MTT y los porcentajes son relativos al vehículo. Los datos se expresan como el promedio \pm SEM (Non-parametric ANOVA one-way * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Buscando discriminar el efecto específico de la inhibición de PKC en el soporte de MSC o en la población de células leucémicas, se hicieron evaluaciones por citometría de flujo de células obtenidas de los co-cultivos. Las MSC se trataron con el péptido HKPS, los respectivos péptidos controles y los otros inhibidores de PKC, ENZA y ESTAU (Fig. 3B) y 2 h después se establecieron los co-cultivos con células de la línea celular RS4;11 o de pacientes ALL-B durante 3 días. La evaluación preliminar con las células RS4;11 sugirió que la presencia del soporte rescataba a las células de la muerte celular cuando eran tratadas con ENZA a bajas concentraciones; sin embargo, a una mayor concentración, dicha protección se perdía (Fig. 3A). En las muestras primarias de pacientes, se encontró que el tratamiento con HKPS en las MSC, tuvo un efecto negativo en la viabilidad de las células malignas,

PKC en un microambiente leucémico con células MSC: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la resistencia a la quimioterapia en células ALL-B

incluso más drástico que el del inhibidor ESTAU. Además, el efecto de HKPS a las 2 h fue similar a las 48 h. El efecto en la muerte celular de las células ALL-B fue dependiente de la concentración del péptido (Fig. 3C)

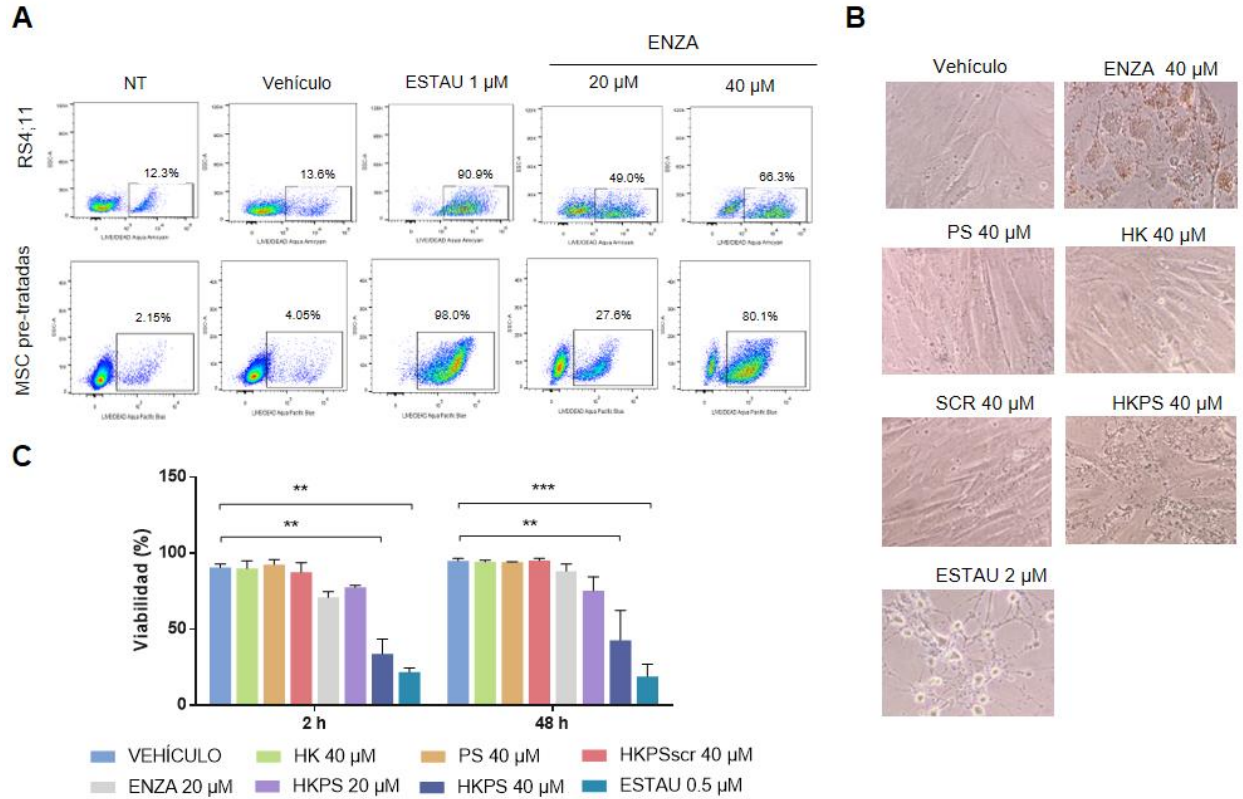


Fig. 3 Influencia de la inhibición de PKC en las MSC sobre la supervivencia de células RS4;11 y ALL-B medida empleando FACS. A) La viabilidad de células leucémicas de la línea RA4;11 se determinó por citometría de flujo en presencia o no del soporte mesenquimal. Las MSC se pre-trataron por 2 h como se indica y se co-cultivaron con las RS4;11 **B)** Cambios morfológicos en las MSC posterior a los tratamientos con los péptidos o los inhibidores ENZA y ESTAU a las concentraciones señaladas. Microfotografías de las MSC después de 2 h, magnificación 20x. **C)** Cuantificación de cambios en la viabilidad medidos a través de citometría de flujo empleando el reactivo LIVE-DEAD Aqua en células ALL-B, co-cultivadas con MSC por 3 días. Las MSC se pre-trataron antes de los co-cultivos con los diferentes compuestos y concentraciones indicadas por 2 y 48 h. Los datos obtenidos a partir de dos experimentos independientes se presentan como el promedio \pm SEM (Non-parametric one-way ANOVA ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$).

HKPS muestra selectividad por las células ALL-B sin afectar en la misma medida células MNC o MSC.

Considerando que *in vivo* las células leucémicas co-existen con las MSC y además con MNC sanas, se determinó si la inhibición con HKPS afectaba por igual a células MNC aisladas de pacientes sanos y a células leucémicas de la línea celular REH. En condiciones de monocultivo, el péptido HKPS redujo en más del 90% la viabilidad de células MNC sanas, un resultado esperado de acuerdo a lo reportado por el grupo previamente (Perdomo et al., 2008); sin embargo, en presencia de las MSC, las MNC se protegen después de la inhibición del soporte con HKPS (Fig. 4A). En condiciones donde en co-cultivo, ambas poblaciones de células leucémicas (REH) y MNC sanas estaban presentes en una relación (1:1), se observó que las células REH mostraban una susceptibilidad mayor que las MNC a dicha inhibición, reflejándose esto en un incremento del porcentaje de muerte de la población celular leucémica (Fig. 4B). Además, el tratamiento con HKPS de las MSC solas no redujo su viabilidad de la misma forma que con las ALL-B (Fig. 4C), de hecho en los experimentos de soporte se encontró una recuperación de las MSC al evaluar su viabilidad en una ventana más amplia de tiempo (Anexo, Fig. S3).

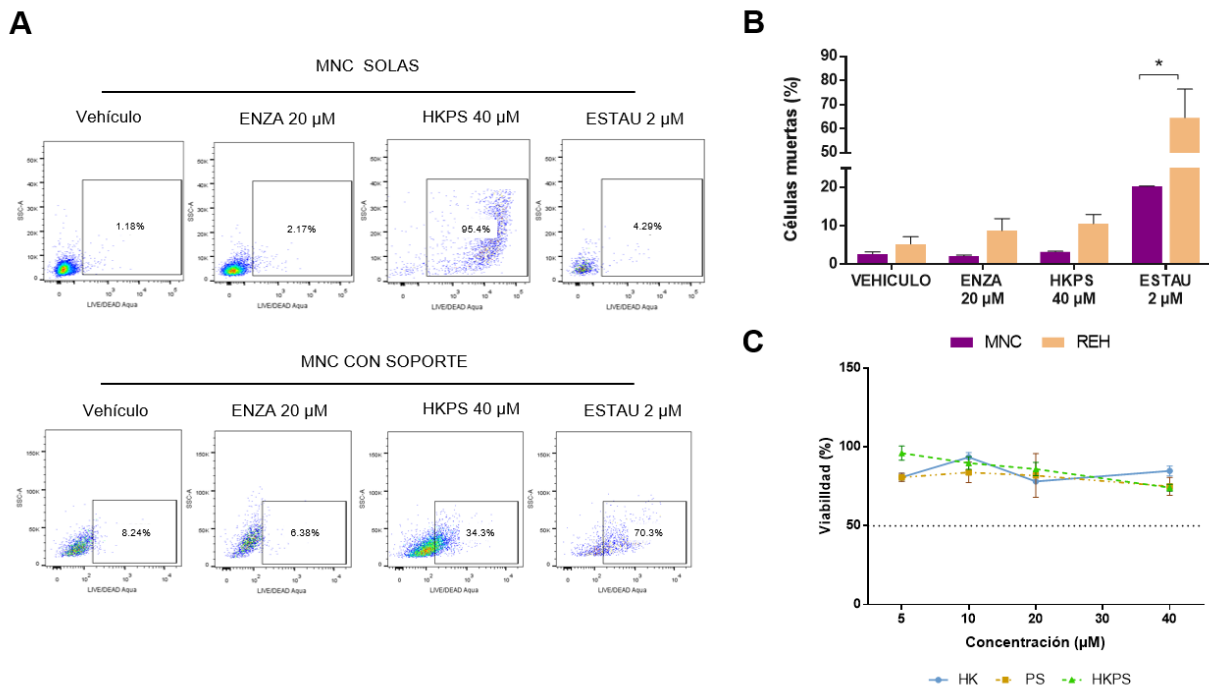


Fig. 4. Evaluación de la selectividad de HKPS en MNC sanas y respecto a células leucémicas de la línea celular REH. A) Efecto directo de HKPS en MNC aisladas de un donante sano y MNC co-cultivadas con MSC pre-tratadas con HKPS u otros inhibidores de PKC. Las MNC se trataron con el vehículo, ENZA, HKPS o ESTAU por 2 h a las concentraciones indicadas (panel superior), de igual forma se evaluó el papel del soporte en la

PKC en un microambiente leucémico con células MSC: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la resistencia a la quimioterapia en células ALL-B protección de las MNC después del pre-tratamiento de las MSC y el co-cultivo por 3 días adicionales (panel inferior). La viabilidad se determinó por citometría de flujo mediante marcación de los co-cultivos con CD19 y el reactivo LIVE/DEAD Aqua. **B)** Porcentaje de muerte de las células MNC y REH después de la inhibición del soporte con ENZA, HKPS o ESTAU (2 h) y el co-cultivo 3 días. Los co-cultivos se establecieron mezclando en igual proporción MNC sanas y REH sobre la monocapa de MSC pre-tratadas como se indicó anteriormente. La evaluación se hizo por citometría de flujo y las poblaciones celulares se discriminaron por su tamaño. **C)** Porcentaje de viabilidad de las MSC tratadas con péptidos. Las MSC se incubaron con HK, PS y HKPS en un rango de concentraciones entre 5 y 40 μM en medio IMDM sin suplementos y la viabilidad se determinó 2 h después del tratamiento mediante un ensayo con MTT. Los porcentajes de viabilidad se normalizaron respecto al vehículo con DMSO. Los datos se presentan como el promedio \pm SEM (Non-parametric one-way ANOVA * $p < 0.05$).

Las MSC protegen a las células leucémicas por el contacto célula-célula y en menor medida por la participación de factores solubles.

Mediante ensayos empleando medios condicionados (MeCo) y el sistema TW la viabilidad de las células leucémicas se evaluó después de 3 días de cultivo. Para el primer caso, se obtuvo el sobrenadante de las MSC solas en cultivo o en co-cultivo con ALL-B; estos MeCo se añadieron al inicio del ensayo y 36 h después. Se registraron los cambios en la viabilidad de las células leucémicas a las 24, 48 y 72 h. Las células leucémicas no fueron protegidas por los MeCo e incluso a las 24 h las células mostraron un porcentaje de muerte similar al de las células leucémicas sin soporte y sin MeCo (Fig. 5A, B). Con el tiempo, se incrementó el porcentaje de muerte de las células leucémicas observándose una reducción en la población LIVE/DEAD Aqua negativa (Fig. 5C). De forma interesante, la viabilidad de los blastos que se co-cultivaron directamente con MSC no se vio alterada; después de 72 h de co-cultivo, la viabilidad de las células leucémicas que permanecieron adheridas a las MSC fue del 98%, mientras que las que perdieron la capacidad de adherirse tuvieron un porcentaje de viabilidad de sólo 12% (Fig.5).

PKC en un microambiente leucémico con células MSC: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la resistencia a la quimioterapia en células ALL-B

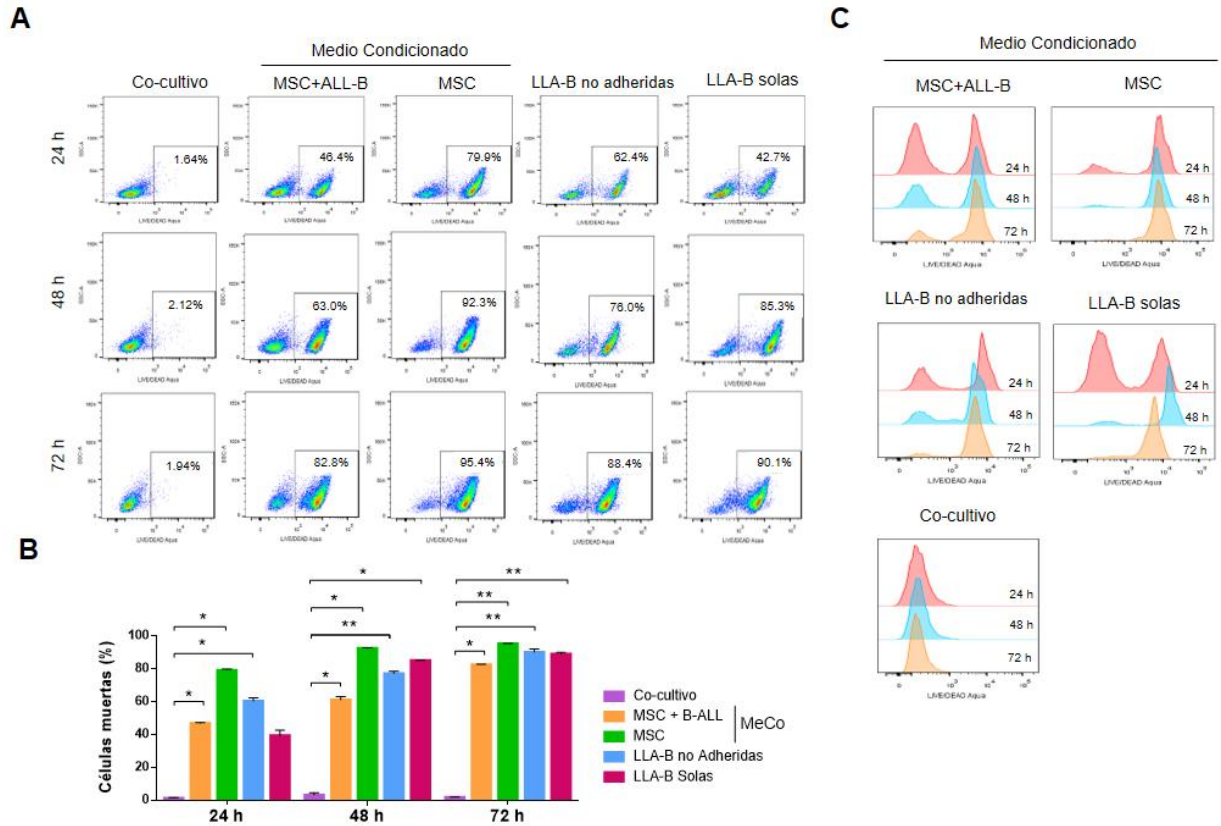


Fig. 5 Efecto de los factores solubles en la supervivencia de las células ALL-B mediante el empleo de medios condicionados. **A)** Evaluación de la viabilidad de células ALL-B por citometría de flujo mediante la marcación con el reactivo LIVE-DEAD Aqua. Los medios condicionados se obtuvieron de MSC solas o de co-cultivos después de 72 h de su establecimiento. Las células ALL-B fueron expuestas a los medios condicionados, con una nueva adición de medio a las 36 h. Las ALL-B no adheridas corresponden a células leucémicas que se recuperaron mediante un lavado con PBS 1X de los co-cultivos. Los porcentajes corresponden a las células CD19+ muertas. **B)** Cuantificación y comparación de los porcentajes de muerte celular en las diferentes condiciones descritas. **C)** Dinámica de cambio de las poblaciones leucémicas vivas (LIVE/DEAD Aqua negativas) y muertas (LIVE/DEAD Aqua positivas) cada 24 h. Los valores se expresan como el promedio \pm SEM (Non-parametric one way ANOVA * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$).

Posteriormente, se empleó el sistema TW para determinar si la producción constante de factores solubles tenía un mayor efecto confiriendo ventajas en la supervivencia de las células leucémicas. Con este fin, se sembraron en la cámara superior del TW células MSC solas o un co-cultivo MSC/ALL-B. A las 24 h de iniciados los ensayos, las células leucémicas en la cámara inferior mostraron una protección en presencia de los factores que provenían del co-cultivo, comparado con las células ALL-

PKC en un microambiente leucémico con células MSC: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la resistencia a la quimioterapia en células ALL-B

B no adheridas; sin embargo, con el tiempo dicho efecto no se mantuvo; a las 48 h, el porcentaje de muerte de las células ALL-B que habían estado expuestas a los factores presentes en el co-cultivo alcanzaron el 70%, casi el doble de lo observado 24 h antes. Las células leucémicas a las 48 y 72 h mostraron porcentajes de muerte similares a los de los blastos sin soporte. Nuevamente, las células en contacto directo con MSC conservaron su viabilidad a través del tiempo en alrededor de un 98% (Fig. 6A, B). En esta condición únicamente se identificó la población LIVE/DEAD Aqua negativa (células vivas), la cual no se redujo durante los tres días del experimento, como si se observó para las demás condiciones (Fig. 6C). Los resultados anteriores sugieren que los factores solubles inducidos por el co-cultivo sólo contribuyen en menor medida a la supervivencia de las células leucémicas en las primeras 24 h y únicamente el contacto directo entre MSC y células ALL-B es esencial en el sostenimiento de la supervivencia de las células leucémicas a través del tiempo.

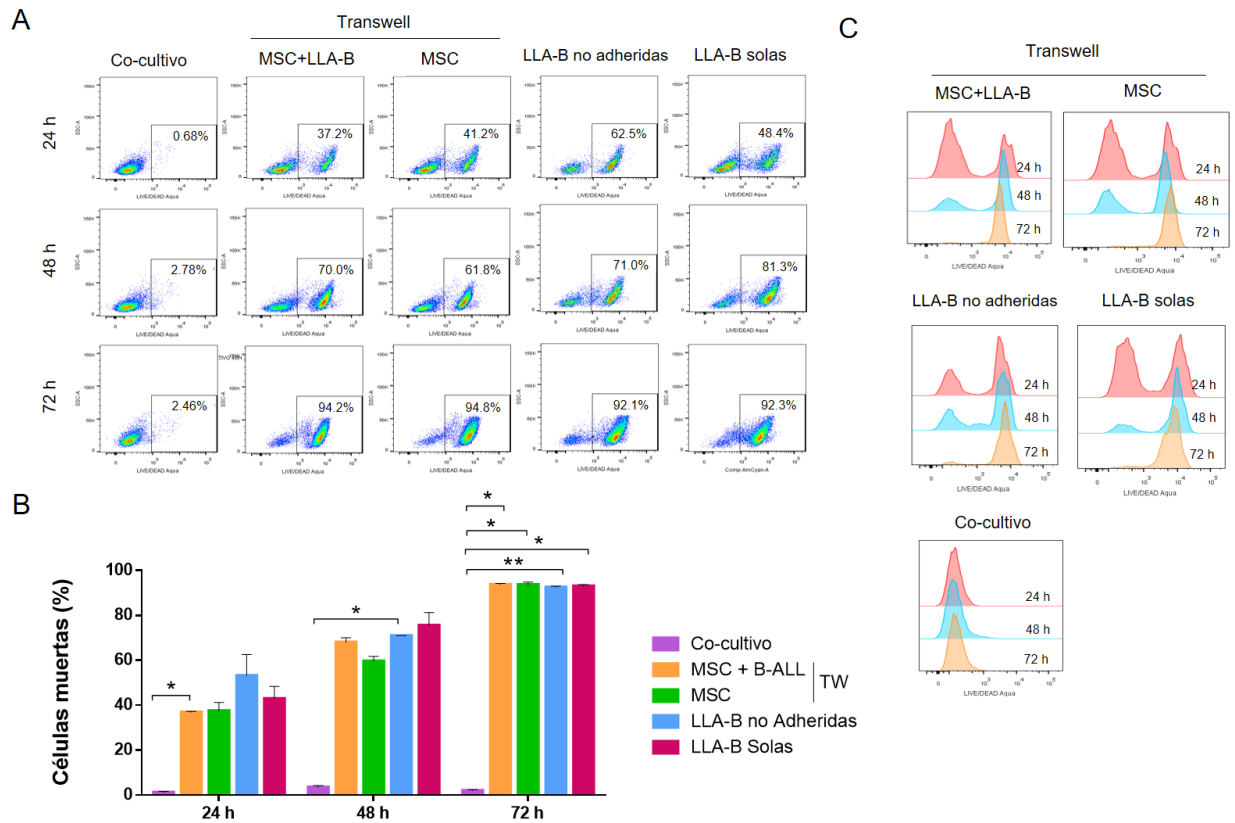


Fig. 6 Efecto de los factores solubles en la supervivencia de las células ALL-B mediante el uso de sistemas *Transwell*. A) Evaluación por citometría de flujo de la viabilidad de células ALL-B durante 24, 48 y 72 h. Las células leucémicas se sembraron en la parte inferior del TW y se expusieron a los factores solubles de células MSC o MSC co-cultivadas con ALL-B y dispuestas en la cámara superior del inserto. Las células ALL-B no adheridas corresponden a la fracción recuperada de los co-cultivos después de un lavado con PBS 1X. Después de los tiempos indicados, las células se colectaron y marcaron doblemente con CD19 y el reactivo LIVE

PKC en un microambiente leucémico con células MSC: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la resistencia a la quimioterapia en células ALL-B

DEAD Aqua para su análisis. **B)** Cuantificación de los porcentajes de células muertas en las condiciones señaladas. **C)** Dinámica de cambio a través del tiempo de las poblaciones de células leucémicas vivas (LIVE/DEAD Aqua negativas) y muertas (LIVE/DEAD Aqua positivas). Los datos representan el promedio \pm SEM (Non-parametric one-way ANOVA * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

La inhibición de PKC en las MSC disminuye la adhesión de las células leucémicas

Los hallazgos anteriores confirmaron el papel indispensable de las MSC en la viabilidad de las células leucémicas. Además, se estableció que las muestras primarias de pacientes ALL-B tenían una capacidad de adhesión mayor que la de algunas líneas celulares leucémicas, indicando que las primeras podrían depender mucho más del contacto directo al soporte para su supervivencia. Se investigó si el tratamiento con el inhibidor de PKC ENZA, alteraba la interacción entre MSC y células de ALL-B. Para esto las MSC se trataron 48 h con ENZA en presencia de SFB al 10 o al 1% y la adhesión de las células leucémicas se determinó en el co-cultivos de 6 h después del tratamiento. Casi el doble de células leucémicas no adheridas, se recuperaron de los co-cultivos donde se inhibió PKC con ENZA respecto al control no tratado. Los cambios en la adhesión fueron evidentes después de la tinción con cristal violeta de las células MSC y leucémicas del co-cultivo. Las diferencias fueron estadísticamente significativas cuando el tratamiento con el inhibidor se administró a una baja concentración de SFB (Fig. 7A, B).

También se determinó el efecto de HKPS, los péptidos control y ESTAU sobre la capacidad de las células leucémicas para adherirse a las MSC. Éstas se trataron por 2 h en ausencia de SFB y cumplido el tiempo se adicionó SFB 1% hasta completar las 48 h de tratamiento, luego se co-cultivaron con células ALL-B por 6 h. HKPS 40 μ M y ENZA 40 μ M tuvieron el mismo efecto. En ambas condiciones cerca de un 30% de las células ALL-B no se adhirieron al soporte, eso fue significativamente mayor que lo observado para el vehículo y las células no tratadas, donde menos de un 10% eran células no adheridas. Los péptidos HK, PS and HKPScr no tuvieron ningún efecto (Fig. 7C). Se observaron cambios morfológicos en las MSC después del tratamiento con los inhibidores de PKC, y aunque el tratamiento con ESTAU afectó considerablemente la morfología de las MSC, este compuesto no alteró la capacidad de adherirse de las células ALL-B (Fig. 7D).

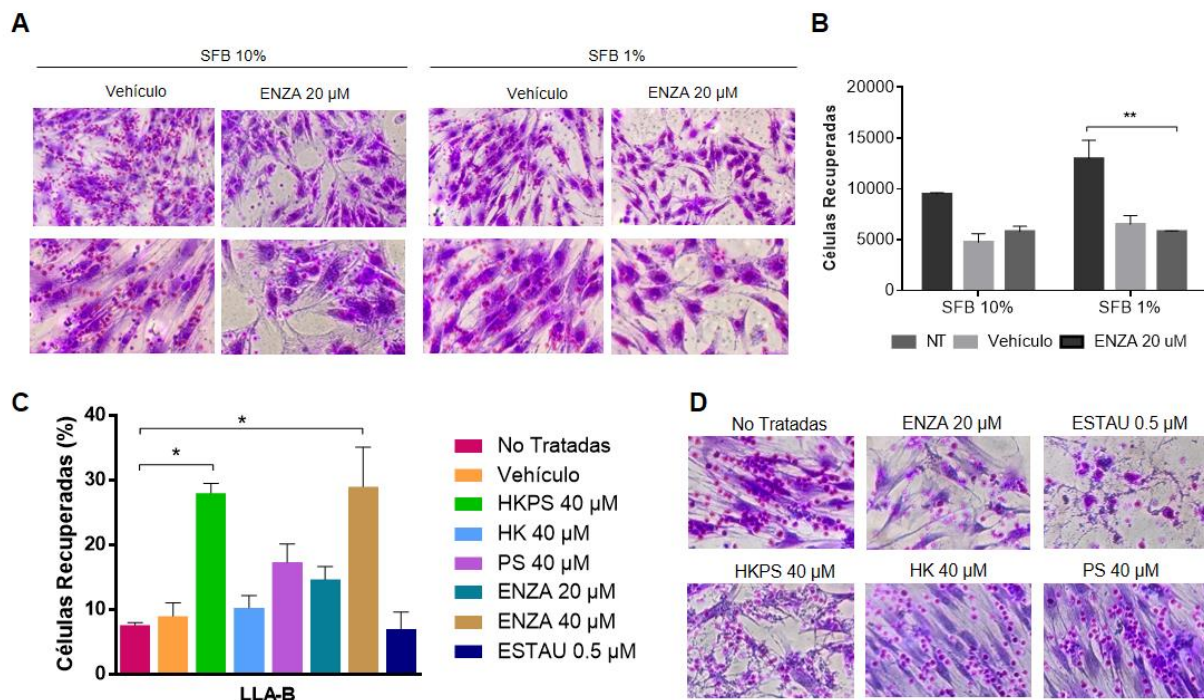


Fig. 7 Cambios en la adhesión de las células ALL-B por el tratamiento del soporte con ENZA y HKPS. A) Microfotografías de las células en el nicho leucémico después de la inhibición de PKC en las MSC con ENZA. Las MSC se pre-trataron 48 h con 20 μM de ENZA a diferentes concentraciones de SFB, los co-cultivos con ALL-B se establecieron posterior al tratamiento por 6 h. Cumplido el tiempo, las células leucémicas no adheridas se retiraron mediante un lavado con PBS 1X y el co-cultivo fue teñido con cristal violeta. Magnificación 20 y 40x **B)** Cuantificación de las células leucémicas recuperadas con el lavado después de las 6 h de co-cultivo. Los conteos se hicieron empleando exclusión con azul de tripán en cámara de Neubauer. **C)** Porcentajes de células recuperadas después del pre-tratamiento de las MSC con los inhibidores ENZA, ESTAU y los péptidos HK, PS, HKPS a las concentraciones indicadas y el co-cultivo con ALL-B. **D)** Microfotografías de los co-cultivos después de la remoción de las células leucémicas y tinción con cristal violeta. Magnificación 40x. Los datos de las gráficas de barras se presentan como el promedio ± SEM (Non-parametric one-way ANOVA *p<0.05, **p<0.01).

La interacción entre MSC y células ALL-B promueve cambios en moléculas de adhesión que son inhibidos por HKPS.

Teniendo en cuenta que la interacción directa entre la célula leucémica y su soporte mesenquimal es indispensable para la supervivencia de las células ALL-B y que el efecto observado en la reducción de la viabilidad cuando se inhibe PKC en las MSC ocurre con la pérdida de la capacidad de adherencia de las células leucémicas, se evaluó la expresión de 6 moléculas de adhesión que son relevantes en el

PKC en un microambiente leucémico con células MSC: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la resistencia a la quimioterapia en células ALL-B

microambiente de la MO. Los cambios en la expresión de VLA-4, VLA-5, ICAM-1, VCAM, CXCR4 y CD44 se determinaron por citometría de flujo. Con excepción de VCAM que no se expresó en las células leucémicas, tanto MSC como las células ALL-B expresaron las moléculas evaluadas en ausencia del soporte; sin embargo, en las MSC hubo un aumento en la expresión de las moléculas ICAM-1, VLA-5 y CXCR4 6 h después de ser co-cultivadas con ALL-B (Fig. 8A). CXCR4 también se sobre-expresó en las células leucémicas en presencia del soporte (Fig. 8B).

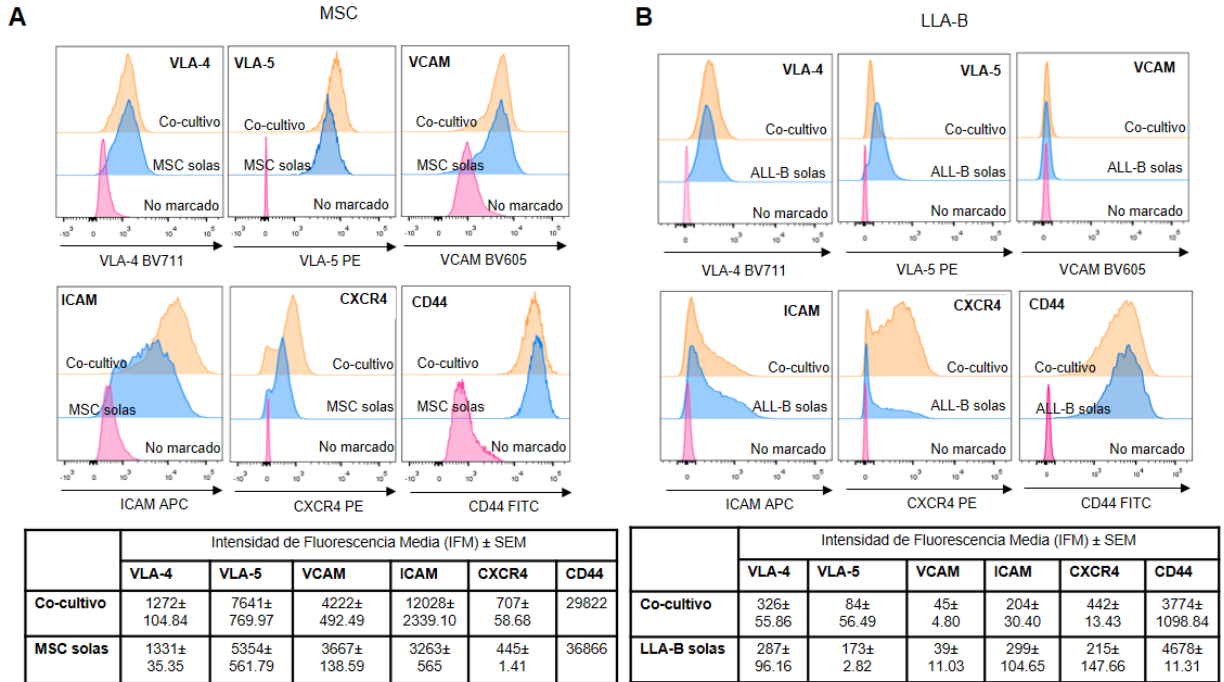


Fig. 8 Cambios en la expresión de moléculas de adhesión en células ALL-B y MSC posterior al co-cultivo.

A) Variaciones en la expresión de VLA-4, VLA-5, VCAM, ICAM-1, CXCR4 y CD44 en MSC en presencia y ausencia de células leucémicas. Las células MSC se co-cultivaron por 6 h con células ALL-B, después se recolectaron por tripinización y se marcaron con los diferentes anticuerpos para las moléculas de adhesión que se indican y para los marcadores CD19 y CD105, para distinguir las poblaciones leucémicas y mesenquimales del co-cultivo, respectivamente. **B)** Cambios en la expresión de las moléculas indicadas anteriormente en células leucémicas con y sin soporte mesenquimal. Los datos se presentan como el promedio de la IFM ± SEM de tres experimentos independientes.

Se evaluó si el tratamiento con HKPS cambiaba la expresión de las 6 moléculas de adhesión anteriormente mencionadas. Se halló de forma muy importante que el tratamiento con HKPS redujo la expresión en las MSC de ICAM-1 y VLA-5 (Fig. 9A), dos de las moléculas que se habían encontrado sobre-expresadas en el co-cultivo. Los tratamientos con ENZA o ESTAU en las células ALL-B, no

PKC en un microambiente leucémico con células MSC: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la resistencia a la quimioterapia en células ALL-B

afectaron de la misma forma la expresión de estas moléculas. Los resultados descritos indican que HKPS afecta la capacidad de las células ALL-B de adherirse al soporte a través de una desregulación de la expresión de moléculas esenciales en la interacción célula-célula.

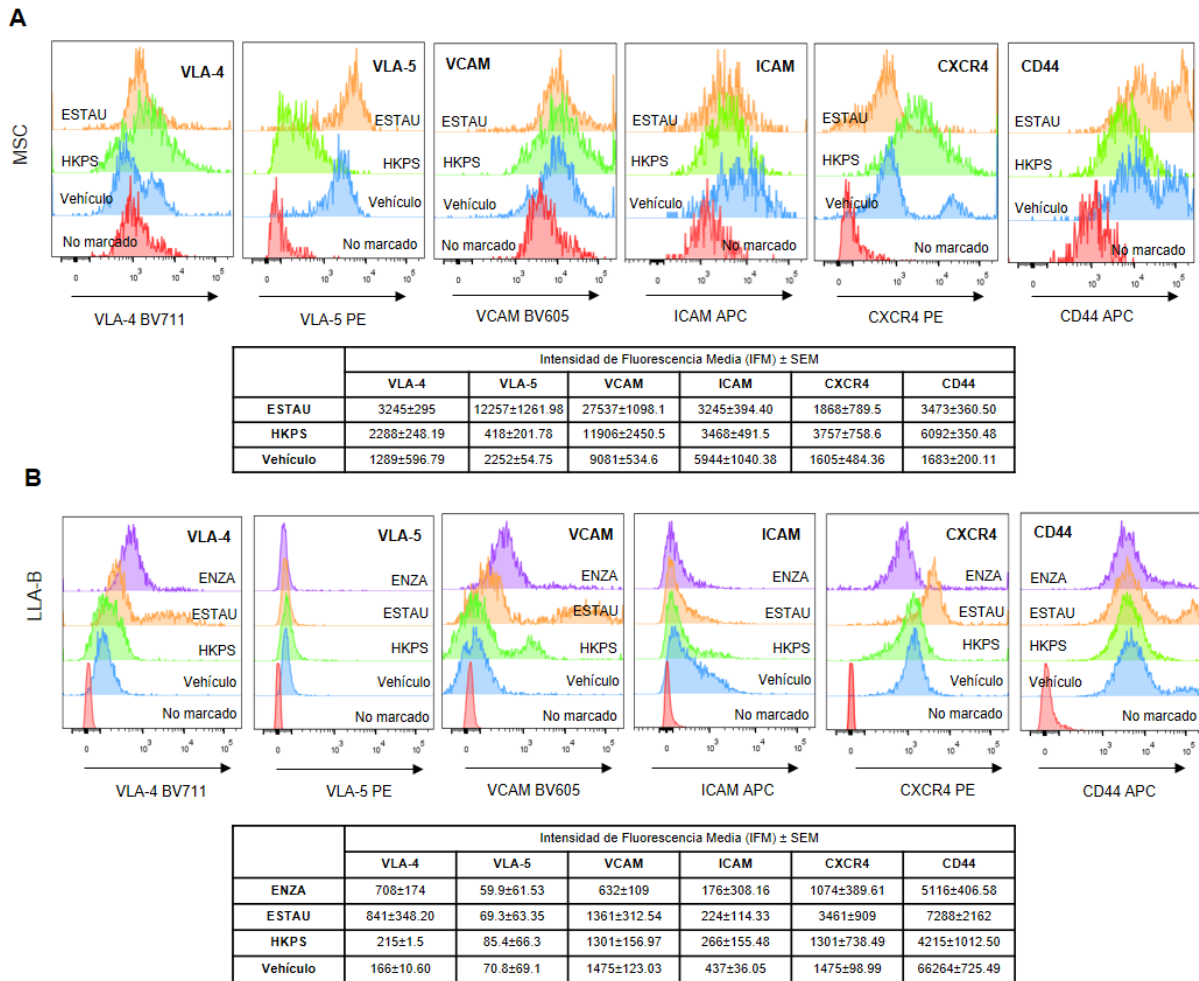


Fig. 9 Cambios en la expresión de moléculas de adhesión en el co-cultivo por inhibición de PKC con HKPS. A) Efecto de HKPS en la expresión de VLA-A, VLA-5, VCAM, ICAM, CXCR4 y CD44 en células MSC. Las MSC se pre-trataron por 2 h con HKPS 40 μ M, ENZA 20 μ M, ESTAU 1 μ M o DMSO y se co-cultivaron con células ALL-B por 6 h, luego se tripsinizaron, recogieron y marcaron con los respectivos anticuerpos para las moléculas de adhesión para su análisis por citometría de flujo. Las poblaciones de células leucémicas y MSC se identificaron mediante la marcación de los co-cultivos con CD19 y CD105, respectivamente. **B)** Las células ALL-B recuperadas después de la tripsinización de los cocultivos con MSC se marcaron para evaluar la expresión de las moléculas indicadas en la población de células CD19+.

PKC en un microambiente leucémico con células MSC: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la resistencia a la quimioterapia en células ALL-B

La interacción entre las células ALL-B y MSC activa las vías de señalización AKT, FAK y NF- κ B en las MSC.

En modelos de microambiente leucémico, se ha reportado que a través de las integrinas se activan diferentes rutas de señalización que favorecen la supervivencia de la célula tumoral. Por ejemplo, en AML, el contacto celular, induce la activación de las rutas de señalización que involucran ILK/AKT, ERK1/2, y STAT3 (Tabe, 2007). Debido a que la interacción directa entre las células leucémicas y su soporte mesenquimal favorecía la supervivencia de las leucémicas a través de cambios en la expresión de moléculas de adhesión, y considerando además que HKPS inhibía su expresión, se evaluaron diferentes rutas de señalización con el propósito de ahondar en los posibles mecanismos que podrían explicar este efecto.

El estado de fosforilación de diferentes residuos de aminoácidos en moléculas que participan en las rutas de señalización de NF- κ B, STAT3, ERK1/2, AKT y FAK se determinó por citometría de flujo después de 2 y 4 h de contacto directo entre las MSC y las ALL-B. Los cambios en la activación de las diferentes rutas de señalización evaluadas se observaron principalmente en las MSC, donde muy temprano (2 h) se evidenció un incremento en la fosforilación de NF- κ B, AKT y FAK (Fig. 10A). FAK también se activó en las células leucémicas después del contacto con el soporte (Fig. 10B). La activación de estas rutas fue transitoria, pues en las MSC co-cultivadas con células leucémicas a las 4 h, el estado de fosforilación respecto a las MSC solas fue similar para todas las moléculas (Fig.10).

PKC en un microambiente leucémico con células MSC: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la resistencia a la quimioterapia en células ALL-B

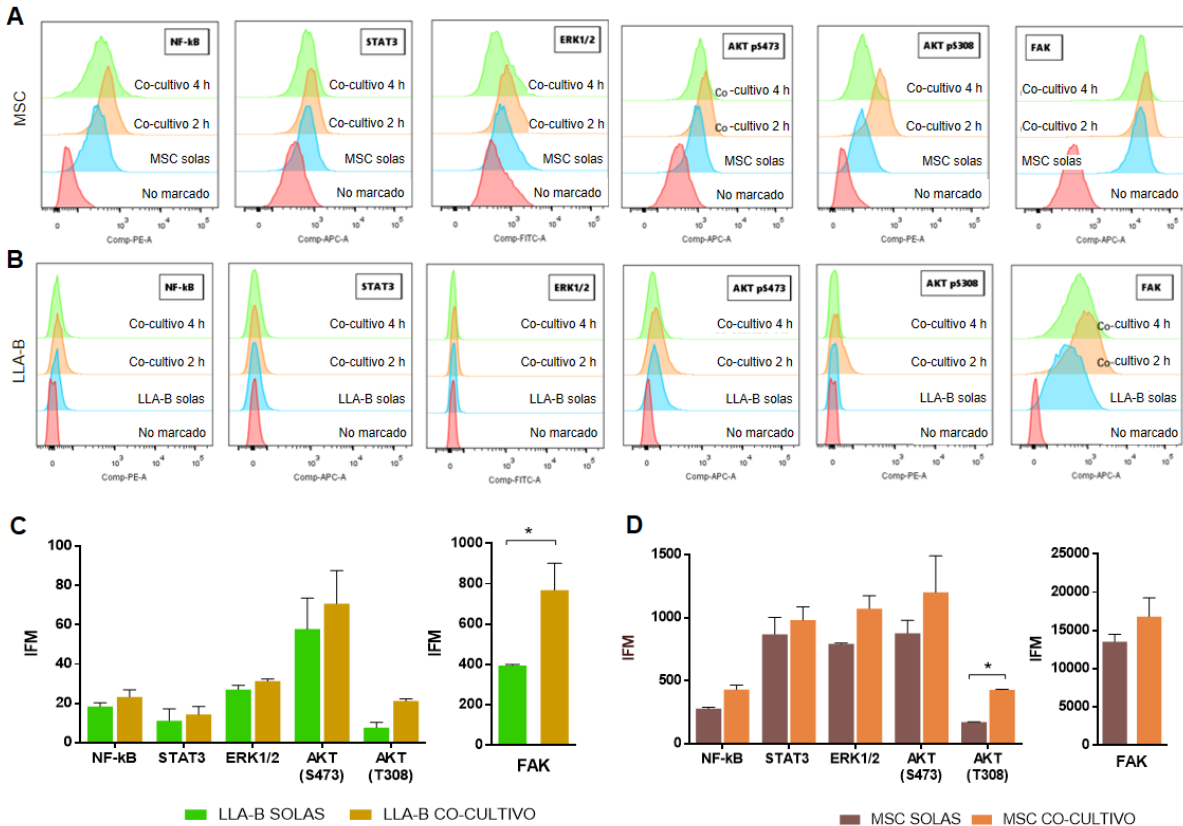


Fig. 10 Influencia del contacto directo sobre la activación de diferentes vías de señalización en células ALL-B y MSC. **A)** Evaluación por citometría de flujo de las rutas NF- κ B, STAT3, ERK1/2, AKT y FAK en MSC. Las MSC fueron co-cultivadas por 2 y 4 h con células aisladas de un paciente con ALL-B y después se fijaron y permeabilizaron para determinar el estado de activación de las rutas, mediante marcación intracelular con anticuerpos dirigidos hacia residuos fosforilados de las diferentes vías. Como control se emplearon células MSC en ausencia de células leucémicas. **B)** Cambios en las rutas de señalización antes mencionadas en las células leucémicas en presencia del soporte mesenquimal a las 2 y 4 h. **C, D)** Valores de intensidad de fluorescencia media para las células ALL-B y MSC solas y después de 2 h de co-cultivo.

Con el fin de confirmar esos resultados y determinar en detalle cómo respondían a nivel molecular las células MSC en presencia de las leucémicas y cuáles podrían ser los mecanismos que soportarían la supervivencia de células ALL-B, se evaluó mediante dos microarreglos la expresión de 41 proteínas asociadas con la ruta NF- κ B, así como el estado de fosforilación de 43 quinasas. En el primer caso, se confirmó un incremento en la activación de la ruta NF- κ B, encontrándose en las MSC que habían sido co-cultivadas con células ALL-B la expresión aumentada de IKK, NF- κ B1/2 y la activación de p65 (Fig. 11A). Además, se encontraron sobre-expresadas proteínas como IL-1R e IRAK, ambas relacionadas con la activación de NF- κ B a través de IL-1. Otras moléculas de la familia STAT que cooperan con el

PKC en un microambiente leucémico con células MSC: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la resistencia a la quimioterapia en células ALL-B

factor NF- κ B para promover la expresión de citoquinas importantes en la inflamación también se sobre-regularon. De forma interesante y en concordancia con esto, las MSC co-cultivadas con células leucémicas mostraron una reducción respecto a las MSC solas, en la expresión de los inhibidores IKB α e IKB ϵ encargados que impedir la translocación de p65 y p50 al núcleo. Las MSC en condiciones de monocultivo, expresaron el triple de IKB α y el doble de IKB ϵ (Fig. 11B, 21B). Los anteriores resultados apoyan el papel de la activación de la ruta NF- κ B en las MSC producto de la interacción directa con las células leucémicas a través de diferentes moléculas que median su adhesión al soporte.

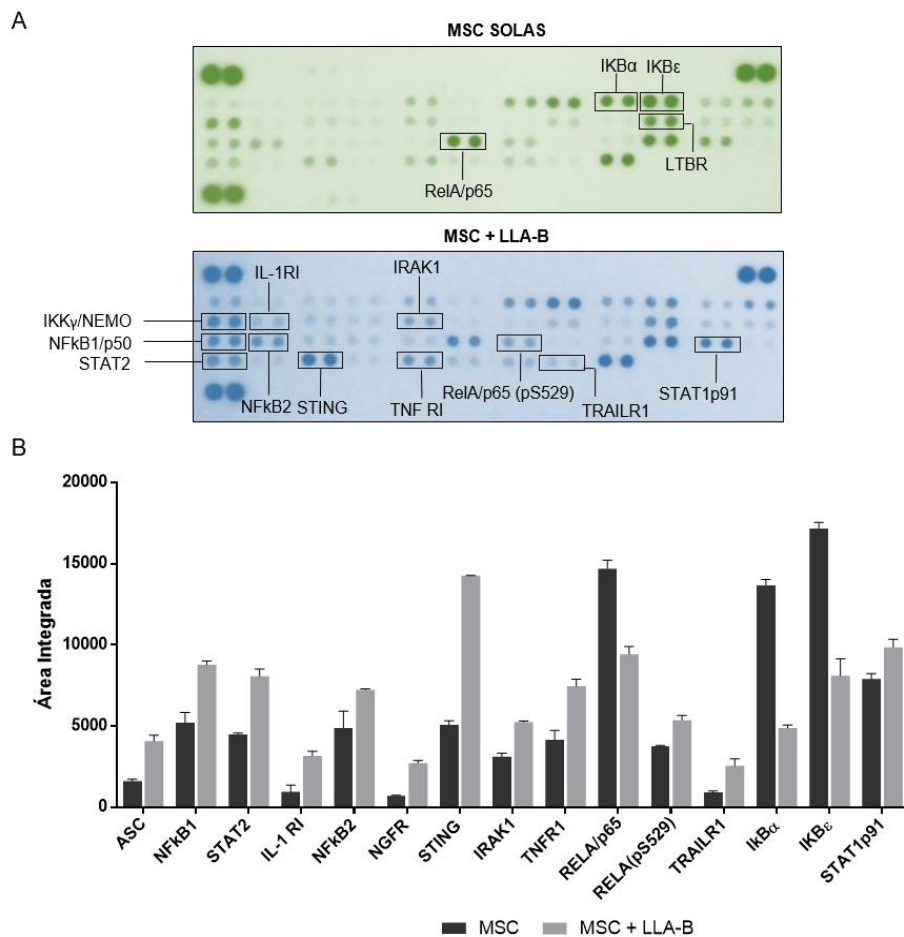
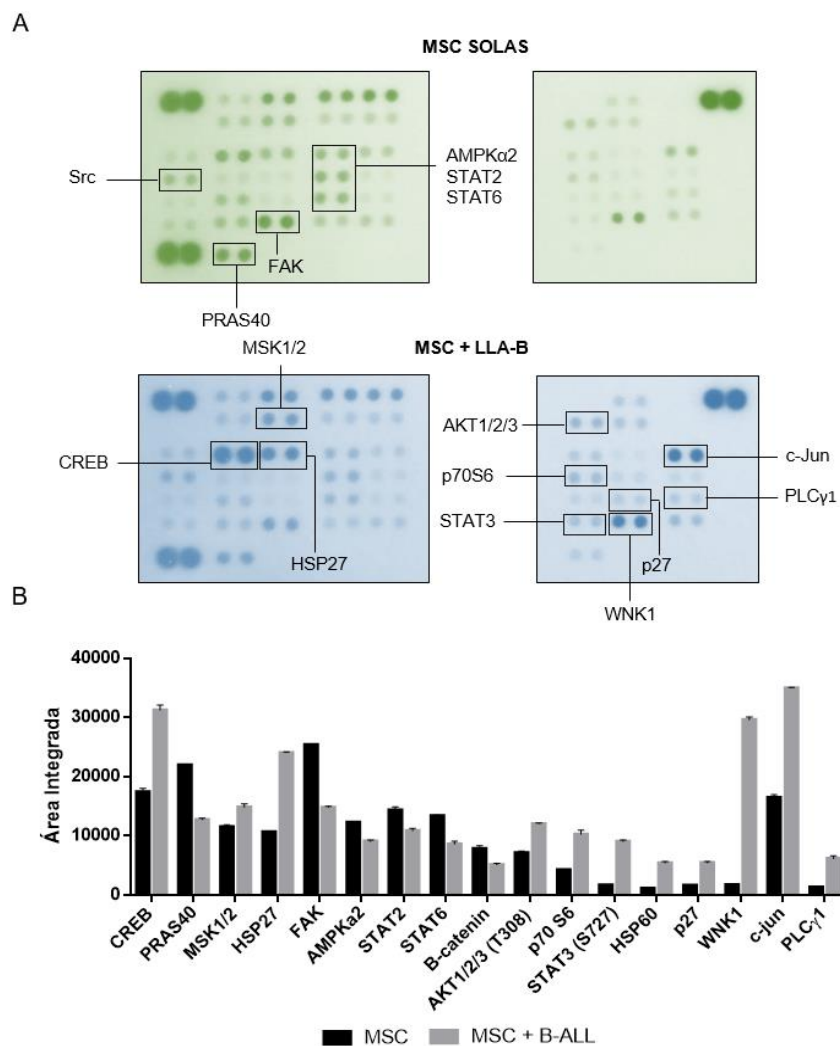


Fig. 11 Cambios en la expresión y activación de diferentes moléculas asociadas con la transducción de la señalización de la ruta NF- κ B. A) Variaciones en el perfil de expresión de 41 moléculas y 4 sitios de activación en MSC solas y MSC co-cultivadas con células ALL-B. Las membranas del arreglo se incubaron con 200 ug de extracto de proteína, obtenidos por lisis celular inmediatamente después de 2 h de co-cultivo de las células. En los recuadros se señalan las moléculas que se incrementan en cada caso. **B)** Cuantificación de la expresión de las moléculas con mayor variación después del co-cultivo. El área integrada se determinó teniendo

PKC en un microambiente leucémico con células MSC: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la resistencia a la quimioterapia en células ALL-B

en cuenta la densidad de cada uno de los puntos. Las barras corresponden al SEM de los puntos por duplicado, se muestran las moléculas que más variación presentaron respecto al control.

En condiciones similares, extractos de proteína de MSC solas y MSC co-cultivadas con células ALL-B se analizaron para determinar el estado de fosforilación de 43 quininas diferentes. Se encontró que la interacción directa entre las MSC y las células leucémicas induce la activación de AKT (pS308) como se había hallado en los ensayos de citometría; además, STAT3, WNK1, p27, p70, HSP27, MSK y los factores CREB y c-Jun que podrían jugar también un papel importante en la protección conferida por las MSC (Fig. 12A, B). Por el contrario, los niveles de fosforilación de otros miembros de la familia STAT (2 y 6), Src, AMPK α 2 y PRAS40 se vieron reducidos en estas células en relación con las MSC solas. Contrario a lo observado en los resultados por citometría, FAK se encontró mayormente activada en las MSC solas, esta aparente discrepancia puede deberse al residuo fosforilado evaluado, que para las dos técnicas es distinto.



PKC en un microambiente leucémico con células MSC: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la resistencia a la quimioterapia en células ALL-B

Fig. 12 Cambios en la activación diferentes fosfoquinasas por interacción de las MSC con células ALL-B

A) Variaciones en el estado de fosforilación de 43 quinasas en MSC solas y MSC co-cultivadas con células ALL-B. Las membranas del arreglo se incubaron con 350 ug de extracto de proteína, obtenidos por lisis celular inmediatamente después de 2 h de co-cultivo de las células. En los recuadros se señalan las moléculas que se incrementan en cada caso. **B)** Cuantificación de la expresión de las moléculas con mayor variación después del co-cultivo. El área integrada se determinó teniendo en cuenta la densidad de cada uno de los puntos. Las barras corresponden al SEM de los puntos por duplicado, se muestran las moléculas que más variación presentaron respecto al control.

Después de establecer que algunas rutas de señalización eran relevantes en el co-cultivo, se determinó por citometría de flujo si el tratamiento con HKPS afectaba en alguna medida su activación. Las células MSC se pre-trataron con HKPS, HK, ENZA o el vehículo (DMSO) y después de 2 h de tratamiento se co-cultivaron con células leucémicas de un paciente por 2 h adicionales. No se observaron cambios en la activación de las rutas evaluadas en las células leucémicas, pero si un incremento leve en la fosforilación de FAK y de AKT (pS473) en las MSC después del pre-tratamiento con HKPS y el co-cultivo con las células de ALL-B (Fig. 13).

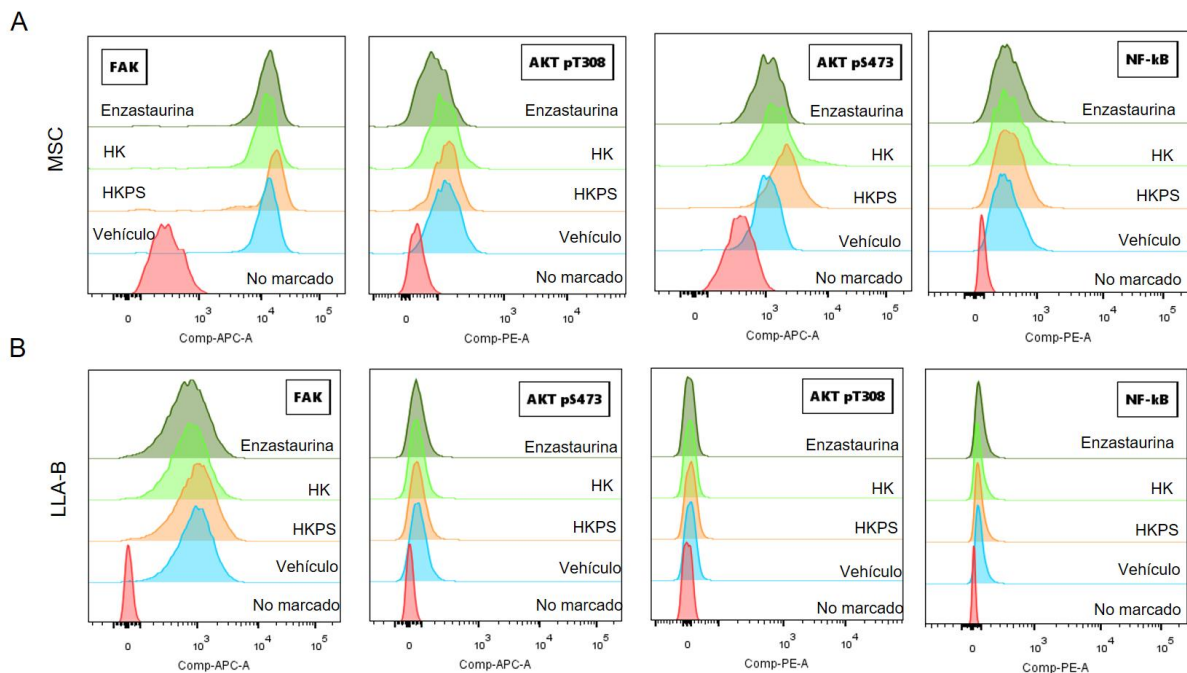


Fig. 13. Cambios en la señalización intracelular de células ALL-B y MSC por tratamiento con HKPS. A)

Análisis por citometría de flujo de las rutas FAK, AKT y NF-κB activadas por el contacto directo después de la inhibición de PKC en el soporte. Las células MSC fueron pre-tratadas por 2h con ENZA 20 μM, HK, HKPS (40

PKC en un microambiente leucémico con células MSC: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la resistencia a la quimioterapia en células ALL-B (μM) o el vehículo, el tratamiento se retiró y las MSC fueron co-cultivadas por 2 h con células leucémicas. Las células del co-cultivo se tripsinizaron, recogieron, fijaron, permeabilizaron y marcaron con anticuerpos intracelulares específicos para residuos fosforilados como se indica. **B)** Evaluación de las rutas mencionadas en la población de células ALL-B co-cultivadas con MSC como se indicó en A.

La inhibición de PKC en las MSC reduce la viabilidad de las células leucémicas y las hace más susceptibles a la quimioterapia.

Considerando que las MSC no sólo promueven la supervivencia sino también la quimiorresistencia de las células leucémicas a diferentes fármacos de uso convencional, evaluamos si la afectación del soporte con el péptido HKPS además incrementaba la susceptibilidad de las células de ALL-B al tratamiento con DEXA, VINC y MTX, tres medicamentos empleados en las fases de inducción, consolidación y mantenimiento de la quimioterapia.

Para DEXA, se hicieron algunas evaluaciones preliminares mediante ensayos de citotoxicidad con MTT, empleando inicialmente dos líneas celulares leucémicas (SUP-B15; RS4;11) para determinar las concentraciones efectivas que reducían > 50% la viabilidad de las células (Fig. 14A, B). Adicionalmente, se determinó que la reducción del porcentaje de SFB en el período de tratamiento, aumentaba la sensibilidad de las líneas leucémicas a la quimioterapia. Esos resultados permitieron tomar algunas decisiones respecto a las concentraciones a emplear y las condiciones de tratamiento con el quimioterapéutico. Se escogieron 3 muestras de pacientes con ALL-B para hacer la misma evaluación, tratando las células por 6 h; esto teniendo en cuenta que como se demostró al inicio que las células leucémicas mueren sin soporte mesenquimal. Se encontró que las células ALL-B de pacientes mostraron una sensibilidad al tratamiento similar a la línea celular SUP-B15 (Fig. 14C).

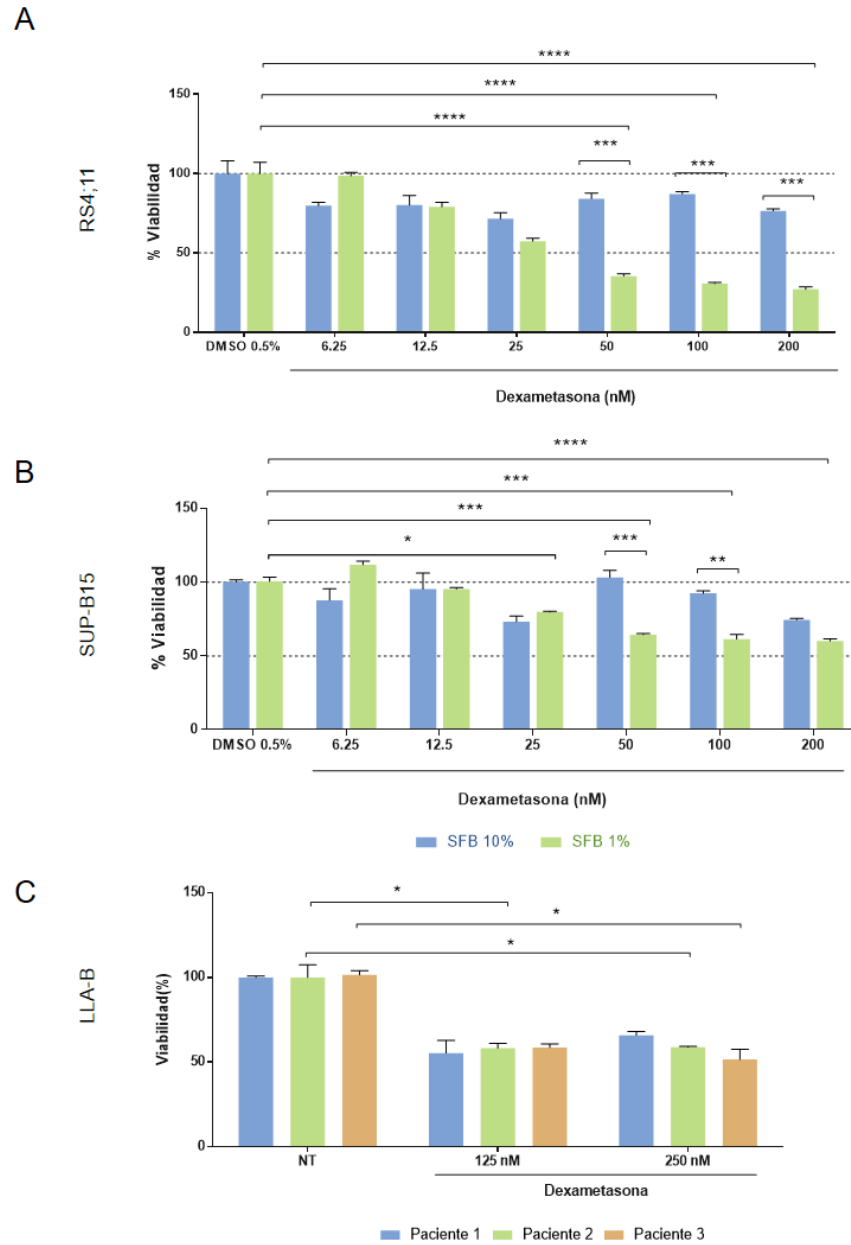


Fig. 14. Efecto de DEXA en la viabilidad de líneas celulares de ALL-B y muestras de pacientes. A) Porcentajes de viabilidad en células de la línea RS4;11 después de 6 h de tratamiento con DEXA. Las células se trataron con el compuesto en un rango de concentraciones de entre 0-200 nM y su viabilidad se determinó mediante el ensayo con MTT. **B)** Células de la línea SUP-B15 tratadas con DEXA como se indicó en A. **C)** Tres muestras de pacientes se trataron a dos concentraciones del quimioterapéutico DEXA considerando los resultados en las líneas celulares. Los datos se presentan como el promedio \pm SEM (Ordinary two way ANOVA (A, B) Non-parametric one-way ANOVA (C) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

Después se evaluó la capacidad del soporte mesenquimal de conferir protección a las células leucémicas en presencia de DEXA y el efecto de HKPS en esa función. Se encontró que el tratamiento

PKC en un microambiente leucémico con células MSC: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la resistencia a la quimioterapia en células ALL-B

de MSC con HKPS durante 2 h mostró un aumento en la muerte celular en células ALL-B, mostrando la afectación en la capacidad de soporte de las MSC. Al tratar las células ALL-B con DEXA y ponerlas sobre las MSC pre-tratadas con HKPS, se observó un incremento de cerca del 10% en la muerte de las células leucémicas. El efecto de HKPS y del inhibidor de PKC ENZA fue muy parecido, enfatizando la importancia de la enzima en la funcionalidad del soporte (Fig. 15A). Las mismas evaluaciones se llevaron a cabo empleando 4 muestras de pacientes diferentes, los cuales habían presentado diferentes porcentajes de enfermedad mínima residual al final de la quimioterapia. Independientemente de la respuesta al tratamiento *in vivo*, se observó la misma sensibilidad aumentada de las células leucémicas al tratamiento con DEXA después de la inhibición de PKC en las MSC (Fig. 15B).

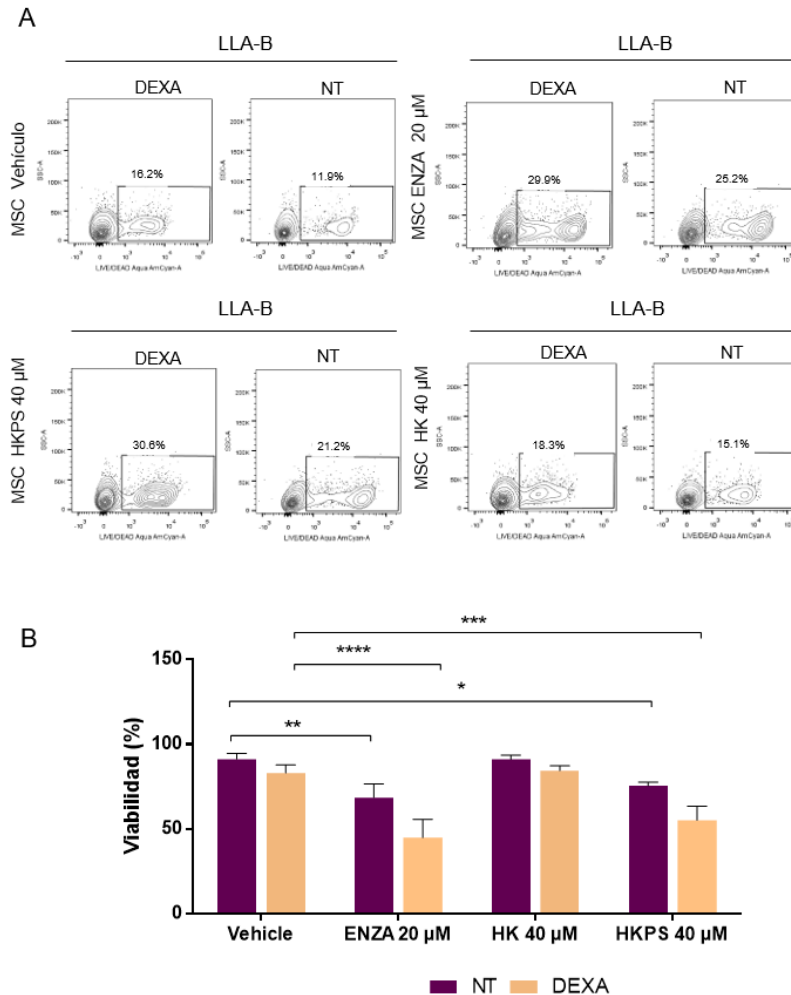
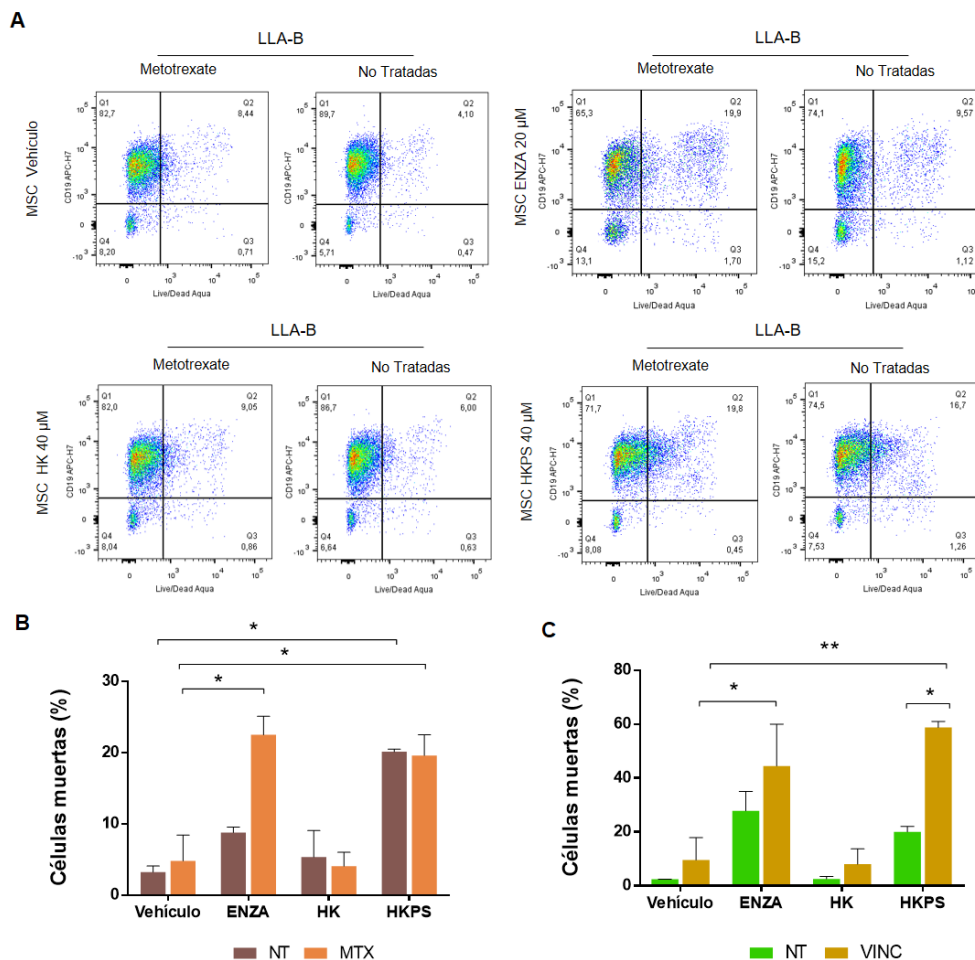


Fig. 15 Determinación de cambios en la viabilidad de células ALL-B en respuesta al tratamiento con DEXA después de la inhibición del soporte con HKPS. A) Porcentajes de células muertas después del pre-tratamiento de las MSC con inhibidores de PKC y el co-cultivo con células leucémicas tratadas o no con DEXA.

PKC en un microambiente leucémico con células MSC: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la resistencia a la quimioterapia en células ALL-B

Las MSC se trataron 2 h con ENZA, HK, HKPS o el vehículo como se indica y las células leucémicas tratadas 6 h con DEXA (250 nM) fueron co-cultivadas con las MSC. Tres días después del establecimiento de los co-cultivos, las células se recogieron y marcaron doblemente con CD19 y el reactivo LIVE/DEAD Aqua para su posterior análisis por citometría de flujo. **B)** Porcentajes de viabilidad de las células leucémicas de 4 muestras diferentes de pacientes con ALL-B tratadas de acuerdo a lo descrito anteriormente. Los datos se presentan como el promedio \pm SEM (Two-way ANOVA * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

Un efecto parecido se observó cuando después de la inhibición del soporte con HKPS, las células leucémicas se trataron con MTX (Fig. 16) o VINC. En las células tratadas con el quimioterapéutico, se determinó que el tratamiento del soporte con HKPS incrementó la susceptibilidad de las células leucémicas CD19+ a VINC, el porcentaje de muerte de las células leucémicas cuando se tratan las MSC con una concentración de 40 μ M, se incrementa en más del doble. Estos resultados muestran que el uso combinado de HKPS con la quimioterapia podría ser más eficaz en erradicar poblaciones menos susceptibles al tratamiento convencional.



PKC en un microambiente leucémico con células MSC: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la resistencia a la quimioterapia en células ALL-B

Fig. 16 Efecto de otros quimioterapéuticos en la sensibilidad de células ALL-B después de la inhibición de PKC en el soporte. A) Cambios en la viabilidad de células ALL-B tratadas o no con MTX, en presencia de MSC tratadas con HK, HKPS o ENZA. Las células leucémicas se pre-trataron o no por 6 h con MTX (6.25 μ M) y se co-cultivaron por 3 días adicionales sobre una monocapa de MSC pre-tratada 2 h con el vehículo (DMSO 0.4%), ENZA 20 μ M, HK 40 μ M o HKPS 40 μ M. Las células de los co-cultivos se recolectaron mediante tripsinización y se marcaron con CD19 y el reactivo LIVE/DEAD Aqua para su posterior análisis por citometría de flujo. **B)** Porcentajes de células CD19+ LIVE/DEAD Aqua positivas (muertas) después de la inhibición del soporte y en presencia o no de MTX. **C)** Cambios en la viabilidad de células ALL-B tratadas o no con VINC y co-cultivadas con MSC tratadas con HKPS o el vehículo. Las células leucémicas se pre-trataron o no por 6 h con VINC (250 nM) se co-cultivaron por 3 días de la misma forma como se indicó en A.

HKPS disminuye la actividad ALDH en las MSC.

Se ha reportado que las células que tienen una actividad elevada de la enzima ALDH pueden ser menos susceptibles a la quimioterapia. Este fenómeno se ha observado especialmente en poblaciones *stem* leucémicas (LSC) en AML (Venton et al., 2016). Se determinó la actividad ALDH en células ALL-B en el co-cultivo y en presencia del quimioterapéutico DEXA. La inhibición del soporte con HKPS, ENZA o PS no se tradujo en ningún cambio en los porcentajes de actividad enzimática en las células leucémicas (Anexo, Fig. S4). Sin embargo, de forma interesante en las MSC, el tratamiento con HKPS disminuyó la población de células con actividad ALDH, independientemente de si además se había realizado el tratamiento con DEXA en el co-cultivo (Fig. 17), el mismo resultado se observó en otro ensayo independiente (Anexo, Fig. S5). Cuando el soporte se trató con ENZA o PS y se expuso el co-cultivo a la quimioterapia hubo un aumento de ALDH en las MSC. Esto sugiere que las funciones *stem* están siendo afectadas en las MSC por HKPS, un hecho relevante teniendo en cuenta que su papel en el microambiente leucémico va más allá del sólo soporte de las células leucémicas.

PKC en un microambiente leucémico con células MSC: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la resistencia a la quimioterapia en células ALL-B

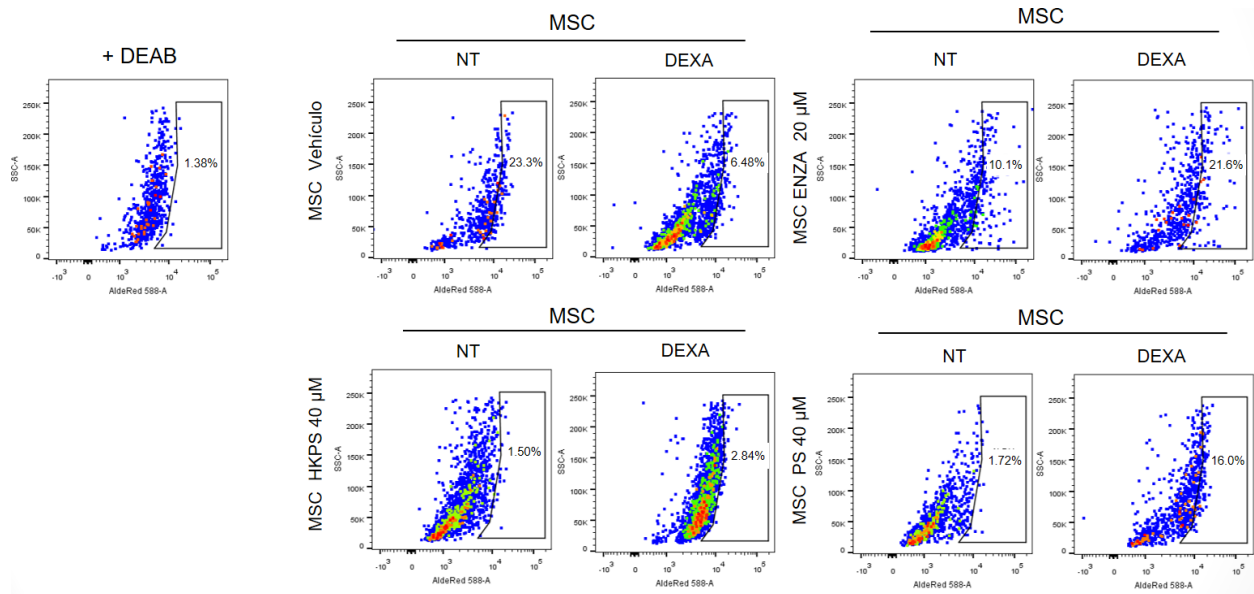


Fig. 17 Efecto de la inhibición del soporte con HKPS y la quimioterapia en la actividad ALDH. A) Cambios en el porcentaje de células MSC con actividad ALDH. Las MSC se pre-trataron 2 h con ENZA, HKPS, PS y el vehículo a las concentraciones indicadas. Se retiraron los tratamientos y se establecieron los co-cultivos con células ALL-B de un paciente por 72 h. Los co-cultivos fueron tratados o no con DEXA (250 nM) durante los 3 días. Los co-cultivos se recogieron descartando las células leucémicas no adheridas y luego se marcaron con el reactivo AldeRed 588, sustrato de ALDH. Como control basal de fluorescencia se empleó DEAB, un inhibidor específico de la enzima.

El tratamiento con quimioterapéuticos induce cambios en la señalización de las MSC y HKPS participa modulando algunas de ellas

Buscando entender qué mecanismos podrían intervenir en la respuesta al tratamiento y cómo HKPS podría alterar dichas señales en detrimento de la supervivencia de las células leucémicas, se trataron los co-cultivos con DEXA y se determinaron los cambios en 43 diferentes fosfoquinasas, los resultados se contrastaron con los obtenidos en condiciones donde no se trataron las células con el quimioterapéutico. El tratamiento con DEXA indujo a una reducción en la actividad de los factores CREB y c-Jun, así como de HSP27, MSK y WNK1. (Fig.18A). De forma importante, también cuando se trataron las células con el quimioterapéutico se observó un incremento notable en la fosforilación de ERK1/2 (Fig. 18B) y otros incrementos un poco más leves en Chk-2, FAK, PRAS40, PLC y PYK2.

PKC en un microambiente leucémico con células MSC: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la resistencia a la quimioterapia en células ALL-B

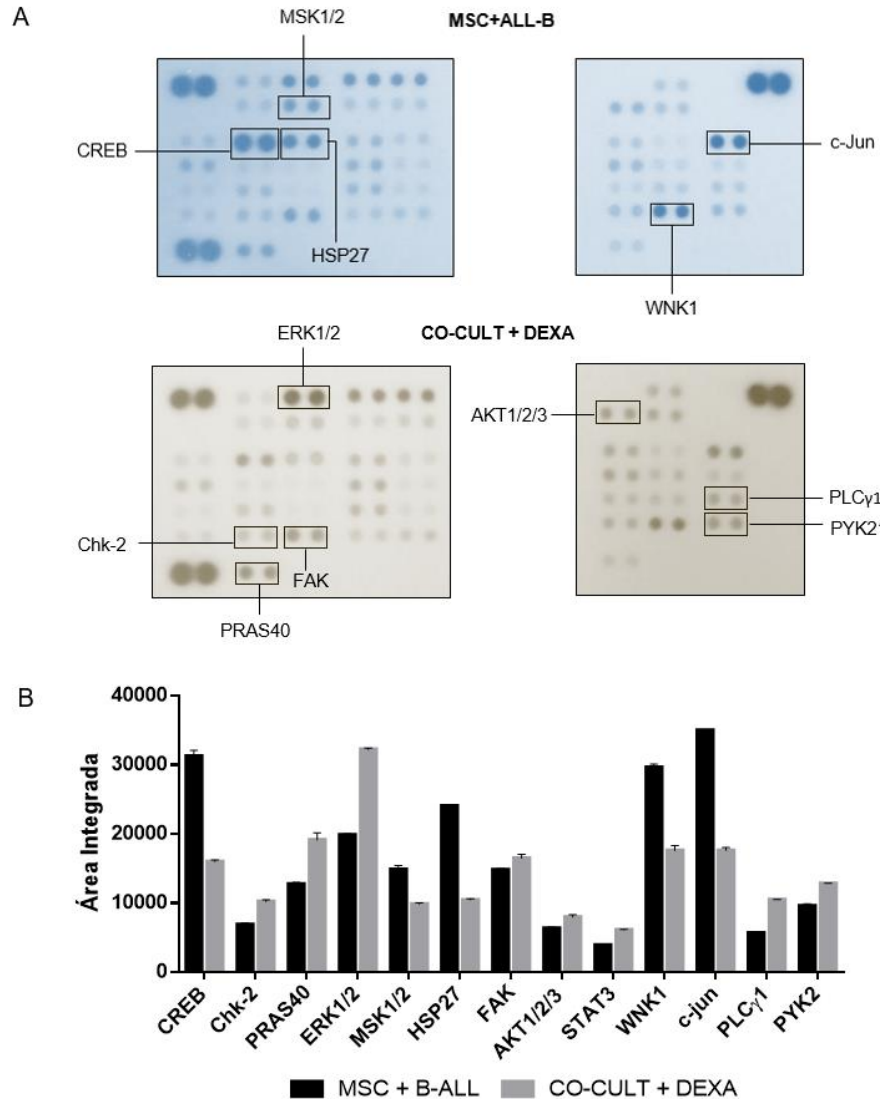


Fig. 18 Cambios en el estado de fosforilación de algunas fosfoquinasas por el tratamiento con DEXA. A) Variaciones en el perfil de fosforilación de MSC co-cultivadas con células ALL-B y MSC co-cultivadas en presencia de DEXA (500 nM). Las membranas del arreglo se incubaron con 350 ug de extracto de proteína. En los recuadros se señalan las moléculas que se incrementan en cada caso. **B)** Cuantificación de la expresión de las moléculas con mayor variación. El área integrada se determinó teniendo en cuenta la densidad de cada uno de los puntos. Las barras corresponden al SEM de los puntos por duplicado, se muestran las moléculas que más variación presentaron respecto al control.

El pretratamiento de las MSC con HKPS y la posterior exposición a 500 nM de DEXA en condiciones de co-cultivo condujo a una reducción en la activación de ERK1/2, FAK, PRAS40, P53, RSK1/2/3, p27, WNK1, c-Jun, PLC y PYK2 (Fig. 19A, 21A). La única molécula que se encontró sobre activada por el pretratamiento con HKPS fue CREB. (Fig. 19B). Los resultados indican que en general, el péptido

PKC en un microambiente leucémico con células MSC: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la resistencia a la quimioterapia en células ALL-B

HKPS reduce la activación de algunas moléculas que podrían ser importantes mediando la protección de las células leucémicas a la quimioterapia.

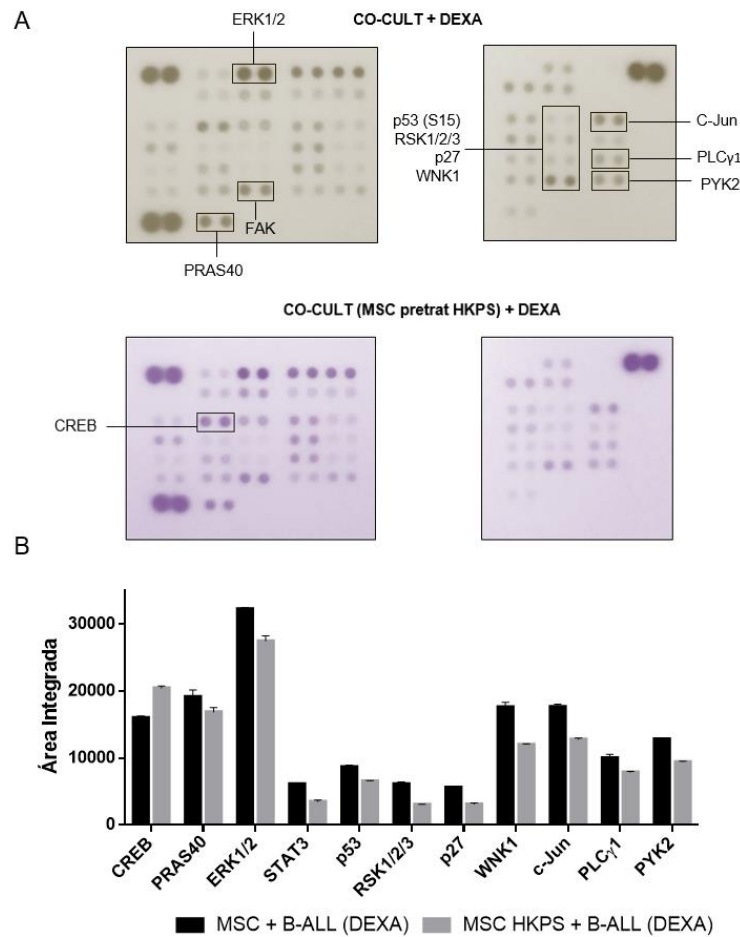
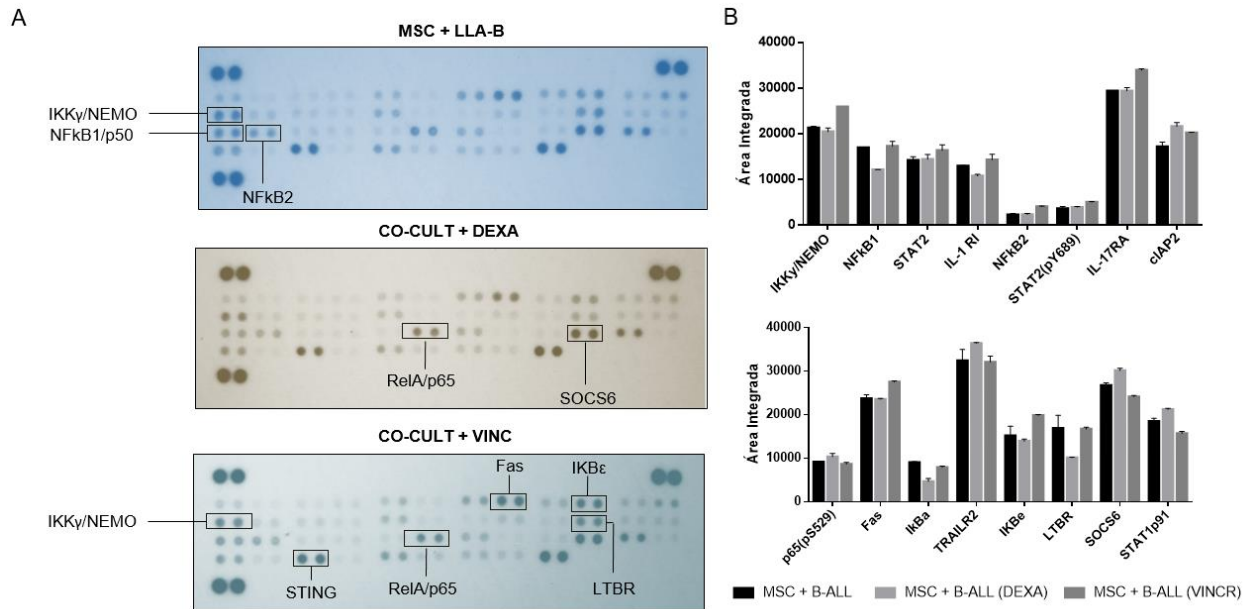


Fig.19 Cambios en el estado de fosforilación de algunas fosfoquinasas posterior a la inhibición de PKC por HKPS en el soporte. A) Variaciones en el perfil de fosforilación en las MSC con quimioterapia y tratamiento con HKPS. Se obtuvieron extractos de proteína de MSC co-cultivadas 2 h con células ALL-B en presencia de DEXA (500 nM) y MSC pre-tratadas con 40 μ M de HKPS y co-cultivadas con células ALL-B en presencia de quimioterapia. En recuadros se señalan las moléculas que se incrementan en cada caso. B) Cuantificación los cambios en las moléculas con mayor variación después del tratamiento con DEXA y la inhibición del soporte con HKPS. El área integrada se determinó teniendo en cuenta la densidad de cada uno de los puntos. Las barras corresponden al SEM de los puntos por duplicado, se muestran las moléculas que más variación presentaron respecto al control.

De la misma forma se evaluaron los cambios en la ruta NF- κ B tanto por la quimioterapia como en respuesta al tratamiento con HKPS. Como era de esperarse, los fármacos DEXA y VINC por sus

PKC en un microambiente leucémico con células MSC: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la resistencia a la quimioterapia en células ALL-B

mecanismos de acción, inducen diferentes patrones de fosforilación en moléculas de esta ruta; sin embargo, los cambios que se observan respecto a las MSC co-cultivadas con células leucémicas en ausencia de quimioterapia no fueron tan marcados. Para DEXA se halló un incremento en RelA/p65 y SOCS6 y una disminución leve en la activación de NF- κ B1, IKB α y LTBR. El tratamiento con VINC sobre-activó NEMO/STING, RelA, Fas, LTBR e IKB ϵ (Fig. 20A, B). Con HKPS se observó que la expresión de moléculas como STAT2, STING, NF- κ B2, p65 y TRAILR2 se redujo, por otro lado, se incrementó la fosforilación de p65, así como la expresión de otras moléculas como SOCS6, IKB α/ϵ (Fig. 21C). Los resultados anteriores en conjunto indican que HKPS puede interferir desregulando a la baja la expresión y/o la activación de moléculas que podrían estar mediando la protección del soporte en respuesta a la quimioterapia.



PKC en un microambiente leucémico con células MSC: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la resistencia a la quimioterapia en células ALL-B

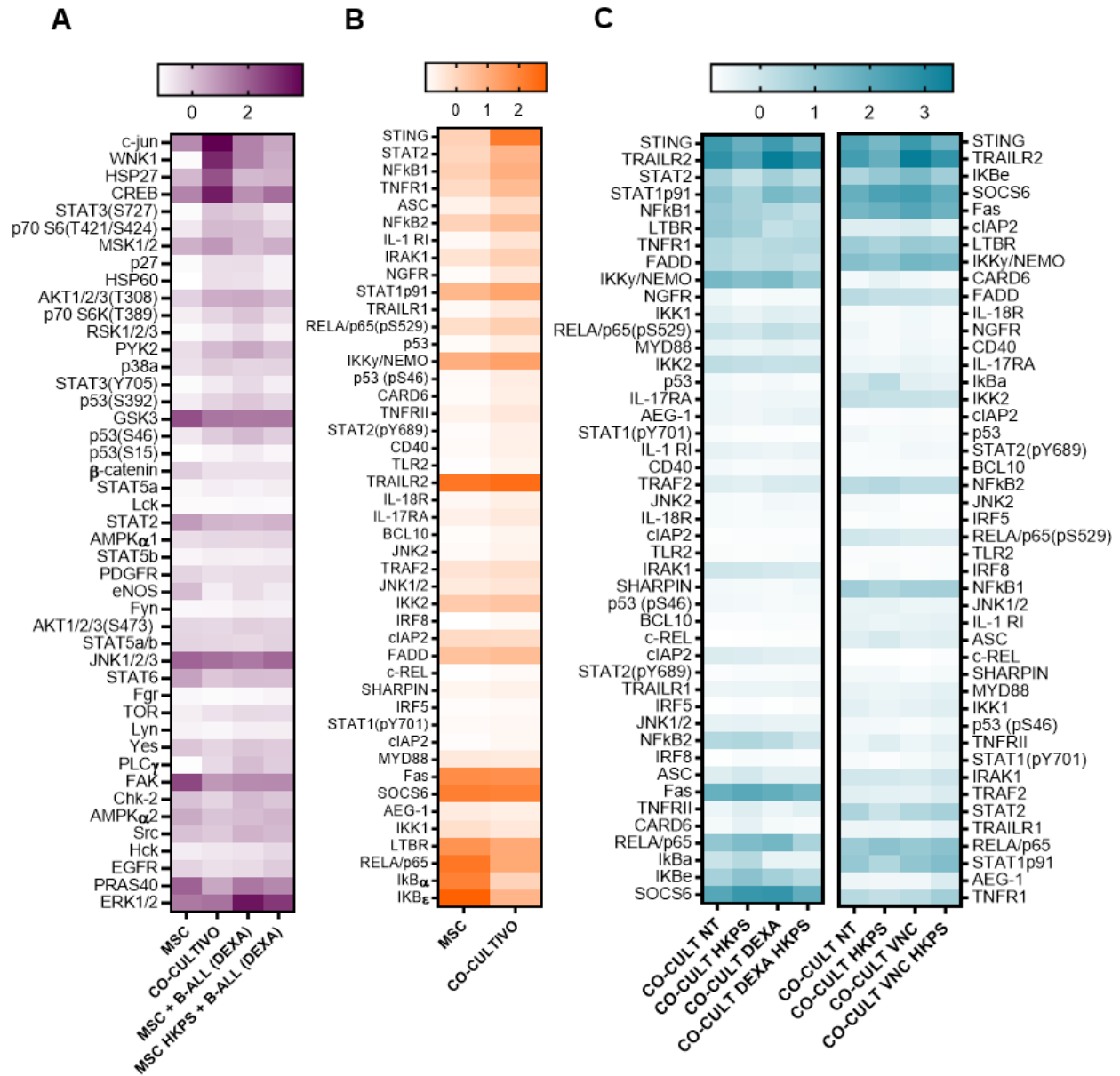


Fig. 21 Cambios en la fosforilación de diversas quinasas y la expresión de moléculas de la ruta NF- κ B por el co-cultivo, la quimioterapia y la inhibición de PKC en el soporte. A) Comparaciones del perfil de quinasas en MSC solas, MSC co-cultivadas con células ALL-B, MSC en co-cultivo con DEXA e inhibición con HKPS en las MSC y quimioterapia. **B)** Cambios en el perfil de expresión y activación de diferentes moléculas involucradas en la activación e inhibición de la ruta NF- κ B después del co-cultivo con células ALL-B. **C)** Variaciones en el perfil de expresión de moléculas de la ruta NF- κ B después del tratamiento del co-cultivo con

PKC en un microambiente leucémico con células MSC: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la resistencia a la quimioterapia en células ALL-B

HKPS, en presencia de los quimioterapéuticos DEXA y VINC. Los valores de cambio más significativos se encuentran en los extremos superior e inferior de la gráfica.

El tratamiento con HKPS de las MSC induce una mayor activación de los transportadores ABC en las células ALL-B.

En el microambiente leucémico se ha descrito que el fenómeno de resistencia a medicamentos está mediado en parte por la adhesión celular. Nuestros resultados muestran que las MSC protegen a las células leucémicas a través de una interacción directa, que involucra la sobre-expresión de algunas moléculas de adhesión y la activación de algunas rutas de señalización que podrían explicar la protección observada y además una sensibilidad reducida de las células ALL-B a la quimioterapia. Buscando ahondar en los posibles mecanismos que median dicha protección, se evaluó mediante citometría de flujo en los blastos de pacientes con ALL-B, la actividad de los transportadores MDR1, BCRP, MRP, después del tratamiento con inhibidores específicos; estos tres transportadores, pertenecientes a la familia ABC se han asociado con la extrusión de algunos medicamentos (Choi & Yu, 2014).

Se encontró que las células leucémicas solas (sin soporte y sin tratamiento) presentaban una actividad basal de los transportadores MRP y MDR1 (Fig. 22A). De forma interesante, el tratamiento con DEXA se tradujo en un incremento de la actividad de los 3 transportadores, siendo notable el incremento de la actividad de MRP en más del doble y la de BCRP que era nula en las células leucémicas no tratadas. Lo anterior indica que, en respuesta al tratamiento las células ALL-B incrementan la actividad de los transportadores ABC favoreciendo la extrusión de los mismos en favor de su supervivencia.

Se evaluó además si la presencia de las MSC modificaba indirectamente la actividad de los transportadores ABC en las células leucémicas. Para esto, se establecieron los co-cultivos y luego se trataron con DEXA por 3 días. En relación con las células leucémicas solas, se encontró que la presencia del soporte disminuía la actividad de los transportadores MRP y BCRP. No obstante, en el co-cultivo, las células leucémicas tratadas con DEXA seguían teniendo una actividad de MDR1 y MRP mayor comparado con las células ALL-B de los co-cultivos no tratados (Fig. 22B). La actividad de BCRP en las células ALL-B del co-cultivo fue prácticamente nula y el tratamiento con DEXA no indujo ningún cambio en dicha actividad, lo que sugiere que la presencia de las MSC puede modular los cambios en la actividad de algunas de estas moléculas, reduciendo el efecto que ocasiona la quimioterapia si no se cuenta con el soporte.

PKC en un microambiente leucémico con células MSC: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la resistencia a la quimioterapia en células ALL-B

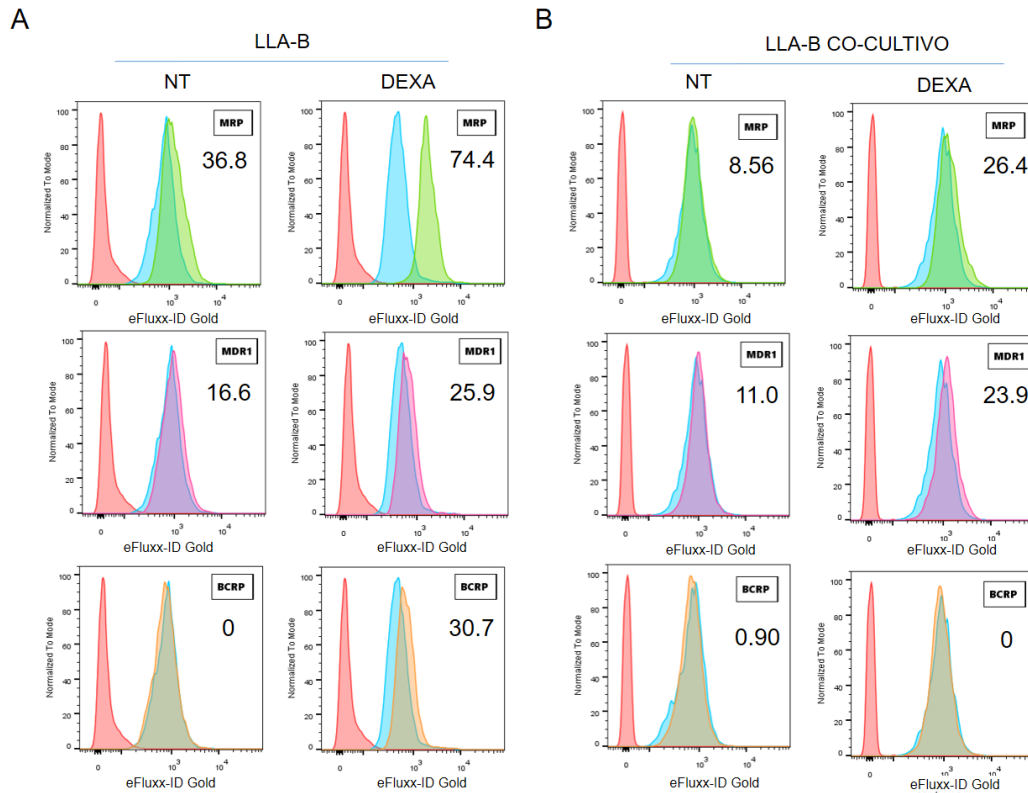
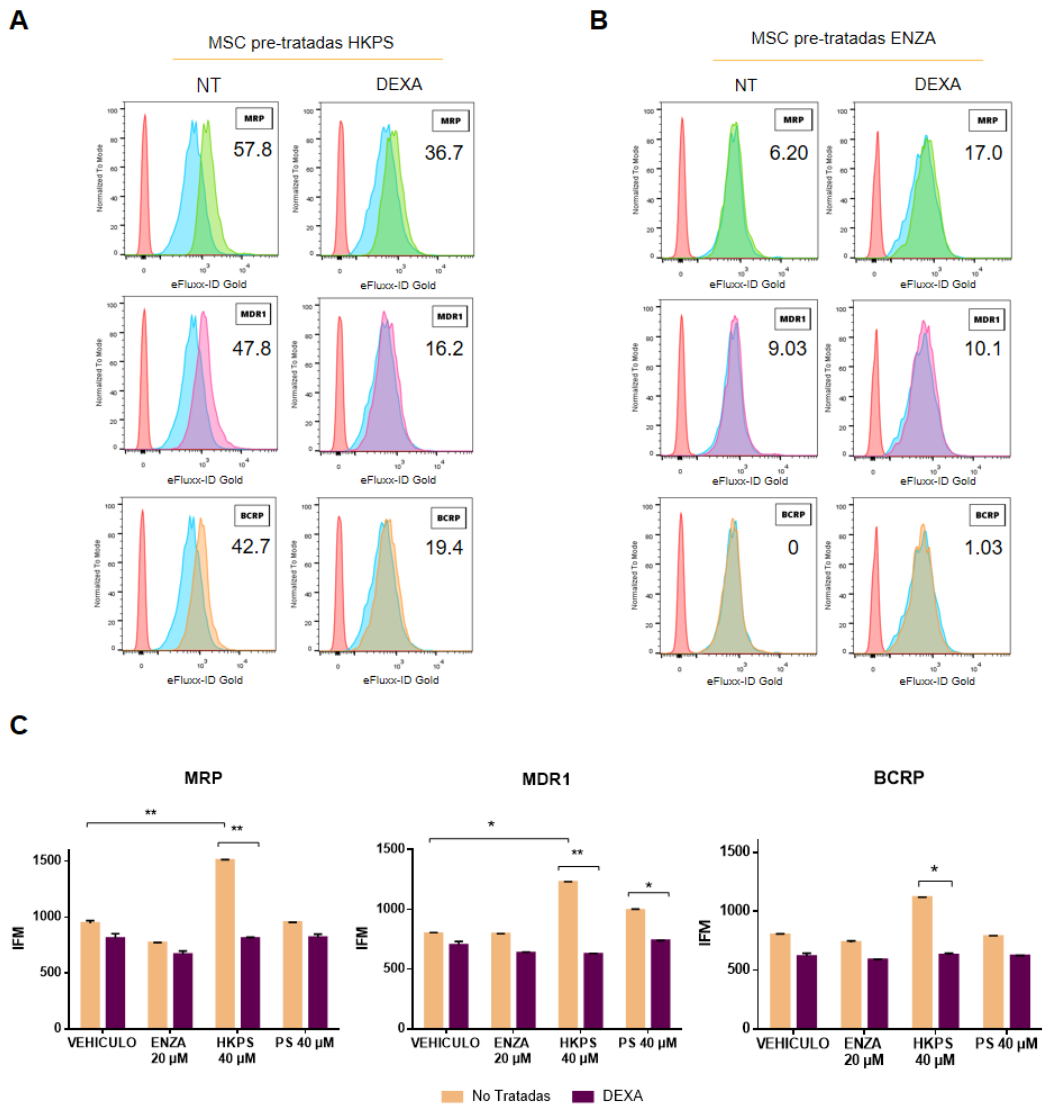


Fig. 22 Influencia de la quimioterapia y el soporte mesenquimal en la actividad de los transportadores MRP, MDR1 y BCRP de células ALL-B. **A)** Actividad de los transportadores en células leucémicas aisladas de un paciente con ALL-B después de 3 días de tratamiento con DEXA. Las células en suspensión se incubaron durante 72 h con o sin DEXA (250 nM) y después se recogieron para su análisis por citometría de flujo. La actividad de los transportadores se determinó empleando los inhibidores MK-571, Verapamilo y Novobiocina específicos para MRP, MDR1 y BCRP, respectivamente y la adición del reactivo fluorescente EFLUXX-ID® Gold dye, que se retiene en la célula en presencia de los inhibidores de los transportadores. Las células ALL-B tratadas con el vehículo DMSO (1.25%) y en presencia de EFLUXX-ID® Gold dye, se usaron como control. **B)** Actividad de los transportadores de la familia ABC en células ALL-B co-cultivadas con MSC en presencia o no de DEXA. Las células leucémicas se sembraron sobre la monocapa de MSC y el co-cultivo se trató con 250 nM del quimioterapéutico. Los co-cultivos se recogieron después de 72 h y las células se trataron con los inhibidores como se describió anteriormente. Para la identificación de las poblaciones MSC y ALL-B del co-cultivo se emplearon anticuerpos CD73 y CD19. Los datos se expresan como valores MAF.

También se evaluó la actividad de los transportadores MRP, MDR y BCRP después del pretratamiento del soporte con HKPS para determinar si la inhibición de PKC en las MSC con el péptido cambiaba la función de estas moléculas. Se encontró en las células leucémicas de los co-cultivos con

PKC en un microambiente leucémico con células MSC: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la resistencia a la quimioterapia en células ALL-B

o sin DEXA donde se había inhibido el soporte con HKPS había un incremento en la actividad de los 3 transportadores a diferencia de lo que pasó cuando el soporte se trató con ENZA. (Fig. 23A). En presencia de DEXA, en los co-cultivos con MSC tratadas con HKPS, los valores de actividad de los transportadores en las células ALL-B se redujeron en todos los casos (Fig. 23B). Los resultados anteriores indican que existe una influencia indirecta del tratamiento de las MSC con HKPS que se traduce en una respuesta fisiológica de las células leucémicas, haciéndolas susceptibles a la quimioterapia. Sin embargo, este efecto no se debe a que las células leucémicas no tengan la capacidad de extrusión de los medicamentos a través de sus transportadores ABC. Al contrario, HKPS indujo una sobre-activación significativa de los transportadores MRP y MDR1 (Fig. 23C)



PKC en un microambiente leucémico con células MSC: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la resistencia a la quimioterapia en células ALL-B

Fig. 23 Efecto de la inhibición de PKC en el soporte con HKPS en la actividad de los transportadores MRP, MDR1 y BCRP en células ALL-B. A) Actividad de los transportadores en células leucémicas aisladas de un paciente con ALL-B después de 3 días co-cultivo con MSC en presencia o no de DEXA. Las MSC se pre-trataron 2 h con HKPS 40 μ M y los co-cultivos con células ALL-B se establecieron posterior al tratamiento. Las células se incubaron durante 72 h con o sin DEXA (250 nM) y después se recogieron para su análisis por citometría de flujo. La actividad de los transportadores se determinó empleando los inhibidores MK-571, Verapamilo y Novobiocina específicos para MRP, MDR1 y BCRP, respectivamente más la adición del reactivo fluorescente EFLUXX-ID® Gold dye. Células ALL-B tratadas con el vehículo DMSO (1.25%) se usaron como control. **B)** Actividad de los transportadores de la familia ABC en células ALL-B co-cultivadas con MSC pre-tratadas con ENZA 20 μ M en presencia o no de DEXA. Los co-cultivos se recogieron después de 72 h y las células se trataron con los inhibidores como se describió anteriormente. Para la identificación de las poblaciones MSC y ALL-B del co-cultivo se emplearon anticuerpos CD73 y CD19. Los datos se expresan como valores MAF. **C)** Comparación de la actividad de los transportadores MRP, MDR1 y BCRP como una medida de la IFM. Los datos se presentan como el promedio \pm SEM (Two-way ANOVA * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Discusión

Uno de los principales retos después de haber alcanzado mejoras en los porcentajes de remisión para los pacientes con ALL-B continúa siendo encontrar un tratamiento efectivo para ese 20-10% de pacientes que recaen aún después de regímenes intensivos de quimioterapia (Toft et al., 2013). La recaída a nivel medular es uno de los factores de peor pronóstico en estos pacientes (Gaynon et al., 1998, 2005), lo que sugiere que las interacciones que allí se dan, pueden jugar un papel clave en el desenlace de la enfermedad. Diferentes poblaciones de células convergen en el microambiente de la MO y pueden influenciar la fisiología de las células leucémicas. El papel de las MSC se ha demostrado como esencial en el mantenimiento de la supervivencia de estas células (Manabe et al., 1992; Mudry et al., 2000) y éste cobra especial relevancia si, como aquí, se pretende generar un acercamiento *ex vivo* al entendimiento de los procesos que ocurren en el nicho leucémico. En concordancia con otros estudios en diferentes tipos de leucemia (Nefedova et al., 2003; Lutzny et al., 2013), demostramos que las células leucémicas (ALL-B) son altamente dependientes del contacto con MSC para sobrevivir. Además, las MSC confieren una protección a las células de ALL-B a la quimioterapia. Por lo tanto, las terapias novedosas actuales deben considerar la influencia del estroma no solamente en la supervivencia de las células leucémicas sino también su papel en la resistencia a la quimioterapia.

El papel de PKC en cáncer ha sido ampliamente discutido en los últimos años y en la actualidad las diferentes isoformas pueden asociarse tanto con la supresión tumoral como con su progresión (Isakov et al., 2018). En neoplasias hematológicas, la PKC β en particular, está relacionada con el crecimiento y supervivencia de las células leucémicas ya que se expresa en diferentes subtipos de leucemia (Komada et al., 1991; Lei et al., 2016, Abrams et al., 2007, Nakagawa et al., 2015; Takami et al., 2018), pero, además, en las MSC, donde se ha observado que el contacto directo activa esta quinasa y la ruta NF- κ B (Lutzny et al., 2013). Los resultados demostraron que HKPS, un péptido capaz de inhibir las isoformas clásicas de PKC, disminuye la viabilidad no sólo de diferentes líneas celulares leucémicas, sino que además afecta la viabilidad de células primarias derivadas de pacientes con ALL-B. El tratamiento con HKPS afectó significativamente la viabilidad de más del 65 % de las muestras evaluadas, con reducciones en la viabilidad de entre 45 y 60% en el grupo de mejor respuesta y de 44 a 25% en el grupo intermedio. La afectación en la viabilidad por el tratamiento se dio indistintamente en muestras de pacientes con diferentes características al diagnóstico y también con diferente grado de respuesta a la quimioterapia. De modo que, independientemente de las características genéticas de la célula leucémica la actividad de PKC es importante en la supervivencia de las células ALL-B. Los pacientes que mejor respondieron a HKPS mostraron una afectación en su

viabilidad mayor a la observada con el inhibidor ESTAU, un hecho importante si se considera que HKPS tiene una mayor especificidad por PKC, a diferencia de ESTAU que puede inhibir otras quinasas. Por otra parte, otro grupo de muestras (34%) no se afectaron por el péptido HKPS, sugiriendo que el compuesto no afecta cualquier célula *per se*, sino aquellas que son dependientes para su crecimiento de PKC. HKPS mostró además una mayor selectividad por las células leucémicas que por las MNC normales o por las MSC, las cuales además se recuperan después del tratamiento con HKPS. Esto muestra que las células leucémicas dependen en mayor medida de la actividad de PKC para su supervivencia.

Moléculas como VCAM-1, VLA-4, ICAM y CXCR4 pueden mediar la asociación entre las células leucémicas y las MSC (Jacamo et al., 2014; Sharma et al., 2019; Bonilla et al., 2019), algunas de las actuales estrategias de inhibición del crecimiento leucémico pretenden la disrupción de estas interacciones moleculares y así la movilización de las células leucémicas a regiones donde pueden llegar a ser más susceptibles a la quimioterapia (Herman et al., 2015; Ebinger et al., 2016). Las líneas celulares de ALL-B se asocian diferentemente al soporte mesenquimal, y no solo la sensibilidad a la quimioterapia varía en estas poblaciones de acuerdo a esa capacidad de adherirse, sino que también, la interacción con el soporte influencia su estado proliferativo y metabólico (Moses et al. 2016). Después de tratar las MSC con HKPS, alrededor del 50% de las células ALL-B perdieron su capacidad de adherirse al soporte, estas células se recuperaron del sobrenadante y al verificar su viabilidad en su mayoría se encontraban muertas. Mientras ESTAU parece afectar la morfología de las MSC, este compuesto no tiene efectos deletéreos significativos en la capacidad de adhesión de las células leucémicas. Los inhibidores ENZA y HKPS, aunque tuvieron menos efectos sobre la morfología, afectaron en mayor medida la capacidad de adherencia de las células ALL-B. La inhibición de PKC en las MSC se tradujo en la pérdida de la adhesión de las células ALL-B, en un fenómeno que se relacionó con la desregulación a la baja de ICAM-1 y VLA-5, dos moléculas que se habían sobre-expresado en las MSC posterior al establecimiento de los co-cultivos. El papel de CXCR4 y su incremento después del tratamiento del soporte con HKPS llama también la atención. Se ha reportado que las MSC pueden proteger a las células leucémicas también en parte debido a la migración de células leucémicas por debajo de MSC, un fenómeno que se ha asociado con la expresión de CXCR4 funcional (Burger et al., 1999). Curiosamente, en resultados anteriores del grupo se ha demostrado que la expresión y secreción de SDF-1 en MSC se reduce en un modelo *in vitro* del nicho leucémico (Bonilla et al., 2019), lo que explica el aumento observado en la expresión de CXCR4 en células ALL-B durante los co-cultivos. Si este efecto se ve reforzado por HKPS, como se muestra aquí, entonces las células ALL-B podrían ser más propensas a separarse de las MSC. Los factores solubles presentes en los medios

PKC en un microambiente leucémico con células MSC: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la resistencia a la quimioterapia en células ALL-B

condicionados de los co-cultivos o de las MSC solas no lograron mantener en el tiempo la supervivencia de las células de ALL-B, mostrando la relevancia de la adherencia y la interacción célula a célula. De forma importante, aunque las células leucémicas al ser tratadas directamente con HKPS presentaron una susceptibilidad diferencial, al inhibirse el soporte con el péptido, las muestras evaluadas mostraron ser sensibles al tratamiento, independientemente si pertenecían al grupo de mayor o menor sensibilidad a HKPS. Este hecho sugiere que a pesar de la alta variabilidad en las moléculas de adhesión que pueda existir en las células leucémicas (Redondo-Muñoz et al., 2019), pueden existir mecanismos de señalización comunes, que convergen en unas pocas moléculas responsables del soporte, las cuales estarían mediando la protección de las MSC a las células ALL-B siendo afectadas por HKPS.

Son varias las rutas de señalización intracelular que se pueden activar en respuesta a la asociación de las moléculas de adhesión con sus ligandos. De manera general para las integrinas, las rutas de ILK, NF- κ B o PI3K/AKT establecen las respuestas a nivel transcripcional que se dan producto de las interacciones con el microambiente (Tabe et al., 2007). Aquí se indagó mediante el uso de citometría de flujo y microarreglos, si después del co-cultivo cambiaba la expresión y el estado de fosforilación de estas moléculas en las MSC. Se encontró que las rutas AKT, NF- κ B y FAK se activaban después de la interacción célula-célula. Un análisis completo de la ruta NF- κ B demostró que el co-cultivo aumenta la expresión de moléculas relevantes en la activación de esta ruta, y al tiempo, disminuye la expresión de algunas moléculas como IKB α / ϵ que inhiben la translocación de p65 al núcleo. De forma interesante, también se encontró una activación del factor transcripcional c-Jun que comparte mecanismos de activación comunes a NF- κ B. c-Jun se puede fosforilar en respuesta al estrés o a estímulos pro-inflamatorios favoreciendo también la translocación de NF- κ B al núcleo. Muchos genes, entre ellos algunos relacionados con la quimiorresistencia como MDR1, requieren de la cooperación de estos dos factores para su expresión (Ratnasinghe et al., 2001; Kameyama et al., 2008), además, la respuesta del factor AP-1, se aumenta sustancialmente en presencia de la subunidad p65 de NF- κ B, la cual interviene en su dimerización (Lee et al., 2002; Garcés de Los Fayos et al., 2018). Tal vez una de las moléculas que más fuertemente se expresó en las MSC posterior al contacto con las células leucémicas fue STING que participa en la estimulación de genes de interferón, pero que recientemente se ha descrito que funciona además como un sensor en respuesta a la acumulación de material genético en el citoplasma conduciendo a la aparición del fenotipo secretor asociado a senescencia (Mun Loo et al., 2020).

PKC en un microambiente leucémico con células MSC: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la resistencia a la quimioterapia en células ALL-B

Dos residuos son relevantes para la activación de AKT, la T308 y la S473. Para AKT, tanto por citometría como empleando los microarreglos, se observó predominantemente la fosforilación en el residuo T308 en las MSC del co-cultivo. Diferentes moléculas modulan la fosforilación de estos residuos; mTORC1 participa en la fosforilación de la T308 y mTORC2 en la de la S473. Se sabe que mTORC1 y su señalización favorece la síntesis de proteínas e inhibe la autofagia, funciones importantes en células que requieren entrar en ciclo celular, al contrario, la activación de mTORC2 es requerida para la progresión del ciclo más allá de la fase S (Vadlakonda et al., 2013). Las células senescentes, quiescentes o con una tasa de actividad metabólica menor, señalizan a través de mTORC2. Aunque las células ALL-B pueden inducir un microambiente pre-senescente para las células MSC (Bonilla et al., 2019), estos eventos en general pueden tomar mucho más tiempo. Las dos técnicas permiten confirmar que después de la interacción de las MSC con las células ALL-B, la ruta AKT está consistentemente activada por la fosforilación de T308.

Para FAK, mediante citometría de flujo, se hallaron cambios importantes en la fosforilación del residuo S910 y aunque el sitio Y397 es el mayor sitio de autofosforilación de la quinasa, no se encontró activado por el co-cultivo en los microarreglos. La fosforilación en los residuos de serina se ha asociado más con la participación de estímulos externos como los inducidos por los factores de crecimiento, pero la fosforilación de FAK en la S910 es la única que se puede dar a través de PKC/ERK como resultado de la integración de señales vía $G\alpha q$ (Hunger-Glaser et al., 2004). Estas rutas de señalización, así como la activación de otras como WNK-1, STAT3 o p53, que también se encontraron sobre-activadas en el co-cultivo, no modulan únicamente la supervivencia de las células leucémicas, sino la supervivencia misma de las MSC que constantemente están sometidas a un estrés fisiológico por las demandas de la célula tumoral. Estas tres vías, a través de la producción de IL-6 e IL-8, promueven la supervivencia de las células tumorales en otros modelos no hematológicos donde se ha descrito que el estroma también desempeña un papel importante (Timaner et al., 2019).

El péptido HKPS no solo causó una disrupción del soporte en condiciones normales, sino que además aumentó el efecto nocivo de DEXA, MTX y VINC en la viabilidad de las células leucémicas, tres compuestos comúnmente empleados en diferentes fases de los regímenes actuales de quimioterapia. Si el soporte no era inhibido, las MSC conseguían proteger de forma sustancial a las células leucémicas de estos medicamentos.

Se indagó también sobre los cambios en la señalización que producía la quimioterapia y se encontró un incremento importante en la fosforilación de ERK1/2 después del tratamiento de los co-cultivos con DEXA. Las rutas MAPK/ERK y PI3K-AKT pueden incrementar la resistencia a medicamentos a

PKC en un microambiente leucémico con células MSC: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la resistencia a la quimioterapia en células ALL-B

través de cambios en la expresión de proteínas de la familia Bcl2 o a través de un aumento en la actividad del transportador MDR (Naci et al., 2012; El Azreq MA et al., 2012; Scharff et al., 2020). El tratamiento con HKPS redujo en cierta medida la fosforilación de ERK, sin embargo, la concentración o el tiempo de tratamiento no fue suficiente para reducir la actividad a los niveles observados en el co-cultivo sin tratamiento o en las MSC solas. Aunque no igual de significativo a ERK1/2, el tratamiento con DEXA y VINC indujo algunos cambios en el perfil de expresión de diferentes moléculas que participan en la ruta NF- κ B como p65, TRAILR1, STAT1, IKB ϵ o SOCS6 (supresor de la señalización por citoquinas). HKPS redujo los niveles de STING que había aumentado su expresión en el co-cultivo y se mantenía independientemente de la quimioterapia y de otras proteínas como IKK y STAT2.

Se estableció que algunos de los mecanismos involucrados en la quimiorresistencia cambiaban después de la inhibición de PKC en las MSC. La actividad de ALDH, un mecanismo de detoxificación celular frente a variados tipos de estrés, se ha considerado un biomarcador funcional de *stemness* en LSC en algunas leucemias como AML (Yang et al., 2018). En ALL-B es un poco menos claro si estas poblaciones *stem* existen, sin embargo, la actividad de ALDH se ha observado en células más inmaduras las cuales pueden conferir cierta resistencia a la quimioterapia e incrementar los valores de EMR (Ahlers et al., 2013). Aunque las células leucémicas no presentaron cambios en su actividad de ALDH, las MSC si lo hicieron, observándose además una reducción en la actividad de ALDH si habían sido pre-tratadas con HKPS. De esta manera, se afectarían además las funciones *stem* de las MSC (autorrenovación, diferenciación multipotente, etc.), su capacidad de combatir el estrés oxidativo, aumentando la susceptibilidad de las células leucémicas a la quimioterapia. Esto es diferente a lo que se observó con ENZA y el péptido control PS, donde la quimioterapia y la exposición a estos compuestos indujeron una mayor actividad de ALDH.

Las células leucémicas en condiciones de estrés activan otros mecanismos celulares y moleculares en favor de su supervivencia. Por esta razón se evaluó la actividad de los principales transportadores ABC (Svirnovski et al., 2009). La quimioterapia indujo una sobre-activación de MDR1, MRP y BCRP en las células leucémicas; no obstante, la presencia de las MSC hizo que la activación fuese mayor en relación a lo observado en las células ALL-B sin soporte. De manera inesperada, teniendo en cuenta los resultados anteriores, la inhibición de PKC con HKPS en las MSC nuevamente condujo a la activación de estos transportadores en las células ALL-B. Las razones de esto son desconocidas, pero podría ser un sistema adicional de supervivencia activado por las células leucémicas, en la medida que pierden, por el tratamiento con HKPS un nicho leucémico que favorece su supervivencia.

PKC en un microambiente leucémico con células MSC: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la resistencia a la quimioterapia en células ALL-B

Estos resultados son muy interesantes a la luz de otros recientes: en modelos experimentales *in vivo*, la inhibición de PKC en el estroma aumentó la sensibilidad de las células leucémicas a los quimioterapéuticos (Park et al., 2020). La expresión disminuida de las moléculas de adhesión en las células estromales deficientes en PKC, redujo las señales de supervivencia a las células leucémicas, pero sin afectar su residencia en el nicho (Park et al., 2020). Lo anterior, sumado a los resultados que se describieron anteriormente, apoya la idea que la inhibición de PKC en las células ALL-B y en las MSC que soportan su viabilidad, podría contribuir de manera importante a mejorar el éxito de la quimioterapia. Nuestros resultados muestran que la inhibición específica de las isoformas clásicas de PKC por el péptido HKPS es una herramienta directa útil para inhibir el crecimiento de células leucémicas en algunos pacientes, pero que además, el péptido quimérico HKPS tiene un efecto más generalizado en todos los pacientes, independiente del daño genético, pues inhibe funciones importantes del microambiente tumoral, responsables de la supervivencia de las células leucémicas.

Conclusiones

1. La inhibición de PKC por HKPS en las células ALL-B disminuye su viabilidad e independientemente de la genética, el inmunofenotipo o las características clínicas del paciente, se observó una susceptibilidad diferencial al tratamiento.
2. El contacto directo entre las MSC y las células ALL-B es esencial en la supervivencia de las leucémicas, las rutas NF- κ B, AKT, STAT, MSK se activan en las MSC posterior al contacto directo con las células leucémicas. Los factores solubles del co-cultivo presentes en el medio condicionado, ejercen una protección que se pierde con el tiempo.
3. El tratamiento con HKPS en las MSC altera el soporte que confieren a las células ALL-B disminuyendo la supervivencia de los blastos leucémicos e induciendo una pérdida en la capacidad de adherirse a las MSC de las células leucémicas, sin afectar por igual MNC y MSC.
4. HKPS disminuye la expresión de VLA-5 e ICAM en las MSC, dos moléculas que se sobre-expresan en las MSC posterior al co-cultivo con las células leucémicas. Además, el tratamiento con HKPS induce cambios en el estado de fosforilación de FAK, AKT, c-Jun, CREB, WNK, STAT3, HSP27, HSP60 y P27 y la expresión de STING, STAT2, TRAILR2.
5. La afectación del soporte con HKPS confiere mayor susceptibilidad de las células ALL-B al tratamiento con diferentes quimioterapéuticos.
6. En presencia de la quimioterapia el estado de fosforilación de ERK, eNOS, p53, PLC, Chk-2, PRAS y STAT1 se incrementa, así como la expresión de TRAIL2, p65, SOCS6. HKPS interviene disminuyendo algunos de estos perfiles en las MSC.
7. HKPS reduce la actividad ALDH en las MSC independientemente del tratamiento con quimioterapia.
8. La presencia del soporte mesenquimal disminuye la actividad de los transportadores ABC en las células leucémicas, la inhibición de PKC en el soporte promueve un incremento en dicha actividad.
9. El péptido HKPS inhibe el crecimiento de células de ALL-B y el soporte que dan las MSC a éstas, convirtiéndose en una herramienta terapéutica promisoriosa.

Perspectivas

La identificación de rutas de señalización que se activan después del contacto MSC-ALL-B y en respuesta a la quimioterapia, sumado al hecho de que HKPS modula de diferente manera muchas de estas moléculas, abre una posibilidad para estudiar estas relaciones. Se podrían identificar nuevas oportunidades de intervención que conduzcan a disminuir el efecto protector que confiere el soporte en cuanto a supervivencia y sensibilidad a la quimioterapia de las células leucémicas.

El uso de HKPS como un inhibidor de PKC permitiría su uso no solo en neoplasias hematológicas, sino también en modelos de tumores sólidos donde se ha observado la presencia de células resistentes a la quimioterapia en sitios donde se sobre-expresa PKC (Staroselsky et al., 1990).

Anexos

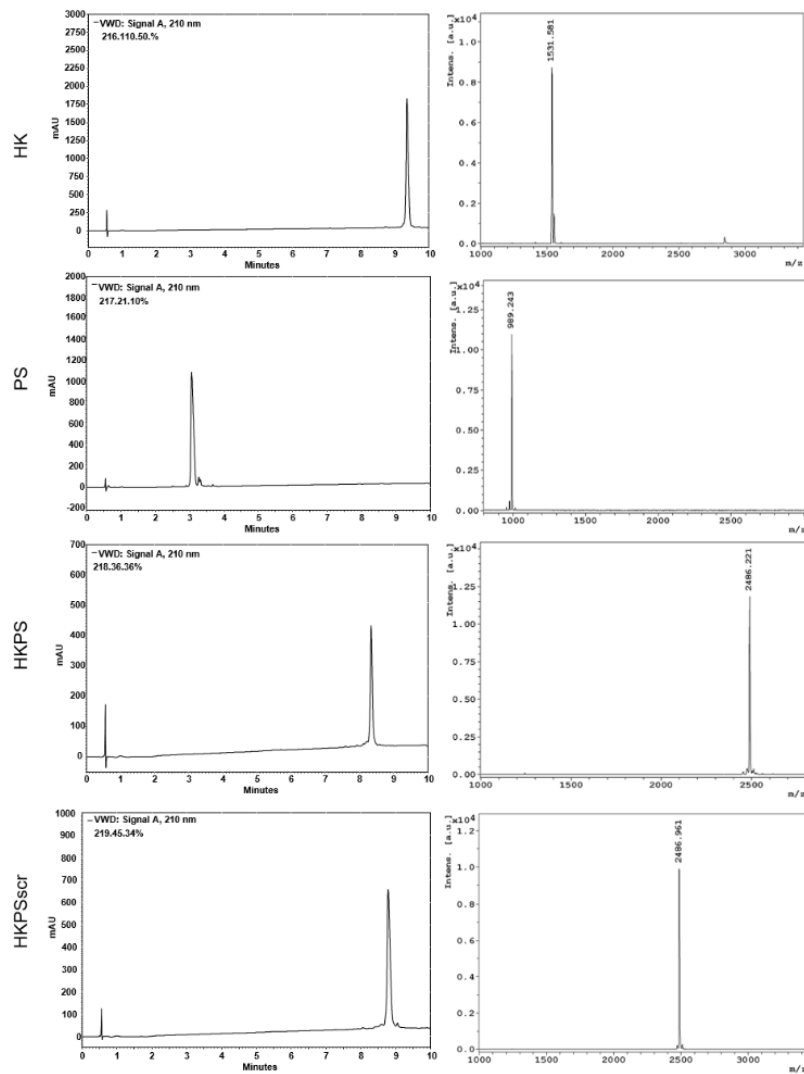


Fig. S1 Caracterización de los péptidos HKPS, PS, HK y HKPSscr. Los péptidos se sintetizaron utilizando la metodología SPPS-Fmoc/tBu. La pureza fue evaluada por RP-HPLC y la caracterización se realizó mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.

PKC en un microambiente leucémico con células MSC: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la resistencia a la quimioterapia en células ALL-B

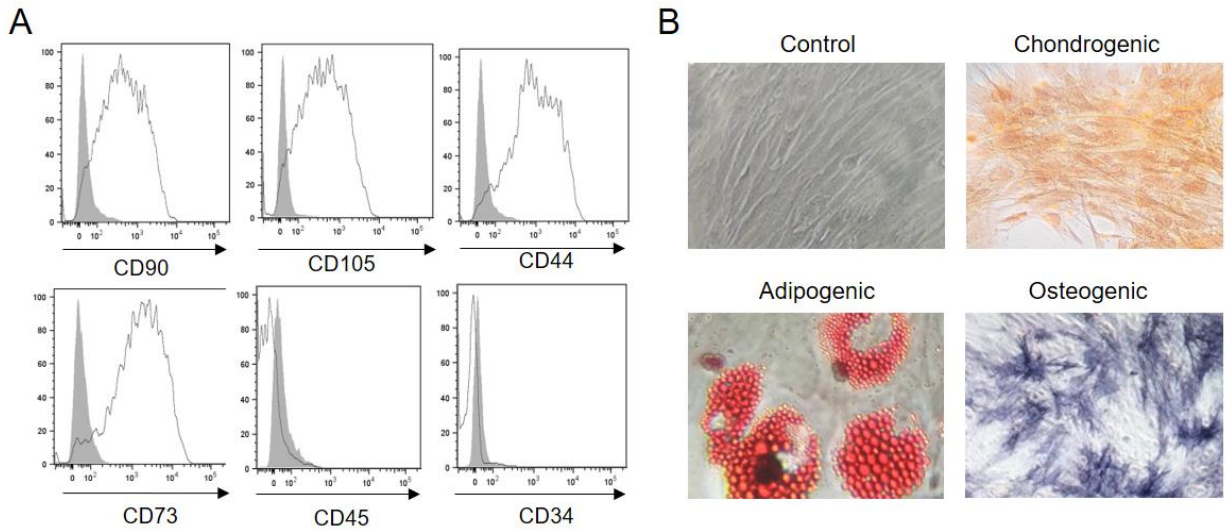


Fig. S2 Caracterización de MSC. A) Expresión de los marcadores CD90, CD105, CD44 y CD73 evaluados mediante citometría de flujo, después de su aislamiento de una muestra de MO de un donante pediátrico sano. B) Capacidad de diferenciación multipotente de las MSC a los linajes, condrogénico, adipogénico y osteogénico (Ruiz-Aparicio et al., 2020).

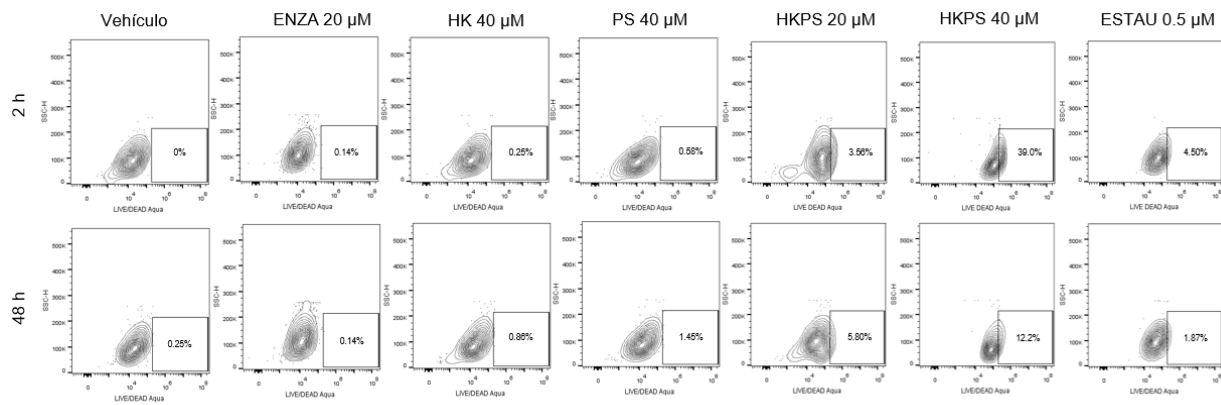


Fig. S3 Viabilidad de MSC. La viabilidad de MSC se determinó mediante citometría de flujo después del tratamiento con péptidos o inhibidores de ESTAU y ENZA durante 2 h y 48 h en presencia de FBS al 1%, como se indica. Después de los tratamientos, las células B-ALL se cultivaron conjuntamente con MSC durante 72 h. Los co-cultivos se recolectaron y se marcaron las MSC.

PKC en un microambiente leucémico con células MSC: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la resistencia a la quimioterapia en células ALL-B

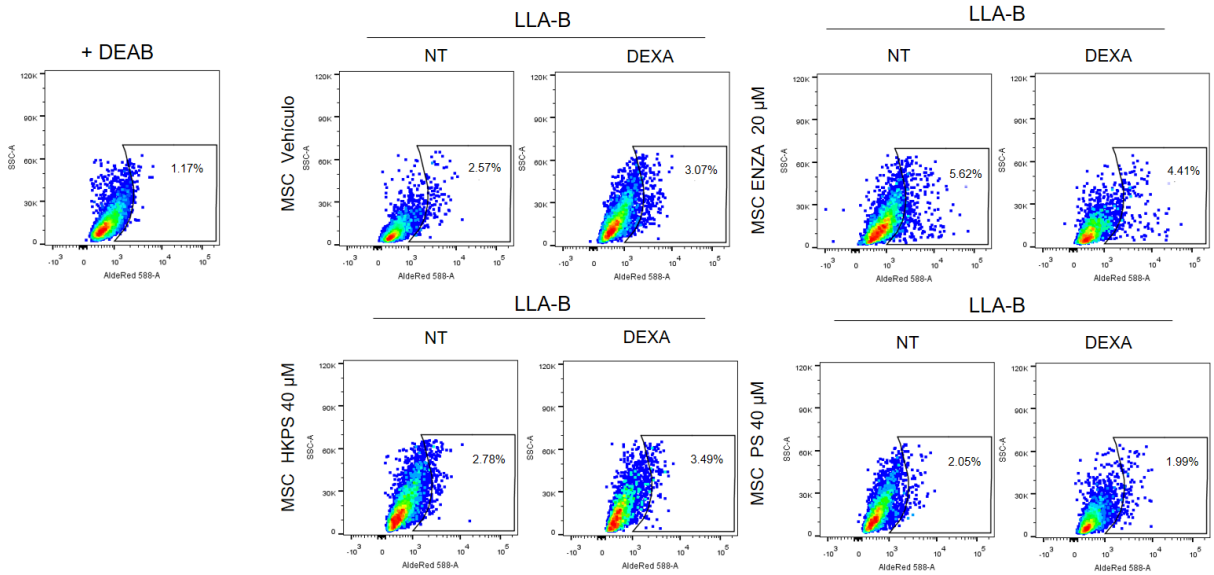


Fig. S4 Actividad ALDH en células ALL-B. La actividad de ALDH de las células leucémicas en el co-cultivo se determinó mediante citometría de flujo empleando el reactivo AldeRed 588-A como sustrato de la enzima. Las MSC se pre-trataron durante 2 h con DMSO (0.4%), ENZA, HKPS y PS a las concentraciones indicadas. Los tratamientos se retiraron y se establecieron los co-cultivos con células leucémicas durante 72 h en presencia o no de DEXA (250 nM). Los co-cultivos se recogieron descartando las células leucémicas no adheridas y luego se marcaron con el reactivo AldeRed 588, sustrato de ALDH. Como control basal de fluorescencia se empleó DEAB, un inhibidor específico de la enzima.

PKC en un microambiente leucémico con células MSC: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la resistencia a la quimioterapia en células ALL-B

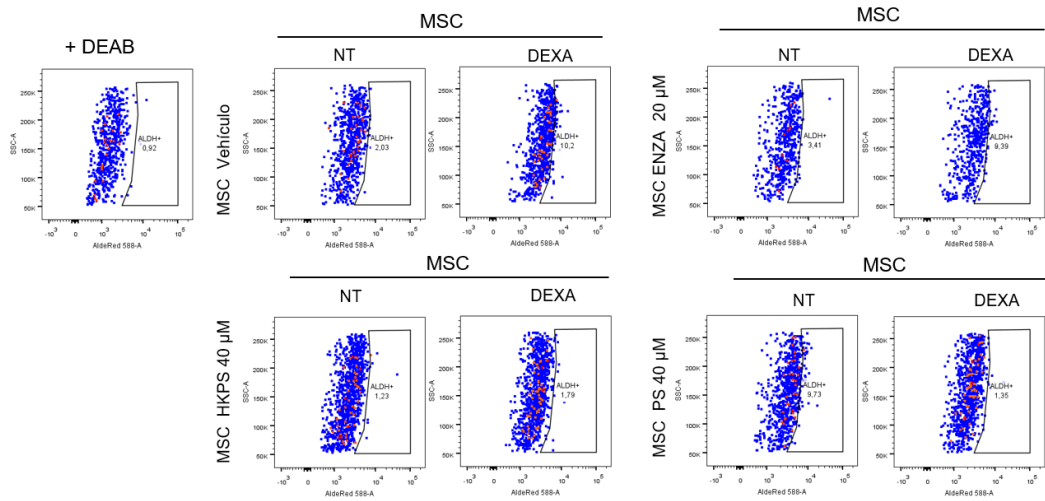



Fig. S5 Efecto de la inhibición del soporte con HKPS y la quimioterapia en la actividad ALDH. A) Cambios en el porcentaje de células MSC con actividad ALDH. Las MSC se pre-trataron 2 h con ENZA, HKPS, PS y el vehículo a las concentraciones indicadas. Se retiraron los tratamientos y se establecieron los co-cultivos con células ALL-B de un paciente por 72 h. Los co-cultivos fueron tratados o no con DEXA (250 nM) durante los 3 días. Los co-cultivos se recogieron descartando las células leucémicas no adheridas y luego se marcaron con el reactivo AldeRed 588, sustrato de ALDH. Como control basal de fluorescencia se empleó DEAB, un inhibidor específico de la enzima.

Article

Dual Targeting of Stromal Cell Support and Leukemic Cell Growth by a Peptidic PKC Inhibitor Shows Effectiveness against B-ALL

Paola Fernanda Ruiz-Aparicio ¹, Natalia-Del Pilar Vanegas ¹, Gloria Inés Uribe ^{2,3}, Paola Ortiz-Montero ¹, Camila Cadavid-Cortés ¹, Jimmy Lagos ², Jessica Flechas-Afanador ², Adriana Linares-Ballesteros ² and Jean-Paul Vernot ^{1,4,*}

- ¹ Grupo de Investigación Fisiología Celular y Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D. C. 111321, Colombia; pfruiza@unal.edu.co (P.F.R.-A.); npvanegasa@unal.edu.co (N.-D.P.V.); peortizm@unal.edu.co (P.O.-M.); cacadavidco@unal.edu.co (C.C.-C.)
- ² Grupo de Investigación Oncohematología Pediátrica, Fundación Hospital de la Misericordia, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D. C. 111071, Colombia; guribeb@homifundacion.org.co (G.I.U.); jlagosi@homifundacion.org.co (J.L.); jflechasa@unaLedu.co (J.F.-A.); talinaresb@unal.edu.co (A.L.-B.)
- ³ Servicio de Patología, Laboratorio de Hematología Especial y Citometría de flujo, Fundación Hospital de la Misericordia, Bogotá D. C. 111071, Colombia
- ⁴ Instituto de Investigaciones Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D. C. 111321, Colombia
- * Correspondence: jpvernoth@unaLedu.co; Tel.: +571-316-5000 (ext. 15057); Fax: +571-316-5466

Received: 14 April 2020; Accepted: 3 May 2020; Published: 25 May 2020



Abstract: Mesenchymal stem cells (MSC) favour a scenario where leukemic cells survive. The protein kinase C (PKC) is essential to confer MSC support to leukemic cells and may be responsible for the intrinsic leukemic cell growth. Here we have evaluated the capacity of a chimeric peptide (HKPS), directed against classical PKC isoforms, to inhibit leukemic cell growth. HKPS was able to strongly inhibit viability of different leukemic cell lines, while control HK and PS peptides had no effect. Further testing showed that 30% of primary samples from paediatric B-cell acute lymphoblastic leukaemia (B-ALL) were also strongly affected by HKPS. We showed that HKPS disrupted the supportive effect of MSC that promote leukemic cell survival. Interestingly, ICAM-1 and VLA-5 expression increased in MSC during the co-cultures with B-ALL cells, and we found that HKPS inhibited the interaction between MSC and B-ALL cells due to a reduction in the expression of these adhesion molecules. Of note, the susceptibility of B-ALL cells to dexamethasone increased when MSC were treated with HKPS. These results show the relevance of these molecular interactions in the leukemic niche. The use of HKPS may be a new strategy to disrupt intercellular communications, increasing susceptibility to therapy, and at the same time, directly affecting the growth of PKC-dependent leukemic cells.

Keywords: leukemic microenvironment; mesenchymal support; PKC; B-ALL; chimeric peptide; cell adhesion

1. Introduction

Bone marrow (BM) stromal cells, in particular mesenchymal stem cells (MSC) play a pivotal role in cellular homeostasis within the BM microenvironment not only in physiological but also in pathological conditions [1]. Cross-talk between MSC and leukemic cells has reciprocal functional consequences [2,3], and also in surrounding cells, with overwhelming consequences [4,5]. The relevance of this interaction for the leukemic cells is evidenced by the fact that despite the upregulation of antiapoptotic genes,

| MUESTRA | EDAD | INFILTRACIÓN (%) | GRUPO DE RESPUESTA HKPS | TIPO | CARIOTIPO | WBC | COMPROMISO SNC | RESPUESTA DIA 8 | RIESGO | REMISIÓN AL DIA 15 | EMR AL DÍA 15 | EMR AL FINAL DE LA INDUCCIÓN |
|----------|------|------------------|-------------------------|-------|---------------|-------|----------------|-----------------|------------|--------------------|---------------|------------------------------|
| ALL-B001 | 9 | 95% | III | COMÚN | 46,XX | 43236 | 1 | POBRE | ALTO | NO | 47% | 40.40% |
| ALL-B002 | 10 | 92% | II | PRE-B | 46,XX | 38940 | 1 | BUENA | INTERMEDIO | SI | 0% | 0% |
| ALL-B003 | 2 | 93% | I | PRE-B | 46,XY | 4760 | 1 | BUENA | ALTO | SI | 85.50% | 0% |
| ALL-B004 | 10 | 92% | I | PRE-B | 46,XY | 80750 | 1 | BUENA | INTERMEDIO | SI | 0% | 0% |
| ALL-B005 | 4 | 95% | III | PRE-B | 46,XX | 7550 | 1 | BUENA | INTERMEDIO | SI | 1.27% | 0% |
| ALL-B006 | 9 | 97% | III | PRE-B | 46,XY | 5140 | 1 | BUENA | ALTO | SI | 15.31% | 0% |
| ALL-B007 | 17 | 80% | I | PRE-B | 46,XX | 10650 | 3 | BUENA | ALTO | SI | 21% | 0% |
| ALL-B008 | 4 | 98% | III | COMÚN | 46,XY | 4530 | 1 | BUENA | INTERMEDIO | SI | 1% | 0% |
| ALL-B009 | 4 | 98% | III | PRE-B | TRISOMÍA 21 | 23190 | 1 | BUENA | INTERMEDIO | SI | 3.47% | 0% |
| ALL-B010 | 9 | 95% | II | COMÚN | HIPERDIPLOIDE | 8420 | 1 | BUENA | INTERMEDIO | SI | 0.08% | 0% |
| ALL-B011 | 2 | 95% | I | COMÚN | HIPERDIPLOIDE | 2740 | 1 | BUENA | INTERMEDIO | SI | 4.70% | 0% |
| ALL-B012 | 11 | 98% | II | PRE-B | 46,XX | 5300 | 3 | BUENA | INTERMEDIO | SI | 0.04% | 0% |
| ALL-B013 | 4 | 95% | I | COMÚN | 46,XY | 6010 | 1 | POBRE | ALTO | NO | 64% | 0.76% |
| ALL-B014 | 4 | 89% | II | COMÚN | 46,XY | 3360 | 1 | BUENA | ESTÁNDAR | SI | 0% | 0% |
| ALL-B015 | 3 | 95% | III | COMÚN | 46,XX | 7330 | 1 | BUENA | INTERMEDIO | SI | 0.07% | 0.02% |
| ALL-B016 | 3 | 90% | I | COMÚN | 46,XY | 6920 | 1 | POBRE | INTERMEDIO | SI | 22.75% | 0% |
| ALL-B017 | 6 | 89% | II | COMÚN | HIPERDIPLOIDE | 9710 | 1 | POBRE | ALTO | SI | 3,90% | 0% |
| ALL-B018 | 2 | 90% | III | COMÚN | HIPERDIPLOIDE | 20340 | 1 | BUENA | INTERMEDIO | SI | 0,04% | 0% |
| ALL-B019 | 5 | 85% | II | COMÚN | HIPERDIPLOIDE | 8100 | 1 | BUENA | INTERMEDIO | SI | 1,44% | 0% |
| ALL-B020 | 12 | 92% | II | COMÚN | 46, XY | 8680 | 1 | BUENA | INTERMEDIO | SI | 0% | 0% |
| ALL-B021 | 2 | 98% | I | COMÚN | 46,XY | 5888 | 1 | BUENA | INTERMEDIO | SI | 4,37% | 0% |
| ALL-B022 | 3 | 98% | II | COMÚN | 46,XX | 24500 | 1 | BUENA | INTERMEDIO | SI | 0% | 0% |

Tabla 1. Características al diagnóstico y de respuesta a la quimioterapia de los pacientes. WBC: conteo de células blancas, SNC: Sistema Nervioso Central, EMR: Enfermedad mínima residual.

Bibliografía

- Abrams, S. T., Lakum, T., Lin, K., Jones, G. M., Treweeke, A. T., Farahani, M., et al. (2007). B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia cells is regulated by overexpressed active protein kinase C β II. *Blood* 109, 1193–1201. doi:10.1182/blood-2006-03-012021.
- Ahlers, J., Witte, K. E., Schwarze, C. P., Lang, P., Handgretinger, R., and Ebinger, M. (2014). Therapy response correlates with ALDH activity in ALDH low-positive childhood acute lymphoblastic leukemias. *Pediatr. Hematol. Oncol.* 31, 303–310. doi:10.3109/08880018.2013.859189.
- Amigo-Jiménez, I., Bailón, E., Aguilera-Montilla, N., Terol, M. J., García-Marco, J. A., and García-Pardo, A. (2015). Bone marrow stroma-induced resistance of chronic lymphocytic leukemia cells to arsenic trioxide involves Mcl-1 upregulation and is overcome by inhibiting the PI3K δ or PKC β signaling pathways. *Oncotarget* 6, 44832–44848. doi:10.18632/oncotarget.6265.
- Aquino, A., Hartman, K. D., Knode, M. C., Grant, S., Huang, K. P., Niu, C. H., & Glazer, R. I. (1988). Role of protein kinase C in phosphorylation of vinculin in adriamycin-resistant HL-60 leukemia cells. *Cancer Research*, 48(12), 3324–3329. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3130982>.
- Bailey, L. C., Lange, B. J., Rheingold, S. R., and Bunin, N. J. (2008). Bone-marrow relapse in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol.* 9, 873–883. doi:10.1016/S1470-2045(08)70229-8.
- Bakker, E., Qattan, M., Mutti, L., Demonacos, C., & Krstic-Demonacos, M. (2016). The role of microenvironment and immunity in drug response in leukemia. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.08.003>.
- Balakrishnan, K., Burger, J. A., Quiroga, M. P., Henneberg, M., Ayres, M. L., Wierda, W. G., & Gandhi, V. (2010). Influence of bone marrow stromal microenvironment on flutemetamol-induced responses in CLL primary cells. *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-10-246199>.
- Barragán, M., Bellosillo, B., Campàs, C., Colomer, D., Pons, G., & Gil, J. (2002). Involvement of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in the survival of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*, 99(8), 2969–2976. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11929788>.
- Basu A. (2010). PKC and Resistance to Chemotherapeutic Agents. In: Kazanietz M. (eds) Protein Kinase C in Cancer Signaling and Therapy. *Current Cancer Research*. Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-543-9_21.
- Benabou, N., Mirshahi, P., Bordu, C., Faussat, A. M., Tang, R., Therwath, A., ... Mirshahi, M. (2014). A subset of bone marrow stromal cells regulate ATP-binding cassette gene expression via insulin-like growth factor-I in a leukemia cell line. *International Journal of Oncology*. <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2569>.
- Berry, D. A., Zhou, S., Higley, H., Mukundan, L., Fu, S., Reaman, G. H., et al. (2017). Association of minimal residual disease with clinical outcome in pediatric and adult acute lymphoblastic leukemia: A meta-analysis. *JAMA Oncol.* 3, 170580. doi:10.1001/jamaoncol.2017.0580.
- Bhojwani, D., & Pui, C. H. (2013). Relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet Oncology*. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70580-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70580-6).
- Blobe, G. C., Khan, W. A., Halpern, A. E., Obeid, L. M., & Hannun, Y. A. (1993). Selective regulation of expression of protein kinase C beta isoenzymes occurs via alternative splicing. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(14), 10627–10635. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7683684>.

PKC en un microambiente leucémico con células MSC: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la resistencia a la quimioterapia en células ALL-B

- Bonilla, X., Vanegas, N. D. P., and Vernot, J. P. (2019). Acute leukemia induces senescence and impaired osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells endowing leukemic cells with functional advantages. *Stem Cells Int.* 2019, 3864948. doi:10.1155/2019/3864948.
- Böttcher, S., Ritgen, M., Fischer, K., Stilgenbauer, S., Busch, R. M., Fingerle-Rowson, G., et al. (2012). Minimal residual disease quantification is an independent predictor of progression-free and overall survival in chronic lymphocytic leukemia: A Multivariate analysis from the randomized GCLLSG CLL8 trial. *J. Clin. Oncol.* 30, 980–988. doi:10.1200/JCO.2011.36.9348.
- Boutin, L., Arnautou, P., Trignol, A., Ségot, A., Farge, T., Desterke, C., et al. (2020). Mesenchymal stromal cells confer chemoresistance to myeloid leukemia blasts through Side Population functionality and ABC transporter activation. *Haematologica* 105, 987–998. doi:10.3324/haematol.2018.214379.
- Burger, J. A., Burger, M., & Kipps, T. J. (1999). Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells. *Blood*, 94(11), 3658–3667. https://doi.org/10.1182/blood.v94.11.3658.423k11_3658_3667.
- Chambers, T. C., Zheng, B., and Kuo, J. F. (1992). Regulation by phorbol ester and protein kinase C inhibitors, and by a protein phosphatase inhibitor (okadaic acid), of P-glycoprotein phosphorylation and relationship to drug accumulation in multidrug-resistant human KB cells. *Mol. Pharmacol.* 41.
- Chen, T., Zhang, G., Kong, L., Xu, S., Wang, Y., & Dong, M. (2019). Leukemia-derived exosomes induced IL-8 production in bone marrow stromal cells to protect the leukemia cells against chemotherapy. *Life Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.02.003>.
- Cheung, W. C., and Van Ness, B. (2001). The bone marrow stromal microenvironment influences myeloma therapeutic response in vitro. *Leukemia* 15, 264–271. doi:10.1038/sj.leu.2402022.
- Chiarini, F., Lonetti, A., Evangelisti, C., Buontempo, F., Orsini, E., Evangelisti, C., ... Martelli, A. M. (2016). Advances in understanding the acute lymphoblastic leukemia bone marrow microenvironment: From biology to therapeutic targeting. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.08.015>.
- Choi, Y., and Yu, A.-M. (2014). ABC Transporters in Multidrug Resistance and Pharmacokinetics, and Strategies for Drug Development. *Curr. Pharm. Des.* 20, 793–807. doi:10.2174/138161282005140214165212.
- Churchman, M. L., Evans, K., Richmond, J., Robbins, A., Jones, L., Shapiro, I. M., et al. (2016). Synergism of FAK and tyrosine kinase inhibition in Ph+ B-ALL. *JCI Insight* 1. doi:10.1172/jci.insight.86082.
- Civini, S., Jin, P., Ren, J., Sabatino, M., Castiello, L., Jin, J., ... Stroncek, D. (2013). Leukemia cells induce changes in human bone marrow stromal cells. *Journal of Translational Medicine*. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-11-298>.
- Colmone, A., Amorim, M., Pontier, A. L., Wang, S., Jablonski, E., & Sipkins, D. A. (2008). Leukemic Cells Create Bone Marrow Niches That Disrupt the Behavior of Normal Hematopoietic Progenitor Cells. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1164390>.
- Colombo, M., Galletti, S., Bulfamante, G., Falleni, M., Tosi, D., Todoerti, K., et al. (2016). Multiple myeloma-derived Jagged ligands increases autocrine and paracrine interleukin-6 expression in bone marrow niche. *Oncotarget* 7, 56013–56029. doi:10.18632/oncotarget.10820.
- Cubillos, M., Vernot, J.P. (2007). Efecto de la inhibición de la proteína quinasa C en la diferenciación de monocito inducida por forbol 12-miristato-13 acetato. Tesis, PUJ.
- Damiano, J. S., Cress, A. E., Hazlehurst, L. A., Shtil, A. A., and Dalton, W. S. (1999). Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): Role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines. *Blood* 93, 1658–1667. doi:10.1182/blood.v93.5.1658.405a19_1658_1667.

PKC en un microambiente leucémico con células MSC: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la resistencia a la quimioterapia en células ALL-B

- Dandekar, S., Romanos-Sirakis, E., Pais, F., Bhatla, T., Jones, C., Bourgeois, W., ... Carroll, W. L. (2014). Wnt inhibition leads to improved chemosensitivity in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology*. <https://doi.org/10.1111/bjh.13011>.
- De Vasconcellos, jáira ferreira, Laranjeira, A. B. A., Zanchin, N. I. T., Otubo, R., Vaz, T. H., Cardoso, A. A., ... Yunes, J. A. (2011). Increased CCL2 and IL-8 in the bone marrow microenvironment in acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric Blood and Cancer*. <https://doi.org/10.1002/pbc.22941>.
- Deininger, M. W. N., Tyner, J. W., and Solary, E. (2017). Turning the tide in myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Nat. Rev. Cancer* 17, 425–440. doi:10.1038/nrc.2017.40.
- Drexler, H., Gignac, S., Jones, R., Scott, C., Pettit, G., & Hoffbrand, A. (1989). Bryostatín 1 induces differentiation of B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*, 74(5). Retrieved from <http://www.bloodjournal.org/content/74/5/1747?sso-checked=true>
- Duan, C. W., Shi, J., Chen, J., Wang, B., Yu, Y. H., Qin, X., ... Hong, D. L. (2014). Leukemia propagating cells rebuild an evolving niche in response to therapy. *Cancer Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.04.015>.
- Ebinger, S., Özdemir, E. Z., Ziegenhain, C., Tiedt, S., Castro Alves, C., Grunert, M., ... Jeremias, I. (2016). Characterization of Rare, Dormant, and Therapy-Resistant Cells in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.11.002>.
- El Azreq, M. A., Naci, D., and Aoudjit, F. (2012). Collagen/ β 1 integrin signaling up-regulates the ABCC1/MRP-1 transporter in an ERK/MAPK-dependent manner. *Mol. Biol. Cell* 23, 3473–3484. doi:10.1091/mbc.E12-02-0132.
- Fine, R. L., Patel, J., & Chabner, B. A. (1988). Phorbol esters induce multidrug resistance in human breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.2.582>.
- Floren, M., Restrepo Cruz, S., Termini, C. M., Marjon, K. D., Lidke, K. A., and Gillette, J. M. (2020). Tetraspanin CD82 drives acute myeloid leukemia chemoresistance by modulating protein kinase C alpha and β 1 integrin activation. *Oncogene* 39, 3910–3925. doi:10.1038/s41388-020-1261-0.
- Frismantas, V., Dobay, M. P., Rinaldi, A., Tchinda, J., Dunn, S. H., Kunz, J., et al. (2017). Ex vivo drug response profiling detects recurrent sensitivity patterns in drug-resistant acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 129, e26–e37. doi:10.1182/blood-2016-09-738070.
- Garces de Los Fayos Alonso, I., Liang, H. C., Turner, S. D., Lagger, S., Merkel, O., and Kenner, L. (2018). The role of activator protein-1 (AP-1) family members in CD30-positive lymphomas. *Cancers (Basel)*. 10. doi:10.3390/cancers10040093.
- Garg, R., Benedetti, L. G., Abera, M. B., Wang, H., Abba, M., and Kazanietz, M. G. (2014). Protein kinase C and cancer: what we know and what we do not. *Oncogene* 33, 5225–5237. doi:10.1038/onc.2013.524.
- Gaynon, P. S. (2005). Childhood acute lymphoblastic leukaemia and relapse. *Br. J. Haematol.* 131, 579–587. doi:10.1111/j.1365-2141.2005.05773.x.
- Gaynon, P. S., Qu, R. P., Chappell, R. J., Willoughby, M. L. N., Tubergen, D. G., Steinherz, P. G., et al. (1998). Survival after relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia: Impact of site and time to first relapse - The Children's Cancer Group experience. *Cancer* 82, 1387–1395. doi:10.1002/(SICI)1097-0142(19980401)82:7<1387::AID-CNCR24>3.0.CO;2-1.
- Gökbuget, N., Stanze, D., Beck, J., Diedrich, H., Horst, H. A., Hüttmann, A., ... Hoelzer, D. (2012). Outcome of relapsed adult lymphoblastic leukemia depends on response to salvage chemotherapy, prognostic

PKC en un microambiente leucémico con células MSC: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la resistencia a la quimioterapia en células ALL-B

factors, and performance of stem cell transplantation. *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-12-399287>.

- Graff, J. R., McNulty, A. M., Hanna, K. R., Konicek, B. W., Lynch, R. L., Bailey, S. N., ... Thornton, D. (2005). The protein kinase C β -selective inhibitor, Enzastaurin (LY317615.HCl), suppresses signaling through the AKT pathway, induces apoptosis, and suppresses growth of human colon cancer and glioblastoma xenografts. *Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0071>.
- Grandage, V. L., Everington, T., Linch, D. C., and Khwaja, A. (2006). Gö6976 is a potent inhibitor of the JAK 2 and FLT3 tyrosine kinases with significant activity in primary acute myeloid leukaemia cells. *Br. J. Haematol.* 135, 303–316. doi:10.1111/j.1365-2141.2006.06291.x.
- Griner, E. M., and Kazanietz, M. G. (2007). Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 7, 281–294. doi:10.1038/nrc2110.
- Guzman, M. L., Li, X., Corbett, C. A., Rossi, R. M., Bushnell, T., Liesveld, J. L., ... Jordan, C. T. (2007). Rapid and selective death of leukemia stem and progenitor cells induced by the compound 4-benzyl, 2-methyl, 1,2,4-thiadiazolidine, 3,5 dione (TDZD-8). *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-05-088815>.
- Hazlehurst, L. A., and Dalton, W. S. (2001). Mechanisms associated with cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR) in hematopoietic malignancies. *Cancer Metastasis Rev.* 20, 43–50. doi:10.1023/A:1013156407224.
- Houthuijzen, J. M., Daenen, L. G. M., Roodhart, J. M. L., & Voest, E. E. (2012). The role of mesenchymal stem cells in anti-cancer drug resistance and tumour progression. *British Journal of Cancer*. <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.201>.
- Hunger, S. P., Lu, X., Devidas, M., Camitta, B. M., Gaynon, P. S., Winick, N. J., ... Carroll, W. L. (2012). Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: A report from the children's oncology group. *Journal of Clinical Oncology*. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.37.8018>.
- Hunger-Glaser, I., Fan, R. S., Perez-Salazar, E., and Rozengurt, E. (2004). PDGF and FGF induce focal adhesion kinase (FAK) phosphorylation at Ser-910: Dissociation from Tyr-397 phosphorylation and requirement for ERK activation. *J. Cell. Physiol.* 200, 213–222. doi:10.1002/jcp.20018.
- Hurwitz, C. A., Silverman, L. B., Schorin, M. A., Clavell, L. A., Dalton, V. K., Glick, K. M., ... Sallan, S. E. (2000). Substituting dexamethasone for prednisone complicates remission induction in children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0142\(20000415\)88:8<1964::AID-CNCR27>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0142(20000415)88:8<1964::AID-CNCR27>3.0.CO;2-1).
- Ido, M., Asao, T., Sakurai, M., Inagaki, M., Saito, M., & Hidaka, H. (1986). An inhibitor of protein kinase C, 1-(5-isoquinolinylsulfonyl)-2-methylpiperazine(H-7) inhibits TPA-induced reduction of vincristine uptake from P388 murine leukemic cell. *Leukemia Research*, 10(9), 1063–1069. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3762216>.
- Inaba, H., Greaves, M., & Mullighan, C. G. (2013). Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)62187-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)62187-4).
- Isakov, N. (2018). Protein kinase C (PKC) isoforms in cancer, tumor promotion and tumor suppression. *Semin. Cancer Biol.* 48, 36–52. doi:10.1016/J.SEMCANCER.2017.04.012.

PKC en un microambiente leucémico con células MSC: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la resistencia a la quimioterapia en células ALL-B

- Ishikawa, F., Yoshida, S., Saito, Y., Hijikata, A., Kitamura, H., Tanaka, S., ... Shultz, L. D. (2007). Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region. *Nature Biotechnology*. <https://doi.org/10.1038/nbt1350>.
- Itkin, T., Gur-Cohen, S., Spencer, J. A., Schajnovitz, A., Ramasamy, S. K., Kusumbe, A. P., et al. (2016). Distinct bone marrow blood vessels differentially regulate haematopoiesis. *Nature* 532, 323–328. doi:10.1038/nature17624.
- Iwamoto, S., Mihara, K., Downing, J. R., Pui, C. H., & Campana, D. (2007). Mesenchymal cells regulate the response of acute lymphoblastic leukemia cells to asparaginase. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI30235>
- Jacamo, R., Chen, Y., Wang, Z., Wencai, M., Zhang, M., Spaeth, E. L., ... Andreeff, M. (2014). Reciprocal leukemia-stroma VCAM-1/VLA-4-dependent activation of NF- κ B mediates chemoresistance. *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-06-511527>
- Jiffar, T., Kurinna, S., Suck, G., Carlson-Bremer, D., Ricciardi, M. R., Konopleva, M., ... Ruvolo, P. P. (2004). PKC α mediates chemoresistance in acute lymphoblastic leukemia through effects on Bcl2 phosphorylation. *Leukemia*. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403275>.
- Jin, L., Hope, K. J., Zhai, Q., Smadja-Joffe, F., & Dick, J. E. (2006). Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells. *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/nm1483>.
- Jin, L., Tabe, Y., Konoplev, S., Xu, Y., Leysath, C. E., Lu, H., ... Konopleva, M. (2008). CXCR4 up-regulation by imatinib induces chronic myelogenous leukemia (CML) cell migration to bone marrow stroma and promotes survival of quiescent CML cells. *Molecular Cancer Therapeutics*. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.mct-07-0042>.
- Juarez, J., Baraz, R., Gaundar, S., Bradstock, K., & Bendall, L. (2007). Interaction of interleukin-7 and interleukin-3 with the CXCL12-induced proliferation of B-cell progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. <https://doi.org/10.3324/haematol.10621>.
- Kamdje, A. H. N., Mosna, F., Bifari, F., Lisi, V., Bassi, G., Malpeli, G., ... Krampera, M. (2011). Notch-3 and Notch-4 signaling rescue from apoptosis human B-ALL cells in contact with human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-326694>.
- Kameyama, N., Arisawa, S., Ueyama, J., Kagota, S., Shinozuka, K., Hattori, A., ... Wakusawa, S. (2008). Increase in P-glycoprotein accompanied by activation of protein kinase C α and NF- κ B p65 in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1782(5), 355–360. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2008.02.005>.
- Keenan, C., Thompson, S., Knox, K., and Pears, C. (1999). Protein kinase C- α is essential for Ramos-BL B cell survival. *Cell. Immunol.* 196, 104–109. doi:10.1006/cimm.1999.1549.
- Khan, N. I., Bradstock, K. F., & Bendall, L. J. (2007). Activation of Wnt/ β -catenin pathway mediates growth and survival in B-cell progenitor acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2007.06667.x>
- Kikkawa, U., Takai, Y., Tanaka, Y., Miyake, R., & Nishizuka, Y. (1983). Protein kinase C as a possible receptor protein of tumor-promoting phorbol esters. *Journal of Biological Chemistry*.

PKC en un microambiente leucémico con células MSC: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la resistencia a la quimioterapia en células ALL-B

- Kim, Y. W., Koo, B. K., Jeong, H. W., Yoon, M. J., Song, R., Shin, J., ... Kong, Y. Y. (2008). Defective Notch activation in microenvironment leads to myeloproliferative disease. *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-03-148999>.
- Kolch, W., Heidecker, G., Kochs, G., Hummel, R., Vahidi, H., Mischak, H., ... Rapp, U. R. (1993). Protein kinase C α activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/364249a0>.
- Komada, F., Nishikawa, M., Uemura, Y., Hidaka, K. M. H., and Shirakawa, S. (1991). Expression of Three Major Protein Kinase C Isozymes in Various Types of Human Leukemic Cells¹.
- Konopleva, M. Y., & Jordan, C. T. (2011). Leukemia stem cells and microenvironment: Biology and therapeutic targeting. *Journal of Clinical Oncology*. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.31.0904>.
- Konopleva, M., Konoplev, S., Hu, W., Zaritskey, A. Y., Afanasiev, B. V., & Andreeff, M. (2002). Stromal cells prevent apoptosis of AML cells by up-regulation of anti-apoptotic proteins. *Leukemia*. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402608>.
- Kurtova, A. V., Balakrishnan, K., Chen, R., Ding, W., Schnabl, S., Quiroga, M. P., ... Burger, J. A. (2009). Diverse marrow stromal cells protect CLL cells from spontaneous and drug-induced apoptosis: development of a reliable and reproducible system to assess stromal cell adhesion-mediated drug resistance. *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-07-233718>.
- Laranjeira, A. B. A., De Vasconcellos, J. F., Sodek, L., Spago, M. C., Fornazim, M. C., Tone, L. G., et al. (2012). IGFBP7 participates in the reciprocal interaction between acute lymphoblastic leukemia and BM stromal cells and in leukemia resistance to asparaginase. *Leukemia* 26, 1001–1011. doi:10.1038/leu.2011.289.
- Larson, R. A., Dodge, R. K., Burns, C. P., Lee, E. J., Stone, R. M., Schulman, P., ... Frankel, S. R. (1995). A five-drug remission induction regimen with intensive consolidation for adults with acute lymphoblastic leukemia: cancer and leukemia group B study 8811. *Blood*.
- Lazarus, H., & Miller, M. (2016). Midostaurin: an emerging treatment for acute myeloid leukemia patients. *Journal of Blood Medicine*. <https://doi.org/10.2147/JBM.S100283>.
- Lei, J., Li, Q., Gao, Y., Zhao, L., and Liu, Y. (2016). Increased PKC α activity by Rack1 overexpression is responsible for chemotherapy resistance in T-cell acute lymphoblastic leukemia-derived cell line. *Sci. Rep.* 6, 1–12. doi:10.1038/srep33717.
- Leung, C., Nguyen, K., cancer, R. F.-L., and 2018, undefined Mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors in solid tumours. *pharmaceutical-journal.com*. Available at: <http://www.pharmaceutical-journal.com/research/review-article/mammalian-target-of-rapamycin-mtor-inhibitors-in-solid-tumours/20200813.article> [Accessed February 11, 2019].
- Levesque, J. P., and Winkler, I. G. (2016). Cell Adhesion Molecules in Normal and Malignant Hematopoiesis: from Bench to Bedside. *Curr. Stem Cell Reports* 2, 356–367. doi:10.1007/s40778-016-0066-0.
- Liu, C.-C., Leclair, P., Yap, S. Q., & Lim, C. J. (2013). The Membrane-Proximal KXGFFKR Motif of β -Integrin Mediates Chemoresistance. *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/mcb.00580-13>
- Liu, J., Masurekar, A., Johnson, S., Chakraborty, S., Griffiths, J., Smith, D., ... Saha, V. (2015). Stromal cell-mediated mitochondrial redox adaptation regulates drug resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget*. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5528>.
- Liu, K. Y., Timmons, S., Lin, Y. Z., and Hawiger, J. (2002). Identification of a functionally important sequence in

PKC en un microambiente leucémico con células MSC: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la resistencia a la quimioterapia en células ALL-B

the cytoplasmic tail of integrin beta 3 by using cell-permeable peptide analogs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* doi:10.1073/pnas.93.21.11819.

- Loo, T. M., Miyata, K., Tanaka, Y., and Takahashi, A. (2020). Cellular senescence and senescence-associated secretory phenotype via the cGAS-STING signaling pathway in cancer. *Cancer Sci.* 111, 304–311. doi:10.1111/cas.14266.
- Luskin, M. R., Murakami, M. A., Manalis, S. R., & Weinstock, D. M. (2018). Targeting minimal residual disease: A path to cure? *Nature Reviews Cancer.* <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.125>.
- Lutz, C., Woll, P. S., Hall, G., Castor, A., Dreau, H., Cazzaniga, G., ... Enver, T. (2013). Quiescent leukaemic cells account for minimal residual disease in childhood lymphoblastic leukaemia. *Leukemia.* <https://doi.org/10.1038/leu.2012.306>.
- Lutzny, G., Kocher, T., Schmidt-Supprian, M., Rudelius, M., Klein-Hitpass, L., Finch, A. J., ... Ringshausen, I. (2013). Protein Kinase C- β -Dependent Activation of NF- κ B in Stromal Cells Is Indispensable for the Survival of Chronic Lymphocytic Leukemia B Cells In Vivo. *Cancer Cell.* <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.12.003>.
- Lwin, T., Hazlehurst, L. A., Li, Z., Dessureault, S., Sotomayor, E., Moscinski, L. C., ... Tao, J. (2007). Bone marrow stromal cells prevent apoptosis of lymphoma cells by upregulation of anti-apoptotic proteins associated with activation of NF- κ B (RelB/p52) in non-Hodgkin's lymphoma cells. *Leukemia.* <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404723>.
- Ma, Z., Zhao, X., Deng, M., Huang, Z., Wang, J., Wu, Y., ... Ouyang, G. (2019). Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cell-Derived Periostin Promotes B-ALL Progression by Modulating CCL2 in Leukemia Cells. *Cell Reports.* <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.034>.
- Manabe, A., Coustan-Smith, E., Behm, F. G., Raimondi, S. C., and Campana, D. (1992). Bone marrow-derived stromal cells prevent apoptotic cell death in B- lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 79, 2370–2377. doi:10.1182/blood.v79.9.2370.bloodjournal7992370.
- Matsunaga, T., Takemoto, N., Sato, T., Takimoto, R., Tanaka, I., Fujimi, A., ... Niitsu, Y. (2003). Interaction between leukemic-cell VLA-4 and stromal fibronectin is a decisive factor for minimal residual disease of acute myelogenous leukemia. *Nature Medicine.* <https://doi.org/10.1038/nm909>.
- McMillin, D. W., Delmore, J., Weisberg, E., Negri, J. M., Geer, D. C., Klippel, S., et al. (2010). Tumor cell-specific bioluminescence platform to identify stroma-induced changes to anticancer drug activity. *Nat. Med.* 16, 483–489. doi:10.1038/nm.2112.
- McMillin, D. W., Negri, J. M., and Mitsiades, C. S. (2013). The role of tumour-stromal interactions in modifying drug response: Challenges and opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* 12, 217–228. doi:10.1038/nrd3870.
- Meads, M. B., Hazlehurst, L. A., & Dalton, W. S. (2008). The bone marrow microenvironment as a tumor sanctuary and contributor to drug resistance. *Clinical Cancer Research.* <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-2223>.
- Méndez-Ferrer, S., Bonnet, D., Steensma, D. P., Hasserjian, R. P., Ghobrial, I. M., Gribben, J. G., et al. (2020). Bone marrow niches in haematological malignancies. *Nat. Rev. Cancer* 20, 285–298. doi:10.1038/s41568-020-0245-2.
- Mochly-Rosen, D., Das, K., and Grimes, K. V. (2012). Protein kinase C, an elusive therapeutic target? *Nat. Rev. Drug Discov.* 11, 937–957. doi:10.1038/nrd3871.

PKC en un microambiente leucémico con células MSC: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la resistencia a la quimioterapia en células ALL-B

- Mochly-Rosen, D., Khaner, H., & Lopez, J. (2006). Identification of intracellular receptor proteins for activated protein kinase C. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.9.3997>.
- Mochly-Rosen, D., Khaner, H., and Lopez, J. (1991). Identification of intracellular receptor proteins for activated protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 3997–4000. doi:10.1073/pnas.88.9.3997.
- Moschoi, R., Imbert, V., Nebout, M., Chiche, J., Mary, D., Prebet, T., ... Griessinger, E. (2016). Protective mitochondrial transfer from bone marrow stromal cells to acute myeloid leukemic cells during chemotherapy. *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-07-655860>.
- Moses, B. S., Slone, W. L., Thomas, P., Evans, R., Piktel, D., Angel, P. M., ... Gibson, L. F. (2016). Bone marrow microenvironment modulation of acute lymphoblastic leukemia phenotype. *Experimental Hematology*. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2015.09.003>.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- Mouchel, N. A. P., & Jenkins, J. R. (2006). The identification of a functional interaction between PKC and topoisomerase II. *FEBS Letters*, 580(1), 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.11.075>.
- Mudry, M. E., Fortney, J. E., York, T., Hall, B. M., & Gibson, L. F. (2000). Stromal cells regulate survival of B-lineage leukemic cells during chemotherapy. *Blood*, 96(5), 1926–1932. https://doi.org/10.1182/blood.v96.5.1926.h8001926_1926_1932.
- Mullighan, C. G. (2012). The molecular genetic makeup of acute lymphoblastic leukemia. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Progr.* doi:10.1182/ASHEDUCATION-2012.1.389.
- Naci, D., El Azreq, M. A., Chetoui, N., Laudén, L., Sigaux, F., Charron, D., et al. (2012). $\alpha 2\beta 1$ integrin promotes chemoresistance against doxorubicin in cancer cells through extracellular signal-regulated kinase (ERK). *J. Biol. Chem.* 287, 17065–17076. doi:10.1074/jbc.M112.349365.
- Nakagawa, R., Soh, J. W., & Michie, A. M. (2006). Subversion of protein kinase C α signaling in hematopoietic progenitor cells results in the generation of a B-cell chronic lymphocytic leukemia-like population in vivo. *Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0841>.
- Nakagawa, R., Vukovic, M., Tarafdar, A., Cosimo, E., Dunn, K., McCaig, A. M., et al. (2015). Generation of a poor prognostic chronic lymphocytic leukemia-like disease model: PKC α subversion induces up-regulation of PKC β II expression in B lymphocytes. *Haematologica* 100, 499–510. doi:10.3324/haematol.2014.112276.
- Nefedova, Y., Landowski, T. H., and Dalton, W. S. (2003). Bone marrow stromal-derived soluble factors and direct cell contact contribute to de novo drug resistance of myeloma cells by distinct mechanisms. *Leukemia* 17, 1175–1182. doi:10.1038/sj.leu.2402924.
- Nervi, B., Ramirez, P., Rettig, M. P., Uy, G. L., Holt, M. S., Ritchey, J. K., ... DiPersio, J. F. (2009). Chemosensitization of acute myeloid leukemia (AML) following mobilization by the CXCR4 antagonist AMD3100. *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-06-162123>
- Newton, A. C. (2003). Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. *Biochemical Journal*. <https://doi.org/10.1042/bj20021626>.
- Nishizuka, Y. (1986). Studies and perspectives of protein kinase C. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.3014651>.

PKC en un microambiente leucémico con células MSC: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la resistencia a la quimioterapia en células ALL-B

Nwajei, F., & Konopleva, M. (2013). The Bone Marrow Microenvironment as Niche Retreats for Hematopoietic and Leukemic Stem Cells. *Advances in Hematology*. <https://doi.org/10.1155/2013/953982>.

Parameswaran, R., Yu, M., Lim, M., Groffen, J., & Heisterkamp, N. (2011). Combination of drug therapy in acute lymphoblastic leukemia with a CXCR4 antagonist. *Leukemia*. <https://doi.org/10.1038/leu.2011.76>

Parekh, D. B., Ziegler, W., & Parker, P. J. (2000). Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation. *EMBO Journal*. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.4.496>.

Park, E., Chen, J., Moore, A., Mangolini, M., Santoro, A., Boyd, J. R., et al. (2020). Stromal cell protein kinase C- β inhibition enhances chemosensitivity in B cell malignancies and overcomes drug resistance. *Sci. Transl. Med.* 12. doi:10.1126/scitranslmed.aax9340.

Perdomo-Arciniegas, A. M., Patarroyo, M. E., & Vernot, J.-P., (2008). Novel chimeric peptide inhibits Protein Kinase C and induces apoptosis in human immune cells. *Journal of Peptide Research and Therapeutics*. <https://doi.org/s10989-007-9118-8>.

Pike, K. G., Malagu, K., Hummersone, M. G., Menear, K. A., Duggan, H. M. E., Gomez, S., ... Pass, M. (2013). Optimization of potent and selective dual mTORC1 and mTORC2 inhibitors: The discovery of AZD8055 and AZD2014. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.01.019>

Pinho, S., and Frenette, P. S. (2019). Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20, 303–320. doi:10.1038/s41580-019-0103-9.

Podar, K., Raab, M. S., Zhang, J., McMillin, D., Breitzkreutz, I., Tai, Y. T., ... Anderson, K. C. (2007). Targeting PKC in multiple myeloma: In vitro and in vivo effects of the novel, orally available small-molecule inhibitor enzastaurin (LY317615.HCl). *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-08-042747>.

Raaijmakers, M. H. G. P., Mukherjee, S., Guo, S., Zhang, S., Kobayashi, T., Schoonmaker, J. A., ... Scadden, D. T. (2010). Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature08851>.

Ratnasinghe, D., Daschner, P. J., Anver, M. R., Kasprzak, B. H., Taylor, P. R., Yeh, G. C., & Tangrea, J. A. (n.d.). Cyclooxygenase-2, P-glycoprotein-170 and drug resistance; is chemoprevention against multidrug resistance possible? *Anticancer Research*, 21(3C), 2141–2147. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11501838>.

Redig, A. J., & Plataniias, L. C. (2008). Protein kinase C signalling in leukemia. *Leukemia and Lymphoma*. <https://doi.org/10.1080/10428190802007726>.

Redondo-Muñoz, J., García-Pardo, A., & Teixidó, J. (2019). Molecular players in hematologic tumor cell trafficking. *Frontiers in Immunology*, 10(FEB), 156. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00156>.

Reuter, C. W., Morgan, M. A., & Bergmann, L. (2000). Targeting the Ras signaling pathway: a rational, mechanism-based treatment for hematologic malignancies? *Blood*.

Rudin, S., Marable, M., & Huang, R. S. (2017). The Promise of Pharmacogenomics in Reducing Toxicity During Acute Lymphoblastic Leukemia Maintenance Treatment. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2016.11.003>.

Ruiz-Aparicio, P. F., Vanegas, N. D. P., Uribe, G. I., Ortiz-Montero, P., Cadavid-Cortés, C., Lagos, J., et al. (2020). Dual targeting of stromal cell support and leukemic cell growth by a peptidic pkc inhibitor shows

PKC en un microambiente leucémico con células MSC: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la resistencia a la quimioterapia en células ALL-B

effectiveness against b-all. *Int. J. Mol. Sci.* 21. doi:10.3390/ijms21103705.

- Rupec, R. A., Jundt, F., Rebholz, B., Eckelt, B., Weindl, G., Herzinger, T., et al. (2005). Stroma-mediated dysregulation of myelopoiesis in mice lacking I κ B α . *Immunity* 22, 479–491. doi:10.1016/j.immuni.2005.02.009.
- Ruvolo, P. P., Deng, X., Carr, B. K., & May, W. S. (1998). A functional role for mitochondrial protein kinase C α in Bcl2 phosphorylation and suppression of apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.39.25436>.
- Ruvolo, P. P., Zhou, L., Watt, J. C., Ruvolo, V. R., Burks, J. K., Jiffar, T., ... Andreeff, M. (2011). Targeting PKC-mediated signal transduction pathways using enzastaurin to promote apoptosis in acute myeloid leukemia-derived cell lines and blast cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. <https://doi.org/10.1002/jcb.23090>.
- Saba, N., Angelova, M., Lobelle-Rich, P., and Levy, L. S. (2012). Enzastaurin Induces Apoptosis and Cell Cycle Arrest in B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Cell Lines Through AKT Pathway Inhibition and β -Catenin Accumulation. *Blood* 120. Available at: <http://www.bloodjournal.org/content/120/21/1350?sso-checked=true> [Accessed February 11, 2019].
- Samra, B., Richard-Carpentier, G., Kadia, T. M., Ravandi, F., Daver, N., DiNardo, C. D., et al. (2020). Characteristics and outcomes of patients with therapy-related acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Blood Cancer J.* 10, 47. doi:10.1038/s41408-020-0316-3.
- Samuels, D. S., Shimizu, Y., & Shimizu, N. (1989). Protein kinase C phosphorylates DNA topoisomerase I. *FEBS Letters*, 259(1), 57–60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2557245>.
- Sato, S., Fujita, N., & Tsuruo, T. (2002). Interference with PDK1-Akt survival signaling pathway by UCN-01 (7-hydroxystaurosporine). *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205225>
- Scavino, H. F., George, J. N., & Sears, D. A. (1976). Remission induction in adult acute lymphocytic leukemia. Use of vincristine and prednisone alone. *Cancer*. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197608\)38:2<672::AID-CNCR2820380208>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197608)38:2<672::AID-CNCR2820380208>3.0.CO;2-C).
- Scharff, B. F. S. S., Modvig, S., Marquart, H. V., and Christensen, C. (2020). Integrin-Mediated Adhesion and Chemoresistance of Acute Lymphoblastic Leukemia Cells Residing in the Bone Marrow or the Central Nervous System. *Front. Oncol.* 10, 775. doi:10.3389/fonc.2020.00775.
- Schepers, K., Pietras, E. M., Reynaud, D., Flach, J., Binnewies, M., Garg, T., ... Passegué, E. (2013). Myeloproliferative neoplasia remodels the endosteal bone marrow niche into a self-reinforcing leukemic niche. *Cell Stem Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.06.009>.
- Schneider, P., Vasse, M., Bayati, A. Al, Lenormand, B., & Vannier, J. P. (2002). Is high expression of the chemokine receptor CXCR-4 of predictive value for early relapse in childhood acute lymphoblastic leukaemia? [6]. *British Journal of Haematology*. https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2002.03835_6.x.
- Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*.
- Schrapppe, M., Reiter, A., Zimmermann, M., Harbott, J., Ludwig, W. D., Henze, G., ... Riehm, H. (2000). Long-term results of four consecutive trials in childhood ALL performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 1995. *Leukemia*. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2401973>.

PKC en un microambiente leucémico con células MSC: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la resistencia a la quimioterapia en células ALL-B

- Schwartz, G. K., Arkin, H., Holland, J. F., & Ohnuma, T. (1991). Protein kinase C activity and multidrug resistance in MOLT-3 human lymphoblastic leukemia cells resistant to trimetrexate. *Cancer Research*, 51(1), 55–61. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1824824>.
- Senft, D., and Jeremias, I. (2019). A rare subgroup of leukemia stem cells harbors relapse-inducing potential in acute lymphoblastic leukemia. *Exp. Hematol.* 69, 1–10. doi:10.1016/j.exphem.2018.09.006.
- Sharma, M., Ross, C., and Srivastava, S. (2019). Ally to adversary: Mesenchymal stem cells and their transformation in leukaemia. *Cancer Cell Int.* 19, 139. doi:10.1186/s12935-019-0855-5.
- Shishido, S., Böning, H., & Kim, Y.-M. (2014). Role of integrin alpha4 in drug resistance of leukemia. *Frontiers in Oncology*. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00099>
- Sison, E. A. R., Magoon, D., Li, L., Annesley, C. E., Small, D., & Brown, P. (2014). Plerixafor as a chemosensitizing agent in pediatric acute lymphoblastic leukemia: efficacy and potential mechanisms of resistance to CXCR4 inhibition. *Oncotarget*. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2407>.
- Soo, W. L., Han, S. I., Kim, H. H., and Zang, H. L. (2002). TAK1-dependent activation of AP-1 and c-Jun N-terminal kinase by receptor activator of NF- κ B. *J. Biochem. Mol. Biol.* 35, 371–376. doi:10.5483/bmbrep.2002.35.4.371.
- Spiegel, A., Kollet, O., Peled, A., Abel, L., Nagler, A., Bielorai, B., et al. (2004). Unique SDF-1-induced activation of human precursor-B ALL cells as a result of altered CXCR4 expression and signaling. *Blood* 103, 2900–2907. doi:10.1182/blood-2003-06-1891.
- Staroselsky, A. N., Fan, D., O'Brian, C. A., Bucana, C. D., Gupta, K. P., and Fidler, I. J. (1990). Site-dependent Differences in Response of the UV-2237 Murine Fibrosarcoma to Systemic Therapy with Adriamycin. *Cancer Res.* 50.
- Stebbins, E. G., & Mochly-Rosen, D. (2001). Binding Specificity for RACK1 Resides in the V5 Region of β II Protein Kinase C. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101044200>.
- Steinberg, S. F. (2008). Structural Basis of Protein Kinase C Isoform Function. *Physiological Reviews*. <https://doi.org/10.1152/physrev.00034.2007>
- Sun, W., Malvar, J., Sposto, R., Verma, A., Wilkes, J. J., Dennis, R., ... Whitlock, J. A. (2018). Outcome of children with multiply relapsed B-cell acute lymphoblastic leukemia: a therapeutic advances in childhood leukemia & lymphoma study. *Leukemia*. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0094-0>.
- Svirnovski, A. I., Shman, T. V., Serhiyenkal, T. F., Savitski, V. P., Smolnikoval, V. V., and Fedasenka, U. U. (2009). ABCB1 and ABCG2 proteins, their functional activity and gene expression in concert with drug sensitivity of leukemia cells. *Hematology* 14, 204–212. doi:10.1179/102453309X426218.
- Tabe, Y., Jin, L., Tsutsumi-Ishii, Y., Xu, Y., McQueen, T., Priebe, W., et al. (2007). Activation of Integrin-Linked Kinase Is a Critical Prosurvival Pathway Induced in Leukemic Cells by Bone Marrow-Derived Stromal Cells. *Cancer Res.* 67, 684–694. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3166.
- Takai, Y., Kishimoto, A., Iwasa, Y., Kawahara, Y., Mori, T., & Nishizuka, Y. (1979). Calcium-dependent activation of a multifunctional protein kinase by membrane phospholipids. *Journal of Biological Chemistry*.
- Takami, M., Katayama, K., Noguchi, K., and Sugimoto, Y. (2018). Protein kinase C alpha-mediated phosphorylation of PIM-1L promotes the survival and proliferation of acute myeloid leukemia cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 503, 1364–1371. doi:10.1016/j.bbrc.2018.07.049.

PKC en un microambiente leucémico con células MSC: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la resistencia a la quimioterapia en células ALL-B

- Tamma, R., & Ribatti, D. (2017). Bone niches, hematopoietic stem cells, and vessel formation. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms18010151>.
- Terwilliger, T., & Abdul-Hay, M. (2017). Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer Journal*. <https://doi.org/10.1038/bcj.2017.53>.
- Tesfai, Y., Ford, J., Carter, K. W., Firth, M. J., O'Leary, R. A., Gottardo, N. G., ... Kees, U. R. (2012). Interactions between acute lymphoblastic leukemia and bone marrow stromal cells influence response to therapy. *Leukemia Research*. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2011.08.001>.
- Timaner, M., Tsai, K. K., and Shaked, Y. (2019). The multifaceted role of mesenchymal stem cells in cancer. *Semin. Cancer Biol.*, 1–0. doi:10.1016/j.semcancer.2019.06.003.
- Torgerson, T. R., Colosia, A. D., Donahue, J. P., Lin, Y. Z., & Hawiger, J. (1998). Regulation of NF-kappa B, AP-1, NFAT, and STAT1 nuclear import in T lymphocytes by noninvasive delivery of peptide carrying the nuclear localization sequence of NF-kappa B p50. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*.
- Turajlic, S., Sottoriva, A., Graham, T., and Swanton, C. (2019). Resolving genetic heterogeneity in cancer. *Nat. Rev. Genet.* doi:10.1038/s41576-019-0114-6.
- Vadlakonda, L., Dash, A., Pasupuleti, M., Kumar, K. A., and Reddanna, P. (2013). The paradox of Akt-mTOR interactions. *Front. Oncol.* 3 JUN. doi:10.3389/fonc.2013.00165.
- Van den Berk, L. C. J., van der Veer, A., Willemse, M. E., Theeuwes, M. J. G. A., Luijendijk, M. W., Tong, W. H., ... den Boer, M. L. (2014). Disturbed CXCR4/CXCL12 axis in paediatric precursor B-cell acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology*. <https://doi.org/10.1111/bjh.12883>.
- Venton, G., Pérez-Alea, M., Baier, C., Fournet, G., Quash, G., Labiad, Y., ... Costello, R. T. (2016). Aldehyde dehydrogenases inhibition eradicates leukemia stem cells while sparing normal progenitors. *Blood Cancer Journal*. <https://doi.org/10.1038/bcj.2016.78>.
- Vianello, F., Villanova, F., Tisato, V., Lymperi, S., Ho, K. K., Gomes, A. R., ... Dazzi, F. (2010). Bone marrow mesenchymal stromal cells non-selectively protect chronic myeloid leukemia cells from imatinib-induced apoptosis via the CXCR4/CXCL12 axis. *Haematologica*. <https://doi.org/10.3324/haematol.2009.017178>.
- Walkley, C. R., Olsen, G. H., Dworkin, S., Fabb, S. A., Swann, J., McArthur, G. A. A., ... Purton, L. E. (2007). A Microenvironment-Induced Myeloproliferative Syndrome Caused by Retinoic Acid Receptor γ Deficiency. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.014>.
- Wang, J., Liu, X., Qiu, Y., Shi, Y., Cai, J., Wang, B., ... Xiang, A. P. (2018). Cell adhesion-mediated mitochondria transfer contributes to mesenchymal stem cell-induced chemoresistance on T cell acute lymphoblastic leukemia cells. *Journal of Hematology and Oncology*. <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0554-z>.
- Wang, W., Bochtler, T., Wuchter, P., Manta, L., He, H., Eckstein, V., ... Lutz, C. (2017). Mesenchymal stromal cells contribute to quiescence of therapy-resistant leukemic cells in acute myeloid leukemia. *European Journal of Haematology*. <https://doi.org/10.1111/ejh.12934>.
- Wang, W.M. (1998). Rescue from apoptosis in early (CD34-selected) versus late (non CD34-selected) human hematopoietic cells by very late antigen 4-and vascular cell adhesion molecule (VCAM) 1-dependent adhesion to bone marrow stromal cells. *Cell Growth Diff* 9, 105–112.
- Welch, S., Hirte, H. W., Carey, M. S., Hotte, S. J., Tsao, M. S., Brown, S., ... Oza, A. M. (2007). UCN-01 in combination with topotecan in patients with advanced recurrent ovarian cancer: A study of the Princess Margaret Hospital Phase II consortium. *Gynecologic Oncology*. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2007.02.018>.

PKC en un microambiente leucémico con células MSC: Su participación en el soporte, la supervivencia y los mecanismos que median la resistencia a la quimioterapia en células ALL-B

- Wu, S., Korte, A., Kebelmann-Betzing, C., Gessner, R., Henze, G., and Seeger, K. (2005). Interaction of bone marrow stromal cells with lymphoblasts and effects of prednisolone on cytokine expression. *Leuk. Res.* doi:10.1016/j.leukres.2004.04.018.
- Yang, G. C., Xu, Y. H., Chen, H. X., and Wang, X. J. (2015). Acute Lymphoblastic Leukemia Cells Inhibit the Differentiation of Bone Mesenchymal Stem Cells into Osteoblasts in Vitro by Activating Notch Signaling. *Stem Cells Int.* 2015. doi:10.1155/2015/162410.
- Yang, X., Yao, R., and Wang, H. (2018). Update of ALDH as a Potential Biomarker and Therapeutic Target for AML. *Biomed Res. Int.* 2018. doi:10.1155/2018/9192104.
- Yang, Y., Mallampati, S., Sun, B., Zhang, J., Kim, S. B., Lee, J. S., et al. (2013). Wnt pathway contributes to the protection by bone marrow stromal cells of acute lymphoblastic leukemia cells and is a potential therapeutic target. *Cancer Lett.* doi:10.1016/j.canlet.2012.11.056.
- Zeng, Z., Shi, Y. X., Samudio, I. J., Wang, R. Y., Ling, X., Frolova, O., ... Konopleva, M. (2009). Targeting the leukemia microenvironment by CXCR4 inhibition overcomes resistance to kinase inhibitors and chemotherapy in AML. *Blood.* <https://doi.org/10.1182/blood-2008-05-158311>.
- Zhang, J., Grindley, J. C., Yin, T., Jayasinghe, S., He, X. C., Ross, J. T., et al. (2006). PTEN maintains haematopoietic stem cells and acts in lineage choice and leukaemia prevention. *Nature.* doi:10.1038/nature04747.
- Zhang, W., Trachootham, D., Liu, J., Chen, G., Pelicano, H., Garcia-Prieto, C., et al. (2012). Stromal control of cystine metabolism promotes cancer cell survival in chronic lymphocytic leukaemia. *Nat. Cell Biol.* 14, 276–286. doi:10.1038/ncb2432.
- Zhao, M., Tao, F., Venkatraman, A., Li, Z., Smith, S. E., Unruh, J., et al. (2019). N-Cadherin-Expressing Bone and Marrow Stromal Progenitor Cells Maintain Reserve Hematopoietic Stem Cells. *Cell Rep.* 26, 652-669.e6. doi:10.1016/j.celrep.2018.12.093.
- Zhou, B. B. S., Zhang, H., Damelin, M., Geles, K. G., Grindley, J. C., and Dirks, P. B. (2009). Tumour-initiating cells: Challenges and opportunities for anticancer drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* doi:10.1038/nrd2137.
- Zimmer, S. N., Zhou, Q., Zhou, T., Cheng, Z., Abboud-Werner, S. L., Horn, D., et al. (2011). Crebbp haploinsufficiency in mice alters the bone marrow microenvironment, leading to loss of stem cells and excessive myelopoiesis. *Blood* 118, 69–79. doi:10.1182/blood-2010-09-307942.