



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATIA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E
INVESTIGACIÓN

DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

**“Papel de los Distroglicanos en la Fisiopatología de la Leucemia
Mieloide Aguda”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORADO EN CIENCIAS
EN BIOTECNOLOGIA

PRESENTA:
LEA ALONSO RANGEL

DIRECTORES DE TESIS:

D. EN C. DORIS ATENEA CERECEDO MERCADO

D. EN C. DAVID GUILLERMO PÉREZ ISHIWARA



Ciudad de México, Agosto del 2017



DIRECTORES

D. EN C. DORIS ATENEA CERECEDO MERCADO

ENMYH

D. EN C. DAVID GUILLERMO PÉREZ ISHIWARA.

ENMYH

COMITÉ TUTORIAL

D. EN C. LAURENCE ANNIE MARCHAT MARCHAU

ENMyH

D. EN C. JUAN SANTIAGO SALAS BENITO

ENMyH

D. EN C. BULMARO CISNEROS VEGA

CINVESTAV

Ciudad de México, Noviembre del 2017.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 13:00 horas del día 28 del mes de Abril del 2017 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de La ENMH para examinar la tesis titulada:
Papel de los Distroglucanos en la Fisiopatología de la Leucemia Mieloide Aguda

Presentada por el alumno:

Alonso Rangel Lea
Apellido paterno Apellido materno Nombre(s)
Con registro:

B	1	2	0	6	2	1
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Doctorado en Ciencias en Biotecnología

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dra. Doris Atenea Cerecedo Mercado

Dr. David Guillermo Pérez Ishiwara

Dr. Bulmaro Cisneros Vega

Dra. Laurence Annie Marchat Marchau

Dr. Juan Santiago Salas Benito



PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES
Dra. Mónica Ascención De Nova Ocampo
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
Y HOMEOPATIA
SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACION



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTORES DE TESIS

México, D.F. a 28 de Noviembre del 2012

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de ENMyH en su sesión Ordinaria No. 7 celebrada el día 28 del mes de Noviembre conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

Alonso Rangel Lea
Apellido paterno Apellido materno Nombre (s)
Con registro:

B	1	2	0	6	2	1
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de: Doctorado en Ciencias en Biotecnología

- 1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:
Papel de los Distroglicanos en la Fisiopatología de la Leucemia Mieloide Aguda

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:
Caracterización de los Distroglicanos en muestras de pacientes con Leucemia Mieloide Aguda para conocer su distribución y observar la disminución de la expresión de estas proteínas según antecedentes reportados en otros tipos de cáncer.

- 2.- Se designan como Directores de Tesis a los Profesores:
Dra. Doris Atenea Cerecedo Mercado, Dr. David Guillermo Pérez Ishiwara

- 3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesina será elaborado por el alumno en:
Laboratorio de Hematobiología de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía
que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

- 4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

Directores de Tesis

Dra. Doris Atenea Cerecedo Mercado

Dr. David Guillermo Pérez Ishiwara

Aspirante
Lea Alonso Rangel

SECRETARIA DE EDUCACION PUBLICA
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
Presidente del Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación
Dra. Mónica Ascención De Nova Campo
SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D.F. el día 25 del mes de Agosto del año 2017, la que suscribe Lea Alonso Rangel alumna del Programa de Doctorado en Biotecnología, con número de registro B120621, adscrita a la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, manifiesta que es la autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Doris Atenea Cerecedo Mercado y Dr. David Guillermo Pérez Ishiwara y cede los derechos del trabajo titulado Papel de los Distroglicanos en la Fisiopatología de la Leucemia Mieloide Aguda, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o directores del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones: dcereced@prodigy.net.mx o lea.aloran@gmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



Lea Alonso Rangel

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Hematobiología de la Sección de Estudios de Posgrado de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección de la Dra. en C. Doris Atenea Cerecedo Mercado y el Dr. en C. David Guillermo Pérez Ishiwara.

Durante la realización de éste proyecto, el alumno contó con la beca de Doctorado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y también con la Beca de Estímulo Institucional de Formación de Investigadores (BEIFI) del Instituto Politécnico Nacional.

RESUMEN

Estudios previos han demostrado que la alteración o la expresión reducida del Complejo de membrana de Distroglicanos (Subunidades α -Distroglicano y β -Distroglicano) están relacionados en la progresión y severidad de neoplasias de tejidos sólidos. En el presente trabajo, se determinó por microscopía confocal en la distribución subcelular de la subunidad α , β y β fosforilado (Y892) en blastos primarios de Leucemia Mieloide Aguda (LMA) (fenotipos M1, M2 y M3), así como en las líneas celulares HL-60 y Kasumi-1. Estas mismas células se procesaron para ensayos de inmunodetección en fase sólida y se caracterizó el patrón de expresión de la subunidad α , β y β fosforilado (Y892) de Distroglicano; así mismo, se determinó las diferentes especies de α -Distroglicano. La expresión del RNA mensajero de las enzimas involucradas en la glicosilación de α -Distroglicano, POMGnT1, POMT1, POMT2, LARGE, FKTN, y FKR, se evaluaron por la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (qRT-PCR).

Los resultados de éste trabajo mostraron por primera vez la distribución subcelular del Distroglicano en blastos primarios de pacientes con Leucemia Mieloide Aguda, el cual fue un patrón muy homogéneo en todas las células. Los niveles proteicos correspondientes a la parte central de dicha proteína, las glicosilaciones de α -Distroglicano, así como β -Distroglicano y su forma fosforilada redujeron su expresión. La presencia de β -Distroglicano fosforilado en el núcleo de las leucemias podría sugerir un proceso de ubiquitinación, aumentando la desregulación en los procesos de proliferación y diferenciación. Así mismo, se observó una disminución del RNA mensajero de la enzima LARGE del grupo de 6 enzimas responsables de la modificación del sitio mucina de α -Distroglicano, tanto en los blastos de LMA, como en las líneas celulares leucémicas. A través de este estudio se concluye que la integridad y el balance del Complejo de Distroglicano son necesarios para una adecuada hematopoyesis pudiendo influir en el desarrollo de Leucemia Mieloide Aguda.

ABSTRACT

Previous studies have showed a reduced expression in Dystroglycan membrane complex (α -Dystroglycan and β -Dystroglycan subunits), which is related in the progression and severity of neoplastic solid tissues. The goal of the present study was to elucidate the pattern of subcellular expression and distribution in Acute Myeloid Leukaemia (AML) primary blasts (phenotypes M1, M2 and M3), as well as in Leukaemia cell lines (HL-60 and Kasumi-1). Additionally, we evaluated the relative expression of the major enzymes controlling α -Dg glycosylation to ascertain the post-translational modifications in the Leukaemia cell phenotype. To determine the subcellular distribution of α -Dg, β -Dystroglycan and phosphorylated β -Dystroglycan (Y892), primary leukaemia blasts and leukaemia cell lines were processed by confocal microscopy, to evaluate the distribution pattern of the different Dystroglycan species, while the expression pattern was determined by Western Blot (WB) assays. We evaluated messenger RNA (mRNA) expression of enzymes involved in α -Dg glycosylation, POMGnT1, POMT1, POMT2, LARGE, FKTN and FKRFP using quantitative reverse transcription- polymerase chain reaction (qRT-PCR).

Confocal analysis demonstrated for the first time the expression pattern and the subcellular distribution of the Dystroglycan species in primary blasts of patients with Acute Myeloid Leukaemia. The images showed an homogenous pattern in all the cells, while the presence of phosphorylated β -Dystroglycan in the nucleus of leukaemia cell might be indicative of active ubiquitination, which in turn could increase deregulation in proliferation and differentiation processes. The protein expression corresponding to the central part of α -Dystroglycan, the glycosylations, as well, as β -Dystroglycan and its phosphorylated form showed a reduced expression. The analysis of the 6 responsible enzymes to glycosylate the α -Dystroglycan mucin site were quantified, our results in AML blasts as well as leukaemia cell lines expressed a decrease in LARGE. The integrity and balance of Dystroglycan complex are required for proper cellular hematopoietic function, any disruption may contribute to Leukaemia pathophysiology.

INDICE

1.- INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Células Troncales Hematopoyéticas	3
1.1.1 Principios básicos de la Hematopoyesis.....	4
1.1.2 Regulación del microambiente de la hematopoyesis normal.....	5
1.2 Leucemia	6
1.2.1 Clasificación de las Leucemias.....	7
1.2.2 Origen Clonal de la Leucemia Mieloide Aguda (LMA)	7
1.3 Leucemia Mieloide Aguda.....	8
1.4 Epidemiología	9
1.4.1 Morbilidad	11
1.4.2 Mortalidad	12
1.4.3 Terapia para Leucemia.....	13
1.5 Líneas Celulares Leucémicas.....	14
1.5.1 Línea Celular de leucemia mieloide aguda: HL-60	14
1.5.2 Línea Celular de leucemia mieloide aguda: Kasumi-1	15
1.6.1 Generalidades	16
1.6.2 Complejo de Proteínas Asociados a Distrofina (DAPC).....	17
1.6.3 Distroglicanos	18
1.6.4 Glicosilación de α -Distroglicano.....	20
1.6.5 Distroglicano y cáncer.....	27
JUSTIFICACIÓN	31
3. HIPÓTESIS	32
4.- OBJETIVOS	33
4.1 Objetivo General:.....	33

4.2 Objetivos Particulares:	33
5.- ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	34
6.- METODOLOGÍA	36
6.1 Obtención de la muestra	36
6.2.- Separación de Células CD34+ por Inmunoperlas magnéticas	36
6.3 Técnica de Sorting (Separación de Población CD34+).....	37
6.4 Western blot (WB)	37
6.5 Técnica de Inmunofluorescencia (IF).....	38
6.6 Extracción de RNA por la técnica TRIZOL.....	39
6.7 qRT-PCR	40
7.- RESULTADOS	42
7.1 Detección de las subunidades α , β y β fosforilado de Distroglucano en las muestras de pacientes con LMA, así como en las células CD34+ de individuos sanos.	42
7.2 Detección de las subunidades α , β y β fosforilado de Distroglucano en las líneas de HL-60 y Kasumi-1, así como en las células CD34+ de individuos.	45
7.3 Distribución celular de las subunidades α , β y β fosforilado de Distroglucano en pacientes con LMA-M1 comparados con células CD34+ de individuos sanos.	48
7.4 Distribución celular de la subunidad α , β y β fosforilado de Distroglucano en líneas celulares comparados con células CD34+ de individuos sanos.....	50
7.5 Niveles de expresión de RNAm del gen DAG1 en las líneas celulares HL-60 y Kasumi-1, así como las muestras pacientes con Leucemia Mieloide Aguda comparados con células CD34+ de individuos.	52
7.6.- Análisis de las glicosiltransferasas en las líneas celulares HL-60 y Kasumi-1, así como en los pacientes con LMA comparados con las células CD34+ de individuos sanos.	53
8.- DISCUSIÓN	57
9.- CONCLUSIONES	60
10.- PERSPECTIVAS.....	61
11.- REFERENCIAS.....	62

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Diferenciación de células madre hematopoyéticas y estromales (Adaptada del reporte "Stem Cells: Scientific Progress and Future directions", NIH, 2001.....	1
Figura 2.- Porcentaje de morbilidad hospitalaria por principales tumores malignos de la población de 20 años según sexo en el 2014.....	8
Figura 3.- Tasa de mortalidad por principales tumores malignos de la población menor de 20 años según sexo. 2014.....	9
Figura 4.- Organización del Complejo de Glicoproteínas asociadas a Distrofina en músculo esquelético.....	14
Figura 6.- Glicosilación de Alfa-Distroglicano.....	19
Figura 7.- Análisis de Western Blot en muestras de pacientes con LMA subtipos M1, M2 y M3.....	42
Figura 8.- Análisis de Western Blot en líneas celulares de LMA (HL-60 y Kasumi).....	44
Figura 9 A y B.- Inmunofluorescencia indirecta de Distroglicano en muestras de pacientes con LMA subtipo M1.....	45
Figura 10.- Inmunofluorescencia indirecta de Distroglicano en líneas celulares HL-60 y Kasumi-1 comparadas con células CD34 de individuos sanos.....	47
Figura 11.- Comparación en los niveles de expresión de RNAm de Distroglicano.....	48
Figura 12 Comparación en los niveles de expresión de RNAm de las Glicosiltransferasas.....	49
Figura 12 Comparación en los niveles de expresión de RNAm de las Glicosiltransferasas.....	49

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Distrofias musculares congénitas con alteraciones en la glicosilación del Distroglicano	20
Tabla 2.- Anticuerpos primarios utilizados para Western Blot e Inmunofluorescencia Indirecta.....	36
Tabla 3.- Oligonucleótidos de las Glicosiltransferasas utilizados para qRT-PCR, y se muestra la secuencia de cada uno de ellos.....	37
Tabla 4.- Lista de pacientes relacionados por edad, sexo. Clasificación de la Leucemia Mieloide según la FAB, Conteo de Leucocitos y Porcentaje de Blastos.....	40

1.- INTRODUCCIÓN

1.1 Células Troncales Hematopoyéticas

La médula ósea es el órgano responsable de la producción de células sanguíneas en mamíferos y muchos otros organismos superiores. La médula ocupa el interior del hueso y constituye entre 4% a 5% de su peso total en humanos. Aunque anatómicamente es compleja, los diversos tipos celulares que se encuentran ahí, están altamente organizados en una red de senos venosos-capilares y matriz extracelular circundante. Dentro de la médula se ha descrito la localización de diferentes elementos, como islotes eritropoyéticos y nódulos linfocíticos así como los nichos de células troncales y componentes celulares [1].

Las células troncales hematopoyéticas (HSC's, del inglés, hematopoietic stem cells) son células multipotentes responsables de la producción de las células sanguíneas, en los organismos adultos (hematopoyesis). Las HSC's tienen el potencial de diferenciarse en células sanguíneas de diferentes tipos, y de generar células hijas con potencial HSC a través de numerosas divisiones celulares. Fig.1. Debido a éstas únicas propiedades, las HSC's son usadas en medicina regenerativa para tratar desordenes sanguíneos, como leucemia, linfomas y mielomas [2].

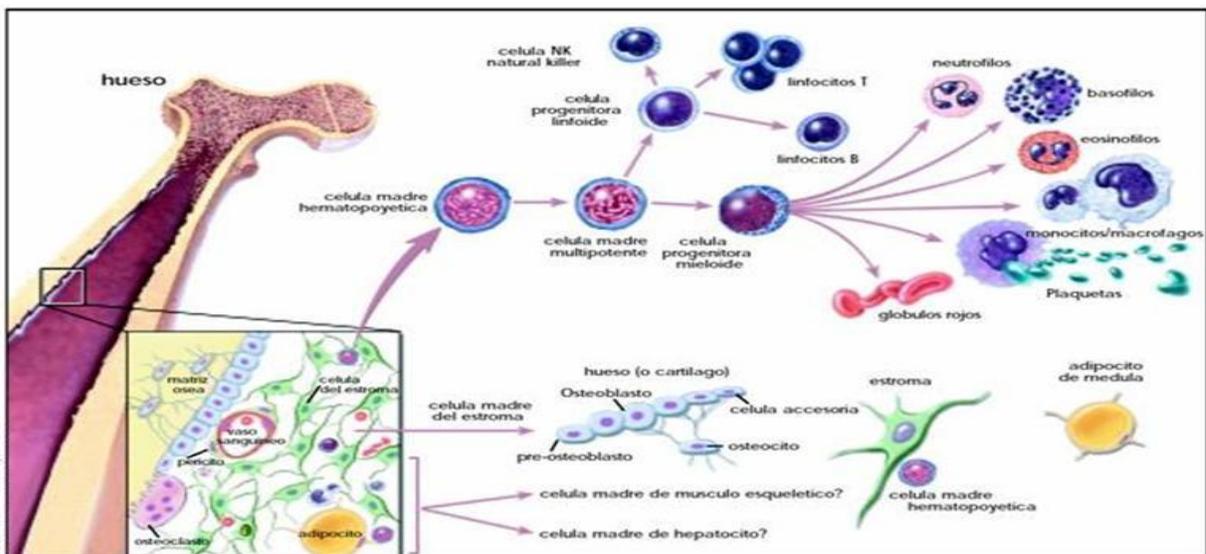


Fig. 1.- Diferenciación de células madre hematopoyéticas y estromales. (Adaptada del reporte "Stem Cells: Scientific Progress and Future directions", NIH, 2001).

En humanos adultos, las HSC's (HSC's) y su progenie, son responsables de generar $\sim 1 \times 10^9$ células sanguíneas rojas y $\sim 1 \times 10^8$ células sanguíneas blancas cada hora, incluyendo plaquetas y otros linajes sanguíneos maduros [3].

La hematopoyesis es iniciada por una población única de (HSC's), la cual reside principalmente en el hígado en la vida fetal, a partir del nacimiento y durante la vida adulta la hematopoyesis se produce fundamentalmente en la médula ósea contenida en la pelvis, el esternón, la columna vertebral y el cráneo [4].

La diferenciación de éstas células es continua y estrictamente regulada lo cual es crucial para la producción balanceada de progenitores y precursores, y el reabastecimiento de todas las células de la sangre a lo largo de la vida [5].

Las células progenitoras y hematopoyéticas son controladas por los efectos combinados de Factores de Crecimiento Hematopoyéticos (HGF's), factores de transcripción y microRNA's (miRNA's). Las células sanguíneas han sido clasificadas en dos linajes o estirpes: linfoide y mieloide. El linaje linfoide consiste de células B, células T, células *natural killer* (NK) y algunas categorías de células dendríticas (DC), los cuales constituyen el cimiento del sistema inmunitario adquirido, mientras que el linaje mieloide incluye a los granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos), monocitos, macrófagos, eritrocitos, megacariocitos, células cebadas y otras categorías de DC responsables de la nutrición, oxigenación de los tejidos, la viscosidad sanguínea, la coagulación y la función inmunitaria [5], [6].

1.1.1 Principios básicos de la Hematopoyesis

El sistema hematopoyético puede estar dividido en tres principales componentes. El primero, el más inmaduro de todos, consiste en células troncales hematopoyéticas multipotenciales que poseen una extensa capacidad para dar lugar a nuevas células troncales hematopoyéticas (auto renovación) y que genera promotores inmaduros que están programados para diferenciarse (compromiso). El segundo componente consiste de progenitores que están comprometidos a la diferenciación en un solo linaje. Las células de éste componente responden a

reguladores humorales por ejemplo: eritropoyetina y son principalmente responsables del mantenimiento de las células sanguíneas maduras. El tercer componente consiste de células maduras como eritrocitos y polimorfonucleares granulocíticos, los cuales tienen funciones especializadas y han perdido la capacidad de proliferar [7].

1.1.2 Regulación del microambiente de la hematopoyesis normal

Para comenzar a entender el papel del nicho hematopoyético en la leucogénesis, primero es importante entender el papel del microambiente en el mantenimiento de las HSC's y su desarrollo normal, y cómo estos mecanismos de apoyo difieren entre HSCs y LSCs (Células Troncales Leucémicas por sus siglas en inglés). El nicho de las HSC's es un término acuñado para comprender las estructuras del microambiente en la médula ósea, está anatómica y funcionalmente definido, y tiene compartimentos especializados dentro de la médula ósea. En dichos compartimentos ocurren señales bidireccionales críticas que aseguran la regulación en el número de HSCs normales, y el mantenimiento del acervo de HSC que se encuentra en reposo y son de largo plazo [8].

Entre las propiedades principales de las HSC's está la capacidad de elegir entre la autorenovación (siendo una célula madre después de la división celular) o la diferenciación (iniciar el camino para convertirse en una célula hematopoyética madura). Además, las HSC migran de manera regulada y están sujetas a la regulación de la apoptosis (muerte celular programada). El equilibrio entre estas actividades determina el número de células madre que están presentes en el cuerpo. De estas propiedades anteriormente mencionadas, la autorrenovación es una característica esencial de las HSC's, ésta se refiere a la capacidad para hacer copias con el mismo o similar potencial. Esta es una propiedad esencial, ya que las células más diferenciadas, como los progenitores hematopoyéticos, no pueden realizarla, a pesar de que la mayoría de los progenitores pueden incrementarse de manera significativa durante un periodo limitado de tiempo después de haberse generado. Sin embargo, para la continua producción de las numerosas células sanguíneas maduras, la presencia de las células madre es primordial. Si bien no

se ha establecido que las HSC's adultas pueden autorrenovarse indefinidamente, es evidente a partir de los experimentos realizados en transplantes, que las HSC's pueden producir suficientes células durante toda la vida en modelos murinos. [9], [10].

No obstante que aún no se han identificado las señales claves en la autorrenovación, éste proceso se ha asociado con la expresión de la telomerasa, la enzima necesaria para el mantenimiento de los telómeros [8, 11], ya que en cada ronda de división celular, se observa el acortamiento de los telómeros lo cual redundaría en el envejecimiento celular [12]. Se ha demostrado que, con el envejecimiento, el proceso de autorrenovación y diferenciación en las HSC's muestra una menor generación de progenie diferenciada o dirigida hacia un linaje en particular [13].

Las HSC's, expresan el marcador CD34+ [14] además, expresan el antígeno CD90 (Tyh-1) y carecen de la expresión de otras moléculas, tales como CD38, CD45RA y CD71. Posteriormente, conforme las HSC's se diferencian y dan lugar a la formación de las HCP's (Células hematopoyéticas Pluripotenciales, por sus siglas en inglés), adquieren la expresión de moléculas como CD38, CD45RA, CD71 y otras más, pertenecientes a linajes específicos (por ejemplo, CD4 y CD8, en linfocitos T, CD19 y CD20 en linfocitos B, CD15 y CD33 en células mieloides, CD41 y CD42 en megacariocitos (8).

1.2 Leucemia

Se define como la proliferación neoplásica de células hematopoyéticas en una estirpe celular con posterior proliferación y expansión, cuya acumulación se acompaña de una disminución del tejido hematopoyético normal en médula ósea y la posterior invasión a sangre periférica y otros tejidos. En las leucemias agudas la población celular predominante está formada por células inmaduras (blastos), y en las crónicas la celularidad presenta un estadio de maduración más avanzado [15].

1.2.1 Clasificación de las Leucemias

Las leucemias pueden ser divididas en dos tipos: crónica y aguda. En la forma crónica, las HSC's se diferencian y eventualmente maduran. Estas células no son del todo funcionales y persisten en el torrente sanguíneo mucho más tiempo que una célula normal. En la forma aguda de la enfermedad, las células hematopoyéticas continúan en el estado inmaduro. Su desarrollo/diferenciación es detenido en el nivel de células progenitoras, como resultado, las células leucémicas (blastos) se reproducen y se acumulan mucho más rápido que en una enfermedad crónica. Otro método para clasificar las leucemias depende del tipo de células que entran a una transformación maligna. Cuando los blastos surgen de progenitores granulocíticos o monocíticos, la leucemia es clasificada como mieloide o mielogena, cuando los blastos provienen de progenitores linfocíticos, la leucemia es clasificada como linfoide [16].

1.2.2 Origen Clonal de la Leucemia Mieloide Aguda (LMA)

Es bien sabido que la LMA es una enfermedad que se origina como resultado de la expansión clonal de una célula hematopoyética inmadura [15]. Según la clasificación de la French American-British (FAB) de 1976, existen 8 subtipos de LMA denominados de M0 a M7 según el tipo de células a partir de que la leucemia se desarrolla.

- 1.- LMA0 (minimamente diferenciada)
- 2.- LMA1 (mieloblástica sin maduración)
- 3.- LMA2 (mieloblástica con maduración)
- 4.- LMA3 (promielocítica)
- 5.- LMA4 (mielomonocítica)
- 6.- LMA5 (monocítica)
- 7.- LMA6 (eritroide)
- 8.- LMA7 (megacarioblástica).

1.3 Leucemia Mieloide Aguda

La LMA representa un grupo de alteraciones clonales de la célula madre hematopoyética, en los cuales hay tanto falla para la diferenciación, así como sobreproducción de éstas, lo que lleva a acumulación de células no funcionales llamadas mieloblastos [17].

Así como en muchos otros cánceres, la LMA ha sido extensamente caracterizada como un desorden celular autónomo, es decir, eventos genéticos permiten la transformación de células hematopoyéticas normales, que son encontradas dentro de la célula y son necesarias y suficientes para la generación de la leucemia, Por ejemplo, las proteínas de fusión leucemogénicas como MLL-AF9 o MLL-ENL son expresadas como consecuencia de la translocación cromosómica t(9;11)(p22;q23) observadas en blastos leucémicos [8].

Esta patología relativamente rara, se presenta en alrededor de 2,5 pacientes por 100,000 habitantes por año en Estados Unidos. La LMA afecta a personas mayores, con una edad media de diagnóstico de 65 años. Su origen es en parte desconocida, pero se han identificado diversos factores de predisposición. Estos factores son, haber estado expuesto de forma accidental a radiaciones, los supervivientes de bombas atómicas, la exposición a benceno o derivados, los fumadores de cigarrillos, algunas infecciones virales, la herencia y algunos fármacos (fenilbutazona, cloranfenicol, hidroxiurea, etopósido y agentes alquilantes) se han asociado a la leucemogénesis [18].

Se cree que hay una población de células de LMA denominadas “células madre leucémicas”, (LSC) que por sí solas tienen potencial de repoblación a largo plazo y la capacidad de propagar y mantener el fenotipo de LMA. La existencia de una célula madre de leucemia, y las contribuciones de las células madre a otros cánceres, ha sido postulada desde hace tiempo. La prueba formal de la existencia de ésta subpoblación de células, fue posible gracias a la aparición de tecnologías que permitieron el aislamiento de poblaciones de células madre y progenitoras hematopoyéticas usando la citometría de flujo, de esta manera se piensa que la leucemia tiene una organización jerárquica similar a la hematopoyesis normal en el cual existe una rara subpoblación de células con ilimitado potencial de

renovación, dando lugar al surgimiento de la progenie que carece de tal potencial [8].

En casi todos los casos, se presenta un reemplazo de médula ósea normal por blastos, los cuales son células inmaduras con un núcleo oval a redondo con un patrón de cromatina granular fina. La cantidad de citoplasma varía y puede contener gránulos. Frecuentemente se encuentran estructuras peculiares como barras, llamadas cuerpos de Auer, representando agregados de gránulos anormales que pueden ser observados y son específicos para la leucemia mieloide aguda. La sangre periférica usualmente muestra blastos similares, frecuentemente con una marcada elevación de células sanguíneas blancas. Típicamente se establece el diagnóstico cuando se observa de un 20% a 30% de blastos en la médula o en sangre [19].

Éstas células “iniciadoras de leucemia” tienen un inmunofenotipo que es más maduro que las que se ven en HSC’s, pero tienen una renovación adquirida ilimitada a través de transformaciones oncogénicas, permitiendo la activación de diferentes genes [20].

Respecto a que las LSC requieren el nicho de la médula ósea convencional o son capaces de crear y habitar nuevos nichos (como bazo o hígado), se sugiere que las LSC pueden encontrar vías para escaparse de las señales reguladoras normales o requerimientos del nicho o que ellas puedan manipular otros tipos de células para formar nuevos microambientes. Los cambios genéticos, están bien documentados en enfermedades malignas mieloides e implican mutaciones en moléculas de señalización tales como JAK2, RAS, FLT3 o KIT [8].

1.4 Epidemiología

Una de las enfermedades de mayor incidencia en la población es el cáncer. A nivel mundial los últimos datos provenientes del *Informe Mundial sobre el Cáncer 2014* de la International Agency for Research of Cancer (IARC, por sus siglas en inglés), señalan que en 2012 hubo aproximadamente 14 millones de casos nuevos y 8.2 millones de defunciones por ésta causa, así como 32.6 millones de personas sobrevivientes a la enfermedad.

En el caso de México, en 2013, el cáncer en órganos hematopoyéticos, tanto en hombres como en mujeres menores de 20 años, alcanzó la tasa más alta de morbilidad hospitalaria por tumores malignos. Las mujeres tuvieron un índice de letalidad más alto en éste tipo de cáncer: 62% contra 58.7% en hombres. En el caso de cáncer en vías urinarias, 2.5% ocurre en mujeres y 1.6% en varones. En el grupo de 5 a 9 años de edad se presente la tasa más alta en leucemias: 75 de cada 100 mil hombres de ese grupo de edad. Generalmente los casos de leucemia disminuyen con la edad, tal como lo muestra la tasa del grupo de varones de 15 a 19 años, en el que sólo 36 de cada 100 mil hombres de ese grupo de edad presentan ese tipo de cáncer. El cáncer de encéfalo y otras partes del sistema nervioso central es la segunda causa de morbilidad hospitalaria por cáncer para los varones de 0 a 4 años de edad: cinco de cada 100, 000 niños de ese grupo de edad. Para los grupos de 6 a 9 y de 10 a 14 años, el segundo lugar lo ocupa el cáncer de tejido linfático y afines; entre los hombres de 15 a 19 años, es el cáncer de células germinales (testículos) el que se posiciona como segunda causa, al egresar por dicha enfermedad 12 de cada 100 mil hombres de ese grupo de edad.

En la Cumbre Mundial de Líderes contra el Cáncer realizada en el año 2011 se analizó el coste del cáncer sobre la economía global, el cual ha sido estimado en 290 millones de dólares en 2010, de los cuales 154 billones de dólares eran costes médicos. Cada mes, 600,000 personas mueren por cánceres que podrían ser evitados dedicando más apoyo y más financiamiento a programas de prevención, detección y tratamiento. Debido a que se calcula que en las siguientes dos décadas los casos nuevos de cáncer aumenten 70% las acciones para su prevención y tratamiento han cobrado especial relevancia en los sistemas de salud, ya que al tratarse de una enfermedad crónico-degenerativa, los costos de la lucha contra ésta patología son muy altos (OMS, 2015).

A nivel mundial, la incidencia anual de cáncer en población de 0 a 14 años es de 12.45 casos por cada 100,000 personas de ese grupo de edad. Las leucemias son el cáncer de mayor frecuencia en ésta población. Aunque ésta condición puede ser potencialmente mortal por la alteración en los componentes

sanguíneos y la generación de hemorragias, en los últimos 30 años los avances tanto en su detección temprana como en su tratamiento oportuno han logrado que 90% de los casos tengan curación.

Las tasas de remisión de LMA en adultos tienen una relación inversa con la edad, con una tasa de remisión de más de 65% para los pacientes menores de 60 años. Hay datos que indican que una vez que se logra, es posible que la duración de la remisión sea más corta en los pacientes de edad más avanzada. El aumento de la morbilidad y la y mortalidad durante la inducción parece estar directamente relacionado con la edad.

En México se han hecho algunos estudios sobre la epidemiología de las LMA. Lamentablemente se ha estudiado parcialmente a la población, ya sea sólo a la población que atiende el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) o la población que atiende el Seguro Popular, reportando frecuencias de LMA que van del 13.1% al 17.2% de los casos de Leucemia infantil. Durante los años 2010 al 2014 se registraron 190 pacientes con LMA *de novo* menores de 15 años. Sólo el 40% (n=76) del total de pacientes atendidos en hospitales de la Ciudad de México, correspondió a residentes de la misma. Hubo un predominio importante de pacientes del sexo masculino (57.1%), y morfológicamente el subtipo más frecuente fue el M3 (25.3%). La media edad de los pacientes estuvo alrededor de los 7 años [21].

1.4.1 Morbilidad

En México, y tomando en cuenta los datos de morbilidad hospitalaria por tumores malignos (egresos hospitalarios) se observa que durante 2014, el cáncer en órganos hematopoyéticos es el de mayor presencia en hombres (59.2%), y mujeres (61.1%) que tienen menos de 20 años de edad Fig. 2.



Fig. 2.- Porcentaje de morbilidad hospitalaria por principales tumores malignos de la población menor de 20 años según sexo en el 2014. Nota. Se utilizó la Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud (CIE-10), códigos: C40-C41, C56, C62, C64 – C68, C70 – C72, C81 – C96. Fuente: SSA (2016). Base de Egresos hospitalarios 2014.

De acuerdo con lo anterior en 2014 se observa que tanto en hombres como en mujeres hay una tendencia a aumentar en las tasas de morbilidad por tumores malignos de los órganos hematopoyéticos, de forma que la tasa máxima se encuentra en el grupo de 5 a 9 años (79.00 en hombres y 80.58 en mujeres, por cada 100,000 habitantes para cada grupo quinquenal de edad) y a partir de los 10 años las tasas disminuyen, sin dejar de ser las más altas para cada sexo en comparación con otros tipos de cáncer.

1.4.2 Mortalidad

Desde la segunda mitad del siglo XX, con los avances en el tratamiento de la enfermedad, el pronóstico de curación para ésta población ha mejorado considerablemente, principalmente para algunos tipos de cáncer como el de órganos hematopoyéticos y en particular para la leucemia linfoblástica aguda (NCI, 2014), lo que ha incrementado los índices de supervivencia del cáncer a nivel mundial, que en México se estima en 56% de los casos diagnosticados, aunque el promedio anual de muertes por cáncer infantil en el país es de 2150 defunciones

(Centro Nacional para la Salud de la Infancia y la Adolescencia [CENSIA], 2015). Con datos de 2014 se tiene que la tasa de mortalidad por principales tumores malignos más alta en la población con menos de 20 años, es la que corresponde al tumor maligno de órganos hematopoyéticos (3 defunciones por cada 100,000 habitantes) Fig. 3.

Por cada 100 mil habitantes para cada sexo

Tumores malignos	Total	Hombres	Mujeres
Órganos hematopoyéticos	2.66	3.04	2.25
Encéfalo y otras partes del Sistema Nervioso Central	0.64	0.70	0.58
Huesos y cartilagos articulares	0.40	0.41	0.39
Sistema linfático y tejidos afines	0.36	0.46	0.26
Células germinales (testículo u ovario)	0.22	0.37	0.07
Vías urinarias	0.11	0.08	0.13

Fig. 3.- Tasa de mortalidad por principales tumores malignos de la población menor de 20 años según sexo. 2014. Nota. Se utilizó la Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud (CIE-10), códigos: C40-C41, C56, C62, C64 – C68, C70 – C72, C81 – C96. Fuente: SSA (2016). Base de Egresos hospitalarios 2014.

1.4.3 Terapia para Leucemia

En relación a las posibles estrategias terapéuticas, se sabe que el receptor de la interleucina humana (IL)-3 es un heterodímero que comprende la subunidad α y β . El receptor de la subunidad α de la IL-3 (CD123) está altamente expresado en blastos en LMA y han sido identificados como marcadores únicos para LMA derivadas de CD34+/CD38- LSCs. Una nueva inmunotoxina recombinante que consiste de una toxina de difteria truncada (DT₃₈₈) unida a la IL-3 puede matar selectivamente a progenitores de LMA de la mayoría de muestras de pacientes de progenitores de médula ósea normal. DT₃₈₈ IL-3 se dirige al receptor funcional de IL-3 y requiere la presencia de la subunidad β para su máxima eficacia. En contraste, la inmunotoxina 26292(Fv)-PE38-KDEL une a la región variable de un anticuerpo específico para la subunidad α de IL-3 una porción de exotoxina A de *Pseudomonas*. 26292(Fv)-PE38-KDEL puede inducir la muerte celular en células AML que sólo expresa la subunidad α y no la subunidad β del receptor de IL-3, potencialmente se expande la utilidad de estrategias terapéuticas [20].

Aunque una combinación de quimioterapia convencional y nuevos blancos terapéuticos pueden liberar a la sangre periférica de blastos malignos, enfermedades mínimas residuales pueden continuar dentro de la médula, resultando en reincidencia de la enfermedad [20]. La enfermedad mínima residual hace referencia a la persistencia de una enfermedad pequeña de células malignas tras tratamiento con intención curativa del cáncer, es decir, pequeñas cantidades de células malignas circulantes o en ganglios linfáticos, en pacientes con tumores sólidos [22].

Por otro lado, en el campo de la oncología, la investigación con líneas celulares ha contribuido a caracterizar algunos de los rasgos típicos del cáncer ya que constituyen una de las principales herramientas en la investigación médica y biológica. Para comprender las características de las células leucémicas, las líneas celulares humanas son útiles para el análisis molecular de oncogenes localizados en el punto de ruptura cromosómico y también para el crecimiento y diferenciación de las células leucémicas en presencia de factores de crecimiento hematopoyético.

1.5 Líneas Celulares Leucémicas

1.5.1 Línea Celular de leucemia mieloide aguda: HL-60

Las células HL-60 son una línea celular promielocítica de leucemia humana y son utilizadas principalmente para investigación en laboratorio. Esta variedad de células fue derivada de una mujer de 36 años con leucemia promielocítica aguda.

La línea HL-60 son una línea celular carece de marcadores específicos para linfocitos pero expresan marcadores de superficie para los fragmentos Fc de inmunoglobulinas y proteínas del sistema de complemento. También muestran actividad fagocítica, responden a estímulos quimiotácticos y su precursor predominante son los neutrófilos promielocíticos.

Proliferan continuamente en cultivos por suspensión en medios nutritivos suplementados con suero vacuno fetal, L-glutamina, ácido 4- (2-hidroetil)-1

piperazin etanesulfónico (HEPES) y antibióticos durante un tiempo aproximado de 36-48 horas.

La proliferación de las células HL-60 ocurre con receptores de transferrina e insulina que se expresan en la superficie celular. El requisito para la insulina y la transferrina es absoluto pues la proliferación de las HL-60 cesa inmediatamente si cualquier de estos compuestos se quita de los medios de cultivo sin suero. Con esta línea se puede generar una inducción de la diferenciación espontánea en su maduración a granulocitos por compuestos como el dimetil sulfóxido (DMSO) o ácido retinoico. Otros compuestos como la dihidroxivitamina 1.25 D3, 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) y GM-CSF pueden inducir la diferenciación de células HL-60 a fenotipos de monocitos, macrófagos y eosinófilos.

La variedad de células cultivadas HL-60 proporciona una fuente continua de células humanas para estudiar los acontecimientos moleculares de la diferenciación mieloide y los efectos de elementos fisiológicos, farmacológicos y virológicos en este proceso. El modelo de la célula HL-60 ha sido utilizado para estudiar el efecto de la topoisomerasa del ADN (topo) II α y II β en la diferenciación y apoptosis de células y ha sido especialmente útil en estudios del dielectroforesis, los cuales requieren un ambiente acuoso con células suspendidas y redondas [23].

1.5.2 Línea Celular de leucemia mieloide aguda: Kasumi-1

La línea celular Kasumi-1 es un modelo intensamente estudiado en leucemia mieloide aguda con translocación t (8;21), que representa uno de los dos subtipos principales. Desde su establecimiento en 1991, la línea celular Kasumi, ha proporcionado la herramienta para estudiar los hallazgos moleculares, morfológicos e inmunofenotípicos de AML con t (8;21) y las consecuencias funcionales del oncogén de fusión AML1-ETO sobre la diferenciación mieloide [24]. Los pacientes con translocación 8;21 tienen una morfología celular única caracterizada por maduración (Franco-americano-británico, FAB-M2) y características clínicas. Las células muestran una variación en tamaño. Contiene gránulos en aproximadamente un 40% de las células, pero no se observan

bastones de Auer, los cuales están presentes en precursores de granulocitos. Algunas células tienen vacuolas en el citoplasma, el núcleo frecuentemente se observa lobulado y tiene de 1 a 5 nucléolos por célula [25].

1.6 Distroglicano: Generalidades, importancia en el cáncer y enfoque hacia la LMA.

1.6.1 Generalidades

Las células del organismo crecen y realizan su función al mismo tiempo que están asociadas fuertemente a diversos componentes de tejido conectivo, esta variedad de componentes extracelulares forma la matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés). Estudios en años recientes han aportado cada vez más conocimientos en cuanto a la forma en que la célula responde a señales del medio externo, la cual va más allá de la habilidad que tiene la célula para censar de forma química ligandos de la ECM, incluyendo señales físicas que son generadas o actúan entre la célula y la matriz circundante [26]. Además la célula puede reaccionar de manera intracelular o extracelular a una fuerza aplicada, puede censar la topología subyacente de la ECM, y reconocer si está suave o rígida [27]. De tal forma, que la célula es entonces una unidad que tiene la extraordinaria capacidad de responder a ésta amplia gama de señales físicas, locales (p/e. Fenómenos de adhesión) o globales (activando vías de señalización), que regulan muchos procesos celulares, como, el crecimiento, la diferenciación, la muerte celular programada, etc. Esto muestra la enorme capacidad que tiene la célula para responder a múltiples variaciones de la superficie, de acuerdo a la ECM específica sobre la que se encuentra, de tal modo que mediante distintas proteínas membranales, la célula puede reorganizar su citoesqueleto, reconocer sitios de adhesión y poner en marcha algunos de los procesos que involucran vías de señalización complejas, es por ello que la maquinaria que permite a la célula censar el medio externo o su microambiente, integra una compleja información dentro de una señal coherente del medio externo

Al igual que la ECM fuera de la célula, el citoesqueleto dentro de la misma, es uno de los temas más estudiados por los investigadores en el campo de la

biología celular, por los resultados de los numerosos estudios se sabe mucho de las familias de proteínas que conforman el citoesqueleto; así como su organización en subunidades en sus estructuras fibrosas respectivas; los “motores” moleculares que mueven éstos filamentos y generan las fuerzas necesarias para las actividades motrices que controlan la organización espacial [28].

La distrofina es una proteína muy larga del citoesqueleto que se une a la actina, ésta unión es esencial para la organización de la membrana celular la cual involucra al complejo de proteínas asociadas a distrofina (DAPC por sus siglas en inglés) [29, 30].

1.6.2 Complejo de Proteínas Asociados a Distrofina (DAPC)

El complejo de proteínas asociados a Distrofina descrito en músculo, ha sido extensivamente caracterizado en sistema nervioso central el cual une al citoesqueleto de actina con la matriz extracelular [31]. En músculo, el DAPC (Complejo de Proteínas Asociadas a Distrofina), puede ser subdividido en tres distintos sub-complejos: (i) el sub-complejo distroglicano, (ii) el sub-complejo sarcoglicano y sarcospan, y (iii) el sub-complejo distrobrevina y sintrofina [32]. Cada uno de estos sub-complejos se piensa que proveen una unión entre la matriz extracelular y el citoesqueleto de actina y de ese modo provee un soporte mecánico a la membrana muscular [33]. La presencia de DAPC ha sido descrito en diferentes tejidos, participando en adhesión celular, transducción de señales y estabilidad de membrana [34] Fig. 4.

El DAPC actúa como un “amortiguador” mecánico y también tiene un papel en la señalización celular.

Las interacciones con la membrana basal son mediadas por un conjunto variado de receptores que incluyen las integrinas $\beta 1$ y $\beta 4$, receptores del dominio de la discoidina, sindecanos, glicolípidos sulfatados, BCAM/Lutheran y Distroglicanos (24).

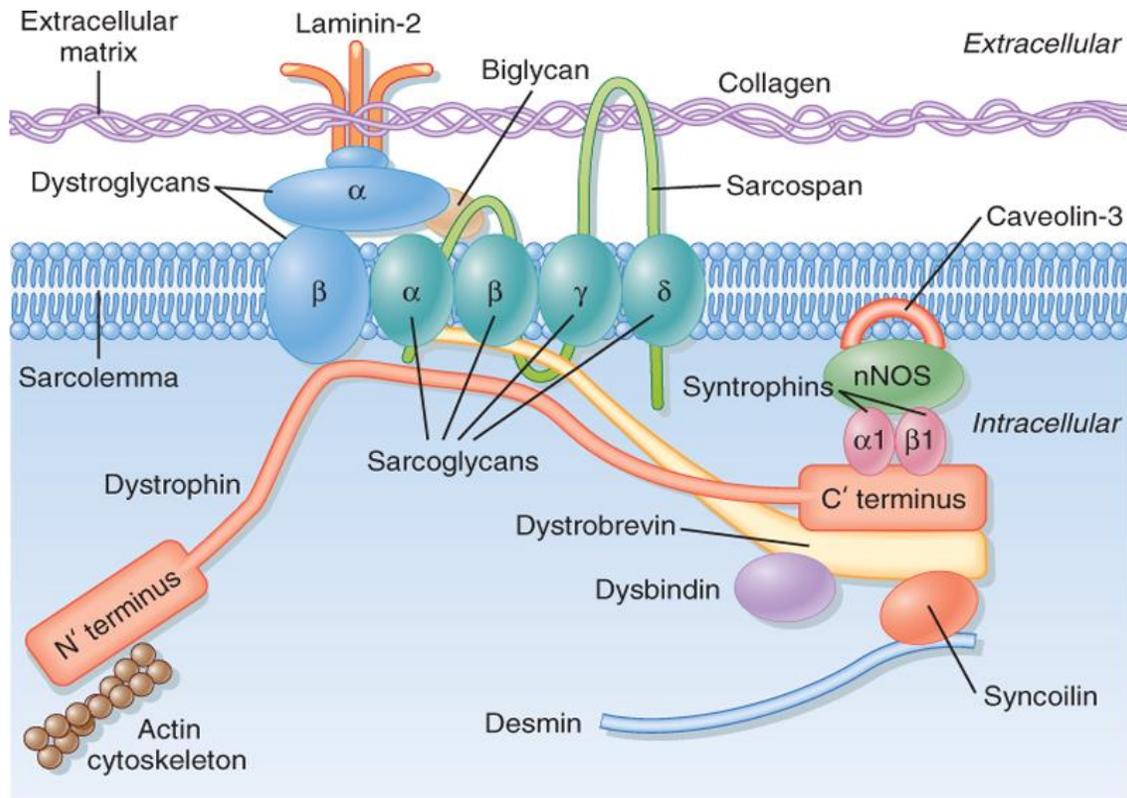


Figura 4.- Organización del Complejo de Glicoproteínas asociadas a Distrofina en músculo esquelético. El Complejo de Glicoproteínas asociadas a Distrofina provee una unión estructural entre el citoesqueleto de las células musculares y la matriz extracelular el cual estabiliza el sarcolema y prevenir el daño inducido por contracción [35]. (Tomada de Koeppen and Stanton, 2008)[36]

1.6.3 Distroglicanos

El Distroglicano es una proteína de membrana celular que juega una función clave en la integridad celular, uniendo el citoesqueleto a la matriz extracelular [16] y está involucrada en una variedad de procesos fisiológicos, incluyendo mantenimiento e integridad de la membrana de músculo esquelético y la estructura y función del sistema nervioso central [37]. Se aisló originalmente de músculo esquelético como un componente de la membrana del complejo de

proteínas asociado a Distrofina (DAPC). También se expresa en muchos otros tipos de células y juega un papel importante fuera del músculo esquelético. Ha estado implicado en el desarrollo temprano embrionario de ratón, en la estructura y función del sistema nervioso central, en la mielinización, la arquitectura nodal de los nervios periféricos, en la morfogénesis epitelial, en la adhesión celular, en la sinaptogénesis y en la señalización [38].

El Distroglicano tiene un papel esencial en el músculo donde participan en un rango importante de funciones incluyendo el ensamble de la membrana basal, la polaridad celular, la organización del citoesqueleto de actina y la transducción de señales extracelulares [39].

En la estructura del Distroglicano, ambas subunidades se organizan en subdominios, α -Distroglicano está constituida por dos dominios (N y C-terminal) separados por una región alargada similar a la mucina, rica en prolina, serinas y treoninas que además está altamente O-glicosilada; por otro lado el β -Distroglicano se compone de un dominio extracelular N-terminal, una región transmembranal y un dominio citoplasmático C-terminal rico en prolina; en la figura se muestra la estructura del Distroglicano, así como la masa molecular de cada dominio en la molécula [38] Fig. 3.

Los genes de Distroglicanos codifican para una pre-proteína que se corta en dos péptidos: el componente C-terminal, conocido como β -Distroglicano, el cual está en la membrana celular, mientras que el componente N-terminal, α -Distroglicano, está presente en la periferia extracelular pero permanece asociado con β -Distroglicano a través de uniones no covalentes. β -Distroglicano está unido a actina, distrofina, utrofina y Grb2 a través de su dominio intracelular C-terminal. α -Distroglicano, por otro lado, está unido a proteínas ECM que contienen dominios LG (dominios de laminina globulares) incluyendo agrina, y perlecan, así como la proteína transmembranal neurexina. α -Distroglicano, es extensivamente decorado por tres diferentes tipos de modificaciones de glicanos: mucina tipo O-glicosilación, O-manosilación y N-glicosilación. El estado de α -Distroglicano glicosilado se ha mostrado por ser crítico para la habilidad de la proteína a unirse al dominio LG que contiene proteínas de la ECM [40] Fig. 5.

α -Distroglicano directamente se conecta a laminina por la vía dependiente de calcio uniendo la membrana basal de las células, proveyendo estabilidad mecánica a diferentes tejidos.

De la secuencia de aminoácidos se deduce la masa molecular de α -Distroglicano es de aproximadamente 74 kDa pero la proteína es altamente O-glicosilada. Hay dos secuencias consenso para la N-glicosilación, la primera en la región N terminal y la otra en la C terminal. La glicosilación es crucial para la función del Distroglicano y previene la fragmentación de la proteína [41] .

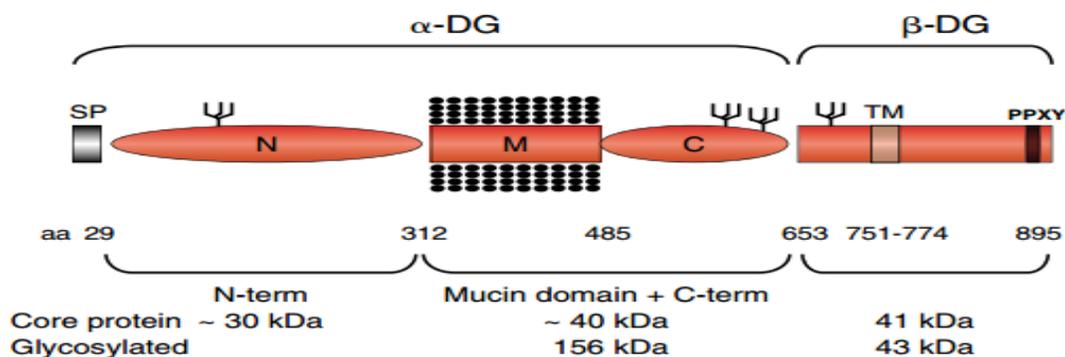


Figura 5.- Organización de los dominios en el Distroglicano. En el Distroglicano maduro (α -Dg), el dominio N-terminal es escindido por una enzima con actividad como convertasa entre Arg312 y Gln313. Los círculos negros indican las cadenas de azúcar unidas a O-glicano. Las pequeñas ramificaciones indican cadenas de azúcar unidas al dominio N. SP, péptido señal; TM, dominio transmembranal, PPXY, sitio de unión a distrofina. Las masas moleculares en la parte inferior se refiere a las masas de la proteína en ausencia y presencia de glicosilación post-traducciona [38]. (Tomada de Barresi R. 2006). [38]

1.6.4 Glicosilación de α -Distroglicano

Diversas modificaciones post-traduccionales influyen en la estructura y función de muchas proteínas. La glicosilación mediada por glicosiltransferasas es una forma de modificación postraducciona que puede modular la estructura y la función de las proteínas. Las formas principales en los mamíferos son la N- y O-glicosilación, y se distinguen por la forma y en que el resto de oligosacáridos se une al aminoácido [37]. Las mutaciones en seis conocidos o putativos genes de glicosiltransferasas POMT1, POMT2, POMGnT1, Fukutina, FKRK y LARGE han

sido identificadas en pacientes con distrofia muscular congénita. Estos trastornos abarcan un espectro de anomalías que afectan al cerebro, los ojos y el músculo esquelético, y muestran un gradiente dramático de los efectos fenotípicos que va desde las más devastadora a menos grave en la enfermedad muscular-ocular-cerebral y Fukuyama CMD. En estas enfermedades, la habilidad de α -DG para unirse a laminina se reduce notablemente, lo que se sugiere que estas glicosiltransferasas participan en la modificación post-traducciona que permite a α -Distroglicano para unirse a laminina [42].

Dentro de estos mismos genes, LARGE tiene un papel importante ya que codifica una glicosiltransferasa putativa y bifuncional. El papel que tiene LARGE en la glicosilación de los distroglicanos fue demostrado por primera vez por la identificación de una mutación con pérdida de función en el gen de la miodistrofia (MYD) en ratón mutante, siendo de aquel estudio donde adquirió singular relevancia. El nombre LARGE deriva del hecho de que este gen, a 650 kb, es el más grande en el cromosoma humano 22. De hecho, es uno de los genes más grandes en el genoma humano, a pesar de que la región de codificación cubre sólo 2kb y está contenida dentro de tan sólo 14 exones. Tal vez, en parte, como consecuencia del tamaño del gen, sólo unas pocas mutaciones han sido reportadas en LARGE en pacientes con distroglicanopatía humana haciendo un poco difícil una conclusión en la relación genotipo/fenotipo [43].

Las distrofias musculares son genéticamente y clínicamente diversas. Aunque se ha logrado un gran progreso en la identificación de los genes responsables de diversas distrofias musculares, aun no se tiene una comprensión la enfermedad. Una razón de esta falta de comprensión es que las alteraciones genéticas suelen ocasionar cambios secundarios desencadenando múltiples vías patogénicas [44].

La vía enzimática para la glicosilación de los Distroglicanos y la función específica de las cadenas de carbohidratos con la unión de ligandos, permanece aún sin dilucidar. La alteración de la síntesis del tetrasacárido O-manosil permite la hipoglicosilación de α -Distroglicano y anula la actividad de unión al ligando. Se han obtenido nuevos conocimientos sobre el papel de éste oligosacárido a partir

de análisis genéticos y bioquímicos de individuos que tienen defectos primarios en glicosiltransferasas conocidas o putativas. Los defectos en las vías de glicosilación causan numerosas enfermedades humanas, como los trastornos congénitos que son un grupo de síndromes multisistémicos que particularmente afectan el sistema nervioso central [38].

Los defectos en las glicosiltransferasas implicadas en el procesamiento postraduccional del distroglicano afectan a las vías de glicosilación de O-glicano. Esto tiene efectos devastadores en la integridad de las fibras musculares y migración neuronal. Los desórdenes humanos como enfermedad músculo-ojo-cerebro (MOC), Síndrome de Walker-Walburg (SWW), Distrofia muscular congénita de Fukuyama (DMCF), distrofia muscular congénita 1C y 1D (DMC1C y DMC1D) son causadas por mutaciones en proteínas que puedan estar glicosiladas [38].

Dado que α -Distroglicano está altamente (y heterogéneamente) glicosilada combinada con la baja abundancia de la proteína ha impedido el análisis bioquímico de los glicanos unidos a la proteína. Aunque tiene una masa predicha de 72 kDa, α -Distroglicano migra sobre los geles PAGE como una banda heterogénea de masa mucho mayor debido a la extensa glicosilación [43]. Existen diferencias específicas entre tejidos, tanto la extensión, como la naturaleza de esta glicosilación [35] resultando en una masa aparente de la proteína que varía de 120 kDa en el cerebro y nervio periférico a más de 150 kDa en músculo esquelético y cardíaco. La mayoría de los glicanos están unidos a O-manosil y unidos a una región central de la proteína (dominio similar a mucina) que es rica en residuos serina y treonina [43].

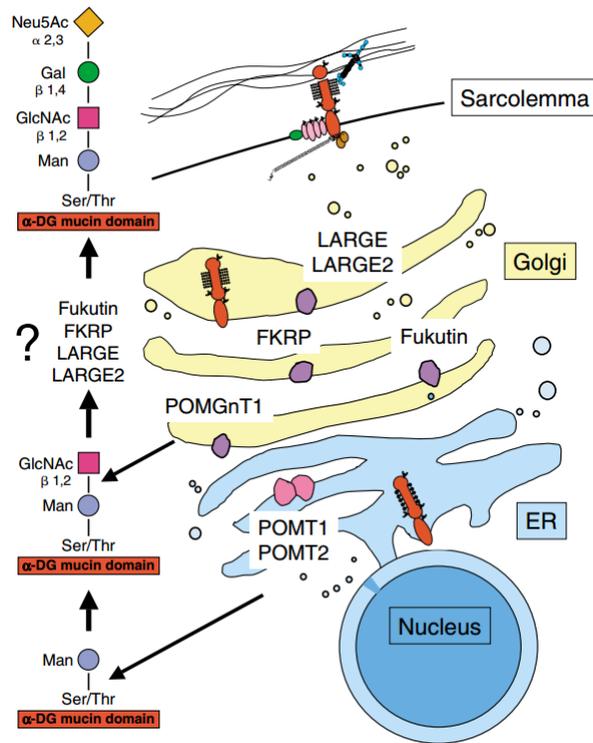


Figura 6.- Glicosilación de α -Distroglicano. Localización de glicosiltransferasas involucradas en la vía de la O-glicosilación en el Distroglicano dentro de los organelos celulares [38]. (Tomada de Barresi, R, 2006.

La evidencia bioquímica de que la glicosilación es importante para medir las interacciones del Distroglicano con la matriz extracelular, ha sido confirmada por la reciente identificación de las formas de distrofia muscular congénita y la glicosilación aberrante del Distroglicano. Tabla 1.

Tabla 1.- Distrofias musculares congénitas con alteraciones en la glicosilación del Distroglicano. (Tomada de Martín PT, 2003)

Enfermedad	Defecto genético	Referencia
FCMD	Fukutín	Kobayashi et al ., 1998
MEB	POMGnT1	Yoshida et al ., 2001
WWS	POMT1	Beltran-Valero de Bernabe et al ., 2002
MDC1C	FKRP	Brockington et al ., 2001a
LGMD2I	FKRP	Brockington et al ., 2001b
myd	LARGE	Grewal et al ., 2001

Aunque la evidencia de la glicosilación alterada en el Distroglicano depende completamente de la unión de anticuerpos, el hecho de que éstos trastornos puedan surgir de mutaciones en las enzimas implicadas en la síntesis de los glicanos unidos a O en un Distroglicano sugiere fuertemente que se trata de trastornos congénitos en la glicosilación [45].

En un estudio se demostró que pacientes con Distroglicanopatía consistentemente tenían bajos niveles de glicanos comparados con individuos sanos y que los fibroblastos de pacientes pueden ser comparados con los de músculo esquelético habiendo una diferencia en la glicosilación [46] Fig. 6.

La característica común de éstos fenotipos patológicos diversos es el α -Distroglicano defectuoso de la glicosilación del O-manosil, que deteriora las múltiples interacciones entre α -Distroglicano y las otras proteínas extracelulares, con las que el Distroglicano interactúa, propiciando a la desestabilización de la relación entre el citoesqueleto y la matriz extracelular, así mismo con base en estas observaciones y múltiples estudios realizados en Distroglicanopatías, se ha

logrado encontrar que no forzosamente los 6 genes que codifican para glicosiltransferasa propias en la formación del Distroglicanos son los que propician al desarrollo de la enfermedad, sino que otras enzimas que intervienen en el proceso de glicosilación están afectadas, e intervienen drásticamente para llevar a cabo la alteración en dicha molécula [38].

La función de adhesión del Distroglicano no ha sido bien dilucidada y estudiada por completo, y está relacionada con la cascada de interacciones río abajo de la adhesión del Distroglicano [47]. El enlace de la matriz extracelular a la célula requiere proteínas de adhesión transmembranales que actúan como receptores y unen a la matriz extracelular al citoesqueleto de actina. Algunos proteoglicanos transmembranales funcionan como coreceptores de los componentes de la matriz, los principales receptores en las células animales para unir la mayoría de las proteínas de la matriz extracelular, incluidos los colágenos, la fibronectina y las lamininas, son las integrinas. Las integrinas constituyen una gran familia de receptores transmembranales de adhesión célula – matriz [48]. Es importante mencionar la intercomunicación entre adhesión y señalización de las moléculas de adhesión [49]. Parte de una característica compartida que existe entre el Distroglicano y la integrina es que el Distroglicano y muchos heterodímeros de integrinas interactúan con el citoesqueleto de actina [39]. Otro aspecto importante que tienen en común ambos, son las vías de señalización que han sido reportadas y son mediadas por distintos tipos de receptores, así como distintas proteínas como Src, ERK, cinasa P1 y Akt. Por ejemplo, la proteína tirosina cinasa como Src de la familia de las cinasas es una proteína central en la regulación de ambos, Distroglicano e integrinas [46], [47].

La fosforilación es un mecanismo post-traducciona que es bien conocido que modula la estabilidad proteica y/o su función. Estudios *In vitro* e *In vivo* han mostrado que la distrofina puede ser fosforilada, particularmente dentro de la región CT. Además otros miembros del DAPC incluyendo las sintrofinas, las α -Distrobrevinas y β -Distroglicanos se fosforilan en éste complejo [50].

Además, varias líneas sugieren que α -Distroglicano está anclado a la membrana y es parte de un complejo de transducción de señales que interactúa

con el dominio SH3 de Grb2. Grb2 es una proteína adaptadora que ayuda a iniciar la cascada de transducción de la cinasa Ras-MAP y está implicada en el control de la organización del citoesqueleto. Interesantemente las interacciones entre β -Distroglicano-Distrofina y β -Distroglicano-Utrofina ocurren a través del dominio WW de Distrofina o Utrofina. El dominio WW es una región pequeña de 38-40 aminoácidos semiconservados que están ampliamente distribuidos entre varias proteínas estructurales y de señalización. El dominio WW está ubicado después de dos triptófanos altamente conservados espaciados entre 20 – 22 aminoácidos. Varios dominios WW han sido implicados en la interacción proteína-proteína por la unión a secuencias peptídicas que contienen motivos ricos en prolina como PPxY [51].

Por lo anterior se ha calificado al Distroglicano como una molécula dinámica de señalización. Estructuralmente el Distroglicano tiene un motivo citoplasmático rico en prolinas, altamente conservado, justo en la cola citoplasmática del β -Distroglicano y que provee un sitio potencial de interacción con los dominios WW (por triptófanos conservados) de la distrofina, así también como con los dominios SH3 de muchas proteínas. Recientemente se ha demostrado que la cola citoplasmática del β -Distroglicano se une a proteínas involucradas en la traducción de señales y organización del citoesqueleto, como los dominios SH3 a la proteína Grb2, una proteína adaptadora que ayuda a iniciar la cascada de traducción de señales de la cinasa Ras-MAP, involucrada en el control de la organización del citoesqueleto. Muchas de las conclusiones en cuanto al papel en la señalización celular se debe a las observaciones donde el β -Distroglicano sufre una fosforilación en la tirosina del motivo PPxY inducida por la cinasa c-Src [51]. La fosforilación del β -Distroglicano depende estrictamente de la presencia del residuo conservado de tirosina 892 en el motivo PPxY que además se mencionó que sirve como ligando para el dominio WW de la Distrofina. De manera interesante la fosforilación de la tirosina del β -Distroglicano bloquea la interacción con el dominio WW de la distrofina y utrofina. Así mismo, actúa como un regulador; un switch binario que inhibe la unión del dominio WW y promueve el reclutamiento de proteínas que contengan el dominio SH2 como c-Src, Fyn, Csk, Nck y Shc, sin

embargo, se ignora como que se induce la fosforilación, así como la traducción de señales completa y el efecto que este posee en la célula [47].

1.6.5 Distroglicano y cáncer

El interés por el Distroglicano se ha limitado por mucho tiempo a su papel en las enfermedades musculares. Sin embargo, dada su amplia distribución y su importante papel en la interacción célula-ECM, se sugiere el Distroglicano desempeñe también un papel crucial en la función de las células epiteliales. De hecho ratones knock-out para Distroglicano, sufren muerte prematura en una etapa de embriogénesis temprana, antes que la miogénesis haya comenzado, principalmente por su incapacidad de formar y desarrollar la membrana de Reichert, lo que sugiere defectos en la formación temprana de la membrana basal. Por otra parte, varias pruebas sugieren que la función del Distroglicano es esencial para un correcto desarrollo epitelial *in vivo* y para morfogénesis *in vitro*, apoyando así su importancia en la interacción de las células epiteliales con la MEC y para el ensamble de la membrana basal para un correcto desarrollo epitelial *in vivo* y para morfogénesis *in vitro*, apoyando así su importancia en la interacción de las células epiteliales con la MEC y para el ensamble de la membrana basal [52].

Las interacciones celulares con la MEC son un factor importante en el desarrollo y la progresión de muchos tipos de cáncer, cuando ocurren defectos en la organización de la MEC, alteraciones de la membrana basal se da como consecuencia la separación de los compartimentos estromal y epitelial, considerándose un sello en la transformación maligna. Como se mencionó anteriormente, el Distroglicano se expresa entre la membrana basal y la membrana celular, formando un enlace continuo desde la MEC al citoesqueleto de actina, proporcionando integridad estructural y quizá transducción de señales de una manera similar a las integrinas. Por lo tanto, la pérdida del Distroglicano podría perturbar la interacción entre las células y la matriz circundante, contribuyendo a la desregulación de la capacidad celular para interactuar con la membrana basal y/o con las células circundantes frecuentemente observadas en células tumorales.

En la progresión del cáncer se observa con frecuencia una dismorfia de la organización típica de las capas de tejido que culmina en la ruptura de las membranas basales circundantes epiteliales o endoteliales y una degradación completa o parcial de algunas proteínas de la matriz extracelular de acuerdo a lo observado [52] [53].

Las líneas de células malignas frecuentemente sobre expresan proteasas, especialmente metaloproteasas asociadas a membrana (MMPs) que son responsables de la degradación de la matriz extracelular. La región extracelular de β -Distroglicano se ve afectada por un evento proteolítico que resulta en la producción de un fragmento de ≈ 30 kDa en diferentes tejidos y cultivos celulares. Este fragmento de 30 kDa es probable que se originara por la actividad de las proteasas MMP2 y/o MMP9 [43]. Un hecho importante es que después de éste evento proteolítico, el β -Distroglicano pierde su sitio de interacción con la subunidad α -Distroglicano, lo que resulta en la pérdida de la relación entre la membrana celular y las proteínas de unión a la α -Distroglicano en la matriz extracelular, por lo que eventualmente se desencadena la generación de efectos graves para la viabilidad celular [53].

Existe la hipótesis de que un proceso aberrante del Distroglicano podría desempeñar un papel en el desarrollo de cánceres epiteliales mediante la alteración de las interacciones entre las células y la matriz circundante. De hecho, Henry, et. al. 2001, reportaron una reducción en los niveles de expresión del Dg en cáncer de próstata que fue más evidente en la enfermedad de alto grado [52].

A la fecha existen pocos trabajos que se enfocan al estudio de estos proteoglicanos en células de linaje hematopoyético, sin embargo nuestro grupo de estudio desarrolló un trabajo por Teniente De Alba C. y colaboradores en el 2011. Este estudio está dirigido hacia las células madre y células progenitoras hematopoyéticas de cordón umbilical. En este estudio, se caracterizaron los patrones de expresión de este complejo mediante distintas técnicas, en células CD34+ recién aisladas de sangre del cordón umbilical. Las conclusiones generadas fueron que la distribución subcelular del DAPC en estructuras basadas en actina, se encuentran en células CD34+, este complejo se sugiere una

participación dinámica en la adhesión y la migración celular. Además, involucra procesos claves en el ciclo de la vida de la célula troncal, dicho trabajo nos proporcionando un punto de partida hacia el estudio de células de linaje leucémico, y como es que los Distroglicanos están caracterizados en estas células.

Por otro lado Martínez-Zarate et, al. 2014, [54] caracterizó la distribución celular y el patrón de expresión de la molécula de Distroglicano en una línea celular de Leucemia Mieloide Aguda de tipo Promieolocítica (HL-60), que además fue diferenciada a linaje de Neutrófilo, observando y reportando la distribución de la subunidad α - y β - Distroglicano en membrana citoplasmática, de igual manera encontró que el patrón de distribución celular de la molécula de β -Distroglicano, así como su porción fosforilada en el núcleo de las células HL-60. Por otro lado también se realizaron ensayos de funcionalidad para entender el papel que juega el Distroglicano en éste modelo de células sanguíneas y observó que, al disminuir el Distroglicano mediante un interferente en células diferenciadas a linaje parecido a neutrófilo, existía también la disminución conjunta del marcador de superficie CD11b (marcador de linaje de neutrófilo) y de la cantidad de gránulos azurófilos; de manera sobresaliente se reportó una disminución en la división celular. Con base en lo anterior se concluyó la relevante función que el Distroglicano realiza en las células de linaje parecido al Neutrófilo y como su silenciamiento conlleva a la pérdida de muchas funciones. Gracias a estos estudios es que se logra comprender la biología molecular y celular del Distroglicano, así como la expresión en los procesos de diferenciación de células sanguíneas.

Dentro del reporte de Escárcega-Tame [55], se pudo comprobar de manera certera la disminución de la molécula de Distroglicano durante el proceso de diferenciación a macrófagos. La pérdida del Distroglicano en células parecidas a macrófago conlleva a la pérdida de la función fagocítica y migratoria, mismas que son cruciales en el linaje monocito macrófago; participando en la pérdida de adhesión y posterior migración de células sanguíneas maduras de médula ósea, para que estas colonicen o lleguen a las zonas específicas para las cuales fueron destinadas. También se determinó la crucial función que juega el Distroglicano en

los procesos de funcionalidad de células de linaje parecido a macrófago como es el caso de la migración y la fagocitosis [52].

JUSTIFICACIÓN

La disminución de los Distroglicanos se ha asociado con la presencia y gravedad del cáncer en tumores sólidos, por lo tanto, se pretende investigar si los niveles y patrones de expresión de los Distroglicanos pueden explicar los fallos en la adhesión, proliferación y diferenciación, características de las células leucémicas.

Los resultados obtenidos, podrán dilucidar la importancia de esta proteína en la Leucemia y en futuro poder relacionarla directamente con la progresión de la enfermedad.

3. HIPÓTESIS

La expresión de los Distroglicanos en células madre progenitoras hematopoyéticas procedentes de pacientes con leucemia mieloide aguda está disminuida.

4.- OBJETIVOS

4.1 Objetivo General:

Conocer el papel de los Distroglicanos en la fisiopatología de la Leucemia Mieloide Aguda.

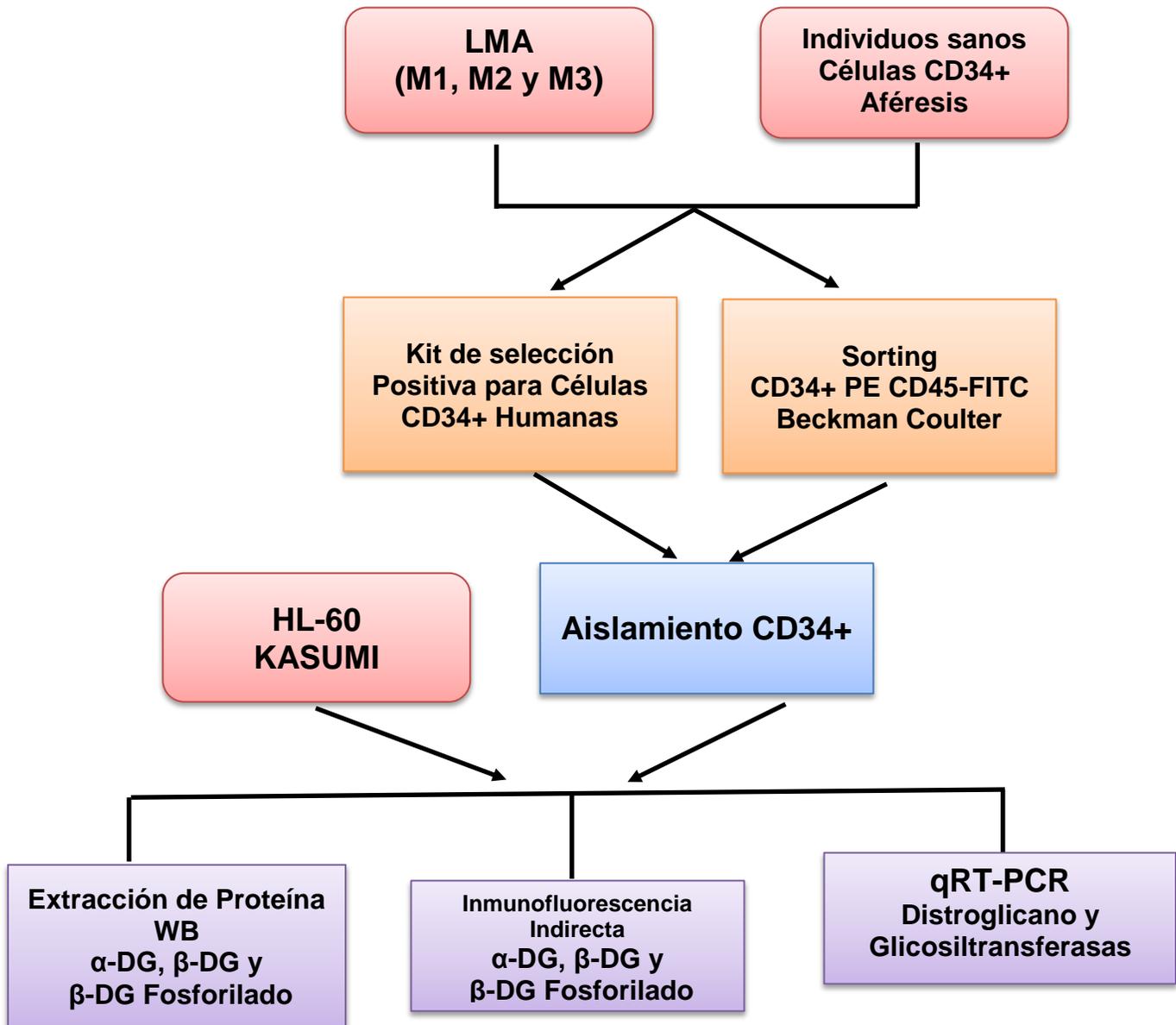
4.2 Objetivos Particulares:

1.- Caracterizar la expresión de los Distroglicanos en células troncales de pacientes con LMA (subtipos M1, M2 y M3) y en dos líneas celulares de LMA (HL-60 y Kasumi-1) comparándolas con las células troncales de individuos sanos.

2.- Caracterizar la distribución de los Distroglicanos en las líneas celulares de LMA (HL-60 y Kasumi-1) y en las células troncales de individuos sanos.

3.- Caracterizar la expresión del mensajero de las glicosiltransferas y el Distroglicano en células troncales de pacientes con LMA (subtipos M1, M2 y M3) y en dos líneas celulares de LMA (HL-60 y Kasumi-1) comparándolas con las células troncales de individuos sanos.

5.- ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



La muestra de sangre periférica de pacientes diagnosticados con LMA (41 pacientes) subtipos M1, M2 y M3, obtenidas del Hospital Juárez de México, y las muestras de individuos sanos sometidos a aféresis, fueron donadas por el Departamento de Cordón Umbilical del Hospital General La Raza. Ambas muestras se sometieron a la separación de células CD34+ por medio de un Kit de Selección Positiva para Células CD34+ Humanas, o por la técnica de Sorting, en

un equipo Beckman Coulter, marcando las células por medio de PE (Ficoeritrina) para CD34+ y FITC para CD45-. Por otra parte, se utilizaron las líneas celulares HL-60 (línea celular de LMA, promielocítica subtipo M3), y Kasumi-1 (línea celular de LMA, promielocítica subtipo M2). Las líneas celulares así como a las muestras humanas se les realizaron diferentes ensayos, para determinar la expresión de la proteína, se realizó el análisis de WB, para determinar la distribución celular, se realizó el análisis por microscopía confocal y por último para determinar la expresión del mRNA del Distroglicano y de las enzimas Glicosiltransferasas, se realizó el análisis de qRT-PCR.

6.- METODOLOGÍA

6.1 Obtención de las muestras

Se obtuvieron muestras de sangre periférica de pacientes diagnosticados con Leucemia Mieloide Aguda proporcionadas por el Hospital Juárez de México de la unidad de Oncología otorgadas por el Dr. Jorge Cruz Rico. Como fuente de células control se consideraron muestras de individuos sanos de sangre periférica de aféresis alogénicas del Hospital General La Raza del Banco de Sangre proporcionadas por el Dr. Ángel Guerra Márquez.

Se realizaron los siguientes ensayos:

6.2.- Separación de Células CD34 por Inmunoperlas magnéticas

Este procedimiento se usó para procesar de 100 μ l – 1 mL de muestra (arriba de 5×10^8 células). Se preparó una suspensión de células mononucleares con PBS que contiene 2% FBS (Suero Bovino Fetal) y 1 mM EDTA. Con $< 2 \times 10^7$ células totales, se resuspendieron las células en 100 μ l de medio. Enseguida se agregaron EasySep Positive Selection Cocktail (Stem Cell Technologies) a 100 μ l/ml de células. Se mezclaron bien y se incubaron a temperatura ambiente por 15 minutos. Se mezclaron EasySep Magnetic Nanoparticles para asegurar que hubiera una suspensión uniforme por pipeteo vigorosamente arriba y abajo más de 5 veces. Se agregaron las partículas de 50 μ l/mL, se mezclaron bien y se incubaron a temperatura ambiente por 10 minutos. Se llevaron las células en suspensión a un volumen total de 2.5 mL agregando el medio recomendado. Se mezclaron las células en el tubo por pipeteo vigoroso mas de 5 veces. Se colocó el tubo (sin tapa) en un magneto y se dejaron durante 5 minutos. Se tomó el magneto y en un movimiento continuo se invirtió el magneto y el tubo para descartar la fracción del sobrenadante. Las células marcadas magnéticamente permanecieron dentro del tubo, se dejó el magneto y el tubo en posición invertida de 2 – 3 segundos y después se regresó a la posición vertical. Se volvió a agregar el medio recomendado y de aquí en adelante se lavó la porción adherida al magneto, agregando 2.5 mL, se mezclaron cuidadosamente arriba y abajo, se invirtió el magneto de 2- 3 segundos y se regresa a la posición original, se realizó

éstos lavados 3 veces. Las células seleccionadas positivamente quedaron listas para los demás experimentos.

6.3 Técnica de Sorting (Separación de Población CD34+)

Una vez separadas las células mononucleares y resuspendidas en PBS, se agregaron al tubo Eppendorf 10 μ l de anti-CD45, anti-CD34+, anti-CD33, anti-CD13. Se incubó por 45 minutos a 4°C en oscuridad. Se dividió el volumen final en 2 tubos Eppendorf y se agregó 1 ml de PBS a cada tubo. Se centrifugó a 1500 rpm por 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se resuspendieron las células en 1 ml de PBS (a cada tubo). Se colocaron a las células resuspendidas en un tubo para citómetro y se analizaron.

6.4 Western blot (WB)

2 x 10⁵ células se lisaron en amortiguador de solubilización (100 mM Tris, 5mM MgCl₂, 200 mM ditiotreitolo, y SDS al 4%) conteniendo 100 mM NaF, 10 mM pirofosfato de sodio y 2mM Na₃VO₄, 4mM etilén diamino tetra-acético (EDTA), 0.5% NP-40. Adicionalmente la muestra se sonicó por 15 segundos y se mezcló con amortiguador de carga para proteínas (Tris-Cl/SDS pH 6.8 4X, 3,000 μ l de Glicerol al 30%, 600 μ l de 2- β Mercapto-etanol, 100 μ l de SDS 10%, 1,200 μ l de azul de bromofenol). Se realizó un gel de poliacrilamida al 10% y se agregó un marcador de peso molecular junto con la solución que contiene las proteínas y se realizó una electroforesis para que las proteínas se separarán en función de su peso molecular (previamente cuantificadas por curva de absorbancia, Bradford). Posterior a este paso las proteínas en el gel de poliacrilamida se electrotransfirieron a una membrana de papel de nitrocelulosa en cámara seca por 2 horas, esta membrana se tiñió con una solución de rojo de Ponceau, para corroborar el éxito de la transferencia. La membrana se lavó con un Buffer TBS-T (Buffer Salino-Tris- Tween 20) al 1x durante 5,10 y 15 minutos y se incubó con Leche al 1% (sol. Amortiguadora) durante 1 hora, se realizaron nuevamente lavados con TBS-T y se incubó la membrana con anticuerpo primario durante toda la noche y anticuerpos secundarios por 1 hora, después de un lavado de la

membrana con la solución de TBS-T para eliminar el anticuerpo no unido, se procedió a detectar la localización de la banda en la membrana. Para la detección de quimioluminiscencia, se utilizó un anticuerpo secundario conjugado con la enzima peroxidasa (HRP), la adición de un substrato de HRP provocó una reacción enzimática que dio como resultado final la emisión de luz. Dicha luz puede ser detectada en una película de rayos X, o de forma digital mediante un sistema de captación de imágenes. La detección de fluorescencia se basa en la captación de luz emitida por sustancias fluoróforas conjugadas con el anticuerpo secundario. Los anticuerpos utilizados en el ensayo de Western Blot, se muestran en la Tabla 2.

6.5 Técnica de Inmunofluorescencia (IF)

Las células se fijaron en cubre objetos (previamente limpios con agua destilada, etanol y tratados con Poli D Lisina) con una mezcla de paraformaldehído al 2%, en solución estabilizadora de citoesqueleto, PHEM (PIPES 100 mM, HEPES 5,25 mM, EGTA 10 mM, MgCl₂ mM, pH 6,9) y Tritón al 2% durante 20 minutos. Ya fijadas se lavaron 2 veces con PBS e incubaron durante 2 horas con anticuerpos primarios diluidos en 0,1% de suero bovino fetal (FBS) en PBS (Dil. 1:30) y durante 1 hora con anticuerpo secundario Alexa 488 (Dil 1:80) y Falacidina para marcar los filamentos de actina, seguido de lavados con PBS e incubación durante 1 hora con DAPI el cual identifica el núcleo celular. Las muestras se observaron mediante microscopia confocal (Leica). Los anticuerpos utilizados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2.- Anticuerpos primarios utilizados para Western Blot e Inmunofluorescencia Indirecta.

Anticuerpos primarios				
Anticuerpo	Origen	Epítipo	Especificidad	Casa Comercial
7D11	Monoclonal de Ratón	C-terminal	β -Distroglicano	Santa Cruz Biotechnology Inc. (CA).
C-15	Policlonal de Cabra	C-terminal	α -Distroglicano	Santa Cruz Biotechnology Inc. (CA).
Cranina (6C1)	Monoclonal de Ratón	a.a. del 572-604 del C-terminal	α -Distroglicano	Millipore
IIH6C4	Monoclonal de Ratón	Glicosilaciones del dominio rico en mucinas	α -Distroglicano	Millipore
VIA4-1	Monoclonal de Ratón	Dominio mucina	α -Distroglicano	Millipore
PY893	Monoclonal de Ratón		β -Distroglicano fosforilado	Santa Cruz Biotechnology Inc. (CA).

6.6 Extracción de RNA por la técnica TRIZOL

Para determinar la expresión relativa del RNA mensajero del gen Dag1, se colectaron alrededor de 500,000 – 2'000,000 células mediante centrifugación, para posteriormente lavarlas tres veces con PBS, durante 5 minutos a 12,000 rpm. Para extraer el RNA se utilizó la técnica de TRIZOL Tiocianato de Guanadina Fenol-Cloroformo (Invitrogen), siguiendo el protocolo del fabricante del laboratorio. Ésta técnica consistió en mezclar un determinado volumen de TRIZOL dependiendo del tamaño del pellet celular, inmediatamente después se agregó cloroformo para separar la fase orgánica y se dejó en reposo durante 2-3 minutos

a temperatura ambiente. Después se centrifugó durante 15 minutos a 12,000 rpm a una temperatura de 4 - 6°C. La fase orgánica se recolectó a otro tubo Eppendorf de 1.5 ml, y a éste se le agregó isopropanol para precipitar el RNA y centrifugar durante 10 minutos a 12,000 rpm a una temperatura de 4 - 6°C. Después de la centrifugación, en algunos casos se puede precipitar el RNA en forma de un pellet blanco, en el fondo del tubo. El tubo se decantó, teniendo cuidado de no desechar dicho pellet, y se agregó etanol al 70% para lavar el RNA. Por último se realizó una centrifugación durante 5 minutos a 7500 rpm a una temperatura de 4 - 6°C y se dejó secar el pellet a temperatura ambiente, poniendo boca abajo el tubo. Se cuantificó la concentración del RNA en el espectrofotómetro (Thermo Scientific NanoDrop) a una longitud de onda 260/280 nm y la integridad del RNA se analizó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio como marcador de fluorescencia.

6.7 qRT-PCR

Se realizó la técnica de PCR en tiempo real con el Kit KAPA Syber Fast One Step qRT-PCR, usando 200 ng de RNA, y oligonucleótidos específicos para el transcrito de Distroglicano (DAG) o diferentes glicosiltransferasas. Se usó como gen constitutivo GAPDH. El kit KAPA, contiene una mezcla óptima con Transcriptasa Reversa, para la síntesis de cDNA a 42°C por 5 minutos y posteriormente 95°C por 5 minutos, se prosiguió a realizar la amplificación con 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 64°C por 1 minuto y 72°C por 30 segundos. Para analizar los datos se utilizó la técnica de $2^{-\Delta -\Delta CT}$. Los primers empleados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3.- Oligonucleotidos utilizados para qRT-PCR.

PRIMER	GEN	SECUENCIA
DAG1A	Distroglicano	TCCAGTCAGGGATCCTGTTC
DAG1B	Distroglicano	CAACTGCAGTAGGCTCCACA
GAPDHA	Gliceraldehído-3- fosfatodeshidrogenasa	GAGTCAACGGATTTGGTCGT
GAPDHB	Gliceraldehído-3- fosfatodeshidrogenasa	GACAAGCTTCCCGTTCTCAG
FKTN 5´	Fikutina	GCCACATTCCCACCTTCTAA
FKTN 3´	Fikutina	TTGCCTTCCCTGAGTGAGAT
POMT1A	O-manosiltransferasa 1	CGCTGAGAAGTGATGACTCG
POMT1B	O-manosiltransferasa 1	CAGGTACCACAAGGACAGCA
POMT2A	O-manosiltransferasa 2	CAGATCCCCTAGACCCTTCC
POMT2B	O-manosiltransferasa 2	CTCAATCCGCCAGAAATCAT
POMGnT1A	O-manosil β 1, 2N- acetilglucosaminiltransferasa2	GACCCAGTCCTGCTGAAGAC
POMGnT1B	O-manosil β 1, 2N- acetilglucosaminiltransferasa2	ACCTTGTTGTCTGGGAGTGG
FKRP 5´	Proteína relacionada a Fukutina	GTGCAGTACAGCGAAAGCAA
FKRP 3´	Proteína relacionada a Fukutina	GAAGCGGCGGTAGTTGTTAG
LARGE 5´	Large	CGAGACAATCCACGTTGCTA
LARGE 3´	Large	TAGAAGTCCACACGCACAGC

7.- RESULTADOS

7.1 Detección de las subunidades α - β - y β - fosforilado de Distroglicano en las muestras de pacientes con LMA, así como en las células CD34+ de individuos sanos.

Para cumplir con el objetivo 1, se caracterizó la expresión de los Distroglicanos por WB en células troncales de LMA (subtipos M0, M1, M2 y M3, según la clasificación de la FAB) comparándolas con las de individuos sanos. El patrón de la expresión de la proteína se logró utilizando anticuerpos específicos para α -Distroglicano (6C1), β -Distroglicano (Mandag), y β -Distroglicano fosforilado (β -DgpY892).

Se obtuvieron 41 muestras de pacientes con LMA, de los cuales 22 fueron hombres y 19 fueron mujeres. En relación a los subtipos leucémicos, el porcentaje de cada uno fue de 21.9% M1, 41.4% M2 y 36.5% M3. La tendencia de tener la enfermedad según el subtipo M1 fue de 3 mujeres y 6 hombres, predominando más el subtipo M1 en hombres. En el subtipo M2 encontramos 8 mujeres y 9 hombres, predominando el subtipo M2 en hombres y por último en el subtipo M3, se observó 8 mujeres y 7 hombres, predominando el subtipo M3 en mujeres. En cuanto a la edad, los subtipos M1, M2 y M3 predominaron en edades de arriba de 20 años, teniendo una tendencia del 88.8% en M1, 88.2% para M2, y 86.6% para M3. El porcentaje de células blancas varió entre cada uno de los individuos. El número de células blancas en un individuo sano varía de 4500 a 11,000 células por microlitro. El porcentaje de blastos en un individuo normal, es del 5%. Como se esperaba, el 48.7% de los pacientes con LMA tiene más de 11,000 células blancas por microlitro. Asimismo, el 65.8% de los pacientes presentaron porcentajes de blastos superior al 5% descritos en individuos sanos. Para el resto de los pacientes, no se logró obtener el porcentaje de dichas células por falta de acceso a los expedientes y se representó como ND. Las características de los pacientes se resumen en la Tabla 4 que se presenta a continuación.

Tabla 4.- Características de los pacientes con LMA.

Edad	Sexo	FAB	Células Blancas	% Blastos
72	F	M1	30000	30
57	M	M1	30000	29
61	M	M1	ND	ND
32	M	M1	ND	ND
59	M	M1	ND	ND
61	F	M1	ND	ND
33	M	M1	ND	ND
18	M	M1	ND	ND
38	F	M1	ND	65
52	M	M2	17000	45
61	M	M2	2441	41
72	F	M2	2000	59
54	F	M2	1000	56
42	M	M2	56000	86
38	F	M2	ND	ND
26	M	M2	20000	60
65	M	M2	17300	47
55	F	M2	28300	50
19	F	M2	ND	72
56	F	M2	ND	70
40	M	M2	ND	57
48	F	M2	21000	50
18	M	M2	168000	92
35	M	M2	78000	59
20	M	M2	ND	61
16	F	M2	17900	69
36	M	M3	21000	40
20	F	M3	43500	ND
17	F	M3	44500	ND
42	F	M3	ND	ND
51	M	M3	ND	ND
46	F	M3	ND	ND
22	F	M3	21500	ND
70	M	M3	49000	16
19	M	M3	59800	50
28	F	M3	13500	ND
60	F	M3	72800	81
44	M	M3	ND	55
34	M	M3	ND	76
64	M	M3	98000	99
44	F	M3	ND	80

Clasificación de Leucemia Mieloide según la FAB, Conteo de Leucocitos y Porcentaje de Blastos. ND. No Descrito.

Mediante el WB, se detectaron las proteínas α - β - y la porción fosforilada de β -Distroglicano. El resultado mostró con el anticuerpo dirigido contra α -Distroglicano, una banda de 70 kDa observada tanto en las muestras de pacientes con LMA, así como en las muestras de individuos control (HI), reflejando la expresión del dominio mucina de α -Distroglicano la cual es el dominio central de la proteína. Las muestras de pacientes con LMA mostraron una tendencia a la disminución en la expresión de dicha proteína, pero se mostró una diferencia significativa en la muestra proteica con el subtipo M2, disminuyendo aproximadamente un 85% en comparación con las muestras de individuos sanos. (Fig 7). Tanto en β -Distroglicano, y β -Distroglicano fosforilado, se observó una marca similar en la intensidad de la banda proteica aunque en β -Distroglicano se observó una diferencia significativa en el subtipo M3 disminuyendo aproximadamente un 75% en comparación con las muestras de individuos sanos. Por otro lado, la expresión de la subunidad β - del Distroglicano fosforilado no se observó una disminución significativa entre ellos. Se normalizaron los datos por medio de densitometría con un gen endógeno constitutivo GAPDH. Los datos fueron analizados por medio una T student no pareada. La significancia estadística fue definida como $p < 0.05$. Es importante recalcar que los resultados presentados son geles representativos de tres replicados con pacientes diferentes en cada condición.

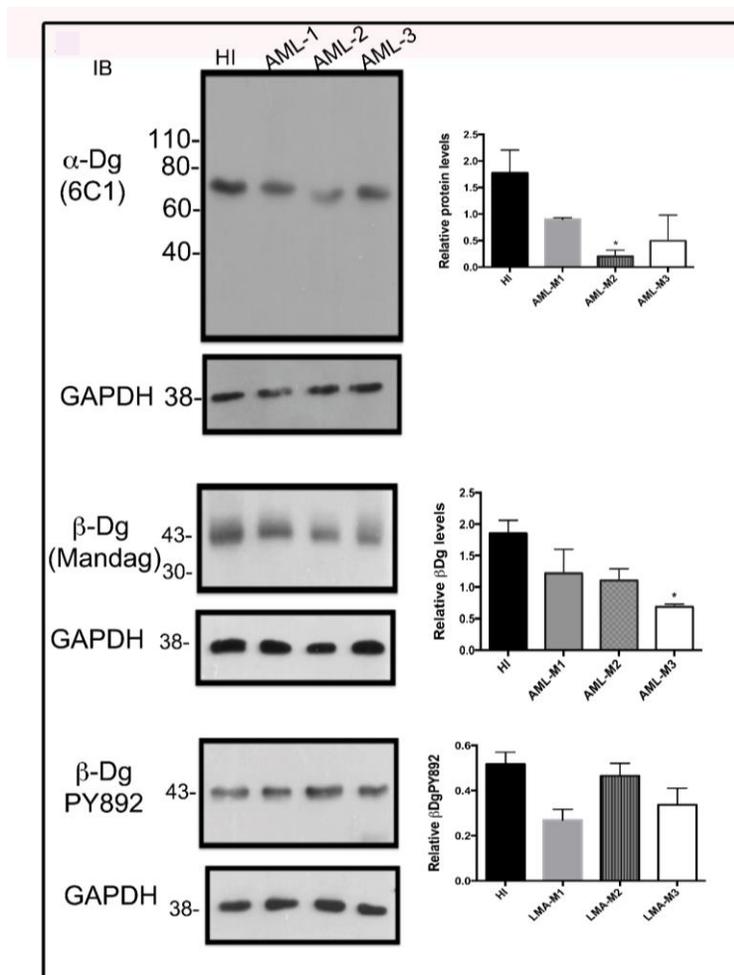


Figura 7. Análisis de Western Blot en muestras de pacientes con LMA subtipos M1, M2 y M3. Expresión proteica de α -Distroglucano (6C1), β -Distroglucano (Mandag) y β - Distroglucano -P (PY892) en células de muestras de pacientes con LMA (subtipos M1, M2 y M3) en comparación con extractos de células CD34+ de individuos sanos. En el panel izquierdo se muestran los geles representativos para cada subunidad de Distroglucano (α - β - y β - fosforilado). En el panel de la derecha, se muestra el análisis densitométrico. Los datos fueron realizados por medio una T student no pareada. La significancia estadística fue definida como $p < 0.05$.

7.2 Detección de la subunidad α - β - y β - fosforilado de Distroglucano en las líneas de HL-60 y Kasumi-1, así como en las células CD34+ de individuos sanos.

También se realizó el análisis de dichas proteínas en 2 líneas celulares de Leucemia Mieloide Aguda, HL-60 subtipo LMA-M3 y Kasumi-1 subtipo LMA-M2

por el análisis de WB. Analizando los resultados obtenidos en las líneas celulares, pudimos observar la misma banda de 70 kDa, que corresponde a α -Distroglicano, detectada por medio del anticuerpo 6C1, observando una tendencia a la reducción del 25% en la línea celular HL-60 y un 50% en la línea celular Kasumi-1, comparada con la muestra control, ninguna de las dos mostraron un dato significativo. Pero al analizar para β -Distroglicano en las muestras de las líneas celulares comparadas con las muestras control se evidenció la banda de 43 kDa esperada mostrando una reducción significativa de aproximadamente el 85% en la línea celular HL-60 y un aproximado del 50%, en comparación con la muestra control. En este experimento, se utilizó el anticuerpo Mandag (proporcionado por el Dr. Steve Winder de la Universidad de Sheffield, Inglaterra). Para la forma fosforilada de β -Distroglicano se observó en ambas líneas celulares una reducción significativa del 50% en comparación con la muestra control. Se normalizaron los datos por medio de densitometría con un gen endógeno constitutivo GAPDH. Los datos fueron realizados por medio una T student no pareada. La significancia estadística fue definida como $p < 0.05$. Es importante recalcar que los resultados obtenidos son geles representativos de tres replicados de cada línea celular Fig. 8.

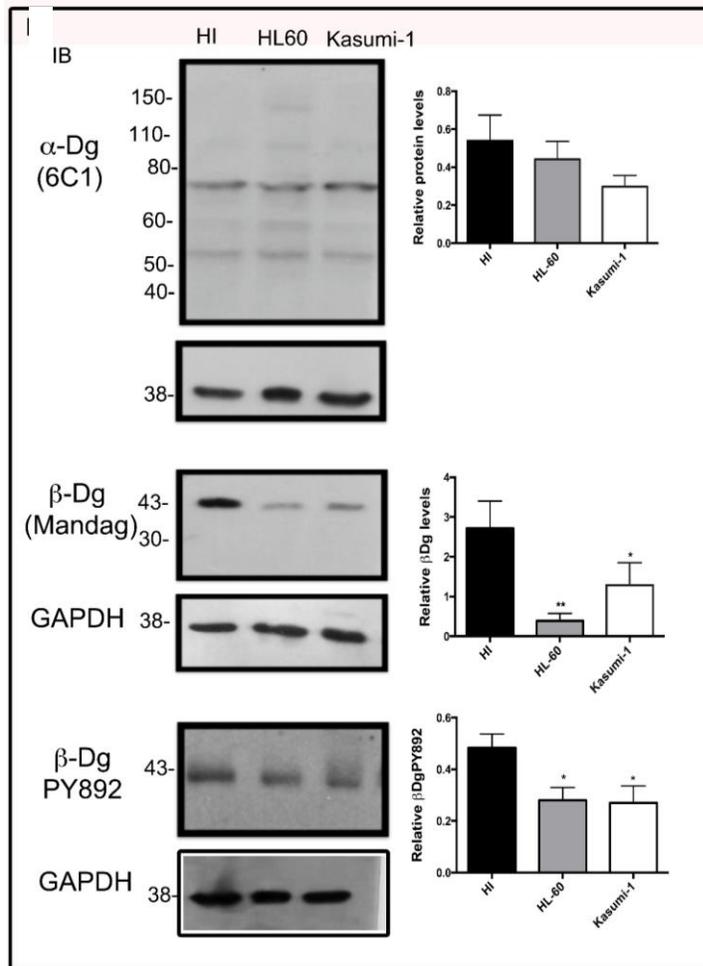


Figura 8. Análisis de Western Blot en líneas celulares de LMA (HL-60 y Kasumi-1). α -Distroglicano (6C1), β -Distroglicano (Mandag), β -Distroglicano-P (PY892) se encuentra presente en las líneas celulares HL-60 y Kasumi-1, así como en las células CD34+ de individuos sanos. En el panel izquierdo se muestran los geles representativos para cada subunidad de Distroglicano (α - β -y β - fosforilado). En el panel de la derecha, se muestra el análisis densitométrico. Los datos fueron realizados por medio una T student no pareada. La significancia estadística fue definida como $p < 0.05$.

7.3 Distribución celular de la subunidad α - β - β - fosforilado de Distroglicano en pacientes con LMA-M1 comparados con células CD34+ de individuos sanos.

Para caracterizar la distribución de los Distroglicanos en las células troncales de LMA en comparación con las células troncales de individuos sanos, se analizaron por medio de inmunofluorescencia indirecta, la cual muestra claramente la morfología celular de las líneas celulares leucémicas y de los subtipos leucémicos de pacientes contra individuos sanos.

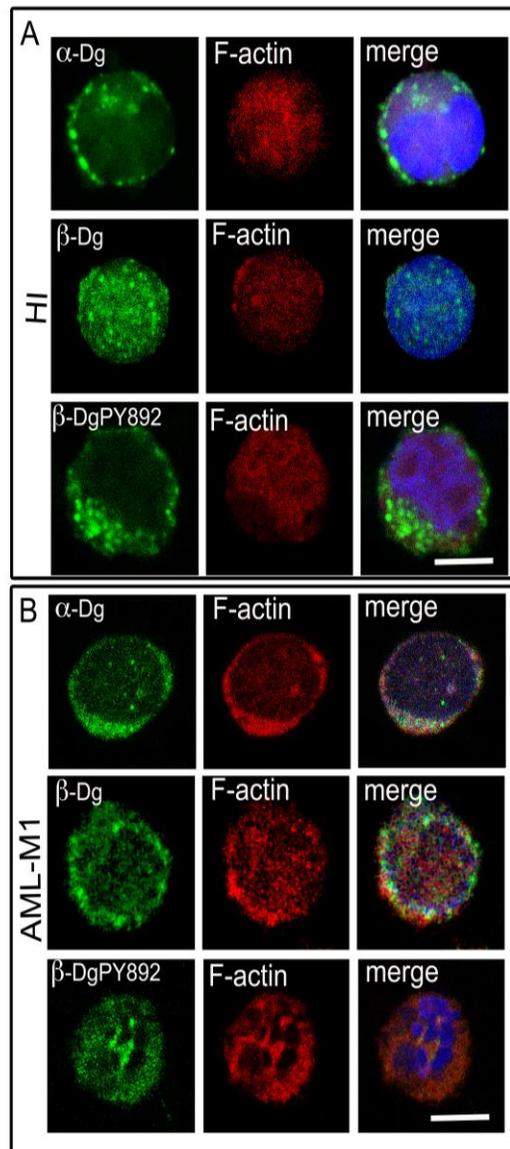


Figura 9. Inmunofluorescencia indirecta de Distroglicano en muestras de pacientes con LMA subtipo M1. Distribución celular de la subunidad de α -Distroglicano, β -Distroglicano y β -Distroglicano fosforilado (verde) en células CD34+ de individuos sanos (A) en comparación con las células de pacientes con LMA, subtipo M1 (B) En rojo se observa la distribución de actina, y en la superposición (merge) se observan los núcleos celulares marcados con DAPI. En la superposición se observa la integración de los tres componentes mencionados. HI, Healthy Individuals, (Individuos Sanos). AML, Acute Myeloid Leukemia, (Leucemia Mieloide Aguda).

La distribución de la subunidad de α -Distroglicano en las muestras de pacientes con LMA en el subtipo M1 se observó en la periferia membranal, en los bordes de la membrana plasmática, en el citoplasma y en núcleo, los cuales se muestran en la figura 9 A y B. En la imagen A se muestran las células analizadas de los individuos sanos, observando una localización similar en comparación con las células leucémicas.

La distribución celular de la porción de β -Distroglicano y la porción fosforilada de β -Distroglicano muestra una mayor localización en el citoplasma y núcleo de la célula, (el núcleo de la célula se puede determinar en azul, ya que DAPI es un fluoróforo que lo identifica y lo tiñe de color azul), abarcando la mayoría de la parte central de la célula, éste resultado muestra un patrón similar al de las células control de individuos sanos (Fig. 9) Es importante recalcar que los subtipos M2 y M3 no se representan en ninguna imagen, dado que no se observaron cambios entre los diferentes subtipos leucémicos y sólo se presentan las imágenes significativas del subtipo M1. Se observaron 20 células de cada subtipo de leucemia y de las muestras CD34+ de individuos sanos.

La actina que se observa en las imágenes de confocal, tiene una disposición citoplasmática parecida a la disposición de la subunidad de α - y β -Distroglicano, por lo que parece colocalizar exactamente con la molécula de Distroglicano.

7.4 Distribución celular de la subunidad de α - β - y β - fosforilado de Distroglicano en líneas celulares comparados con células CD34+ de individuos sanos.

Para evaluar la distribución subcelular de las subunidades del Distroglicano realizamos doble tinción inmunofluorescente y el análisis por microscopia confocal en las líneas celulares HL-60 y Kasumi-1, en comparación con las células CD34+ individuos sanos (HI, por sus siglas en inglés Healthy individuals) observando la subunidad alfa localizando con actina, y observando en el merge una distribución similar a las observadas en células CD34+ de pacientes con LMA, M1, es decir, en la periferia membranal, en los bordes de la membrana plasmática, así como en parte del citoplasma y en núcleo.

La subunidad β - de Distroglicano se aprecia de igual modo en la periferia celular en los bordes de las membranas, aunque también se logró apreciar en los núcleos de las células tanto Kasumi-1, HL-60. La localización de β -Distroglicano fosforilado en las líneas celulares HL-60 y Kasumi-1 como en las células CD34+ de los individuos sanos, se localizó en la membrana plasmática celular, así como algunos cúmulos concentrados en la zona nuclear (Fig. 10).

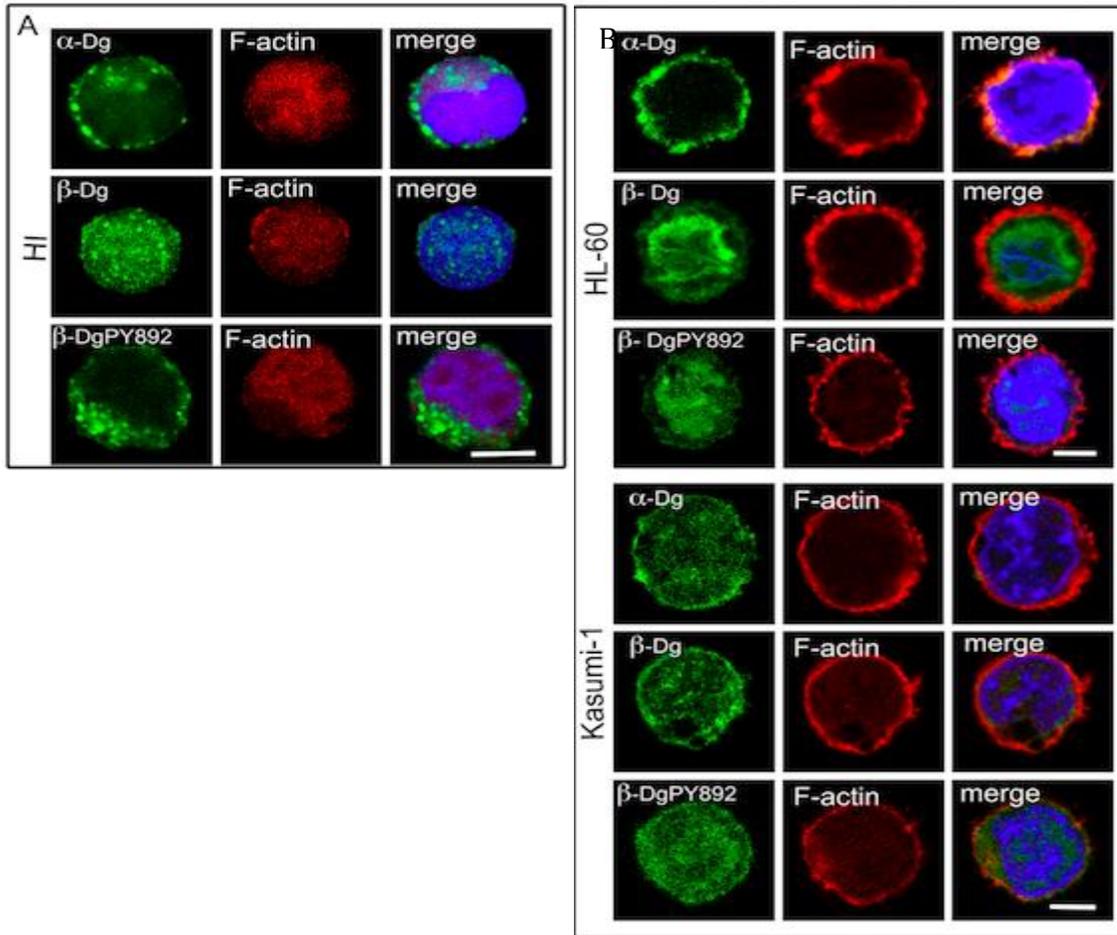


Figura 10. Inmunofluorescencia indirecta de Distroglicano en líneas celulares HL-60 y Kasumi-1 comparadas con células CD34+ de individuos sanos. Distribución celular de la subunidad de α -Distroglicano, β -Distroglicano y β -Distroglicano fosforilado (verde) en las líneas celulares HL-60 y Kasumi-1 (B) comparadas con células CD34+ de individuos sanos (A). En rojo se observa la distribución de actina, y en el merge se observa DAPI, el cual tiñe al núcleo de la célula. En el merge se observa la integración de los tres componentes mencionados. HI, Healthy Individuals.

7.5 Comparación de los niveles de expresión del RNA mensajero del gen DAG1 en células CD34+ de individuos sanos respecto a pacientes con Leucemia Mieloide Aguda así como en las líneas celulares HL-60 y Kasumi-1

Una manera de medir la expresión del Distroglicano se realiza mediante la evaluación de la transcripción del gen, es decir, la expresión del RNA mensajero (RNAm). Para ello se empleó la técnica de PCR en tiempo real (qPCR). En ella se determinan los valores de CT que indican un valor equivalente a la cantidad de mensajero inicial, y son calculados mediante el análisis de datos (ver, materiales y métodos). El análisis final entre las diversas células analizadas se realiza a través de las diferencias de CT entre cada mensajero, por lo que se calculan los valores Δ CT.

Para este experimento se analizó la abundancia del RNAm de DG en células CD34+ de individuos sanos y de pacientes con Leucemia Mieloide Aguda (LMA) subtipos M1, M2 y M3. Los valores de RNAm se normalizaron con respecto a la expresión del gen GADPH (de expresión constitutiva). Para la gráfica de expresión se normalizó con el valor determinado para el control (CD34+, individuo sano) cuyo valor de Δ CT se designó con valor de 1. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y se analizaron estadísticamente por la prueba de T de *Student*.

El análisis de los datos determinados por qPCR evidencía una disminución de la expresión del RNAm en todas las muestras de LMA con respecto al control (individuo sano), sin embargo, el grado de disminución difiere entre las muestras, siendo de un 75% para el subtipo M1, 65% para el subtipo M2 y 45% para el subtipo M3 (Fig. 11a). El análisis estadístico mostró que sólo existe diferencia significativa entre el control y la muestra LMA subtipo M1 ($p < 0.01$) y el control y la muestra LMA subtipo M2 ($p < 0.05$).

También se analizó la expresión del RNAm de Distroglicano en las líneas celulares HL-60 y Kasumi-1, comparando sus valores con el control células CD34+ de individuo sano. Al igual que las muestras de pacientes con LMA, las líneas celulares muestran disminución del mensajero, donde HL-60 presenta un 70% de

disminución y Kasumi-1 35% (Fig. 11b). Las líneas celulares también muestran diferencia significativa con respecto al control.

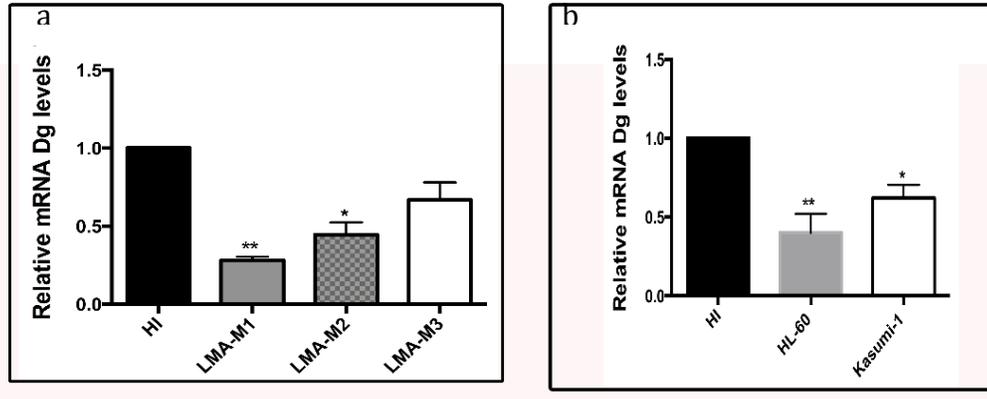


Figura 11.- Comparación en los niveles de expresión de RNAm de DAG. Se analizaron los niveles de expresión de Distroglicano en las muestras de pacientes con LMA en los diferentes subtipos (M1, M2 y M3), así como en las líneas celulares (HL-60 y Kasumi-1) en comparación con las células CD34+ de individuos sanos. Los datos fueron analizados por medio de la técnica de qRT-PCR y normalizados con un gen de referencia: GAPDH. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

7.6.- Análisis de las glicosiltransferasas en las líneas celulares HL-60 y Kasumi-1, así como en los pacientes con LMA comparados con las células CD34+ de individuos sanos.

En otros reportes se muestra que la expresión de las subunidades del Distroglicano tiene una expresión disminuida en diferentes tipos de cáncer. En este trabajo, también encontramos ésta disminución tanto en las muestras de pacientes con LMA y en las líneas celulares. Por lo que, nos interesó evaluar la expresión de las glicosiltransferasas ya que de acuerdo a los resultados obtenidos en el ensayo de WB, tanto las células de las líneas celulares y las muestras de pacientes con LMA inferimos que podía haber defectos en la glicosilación de la subunidad α del Distroglicano, como se ha observado en las líneas celulares de cáncer de tejido sólido. Así que, se realizó la evaluación del RNA mensajero de las

seis enzimas más importantes que dirigen esta modificación, las cuales incluyen, POMGnT1, POMT1, POMT2, Fukutina, LARGE y FKRP (Fig. 12).

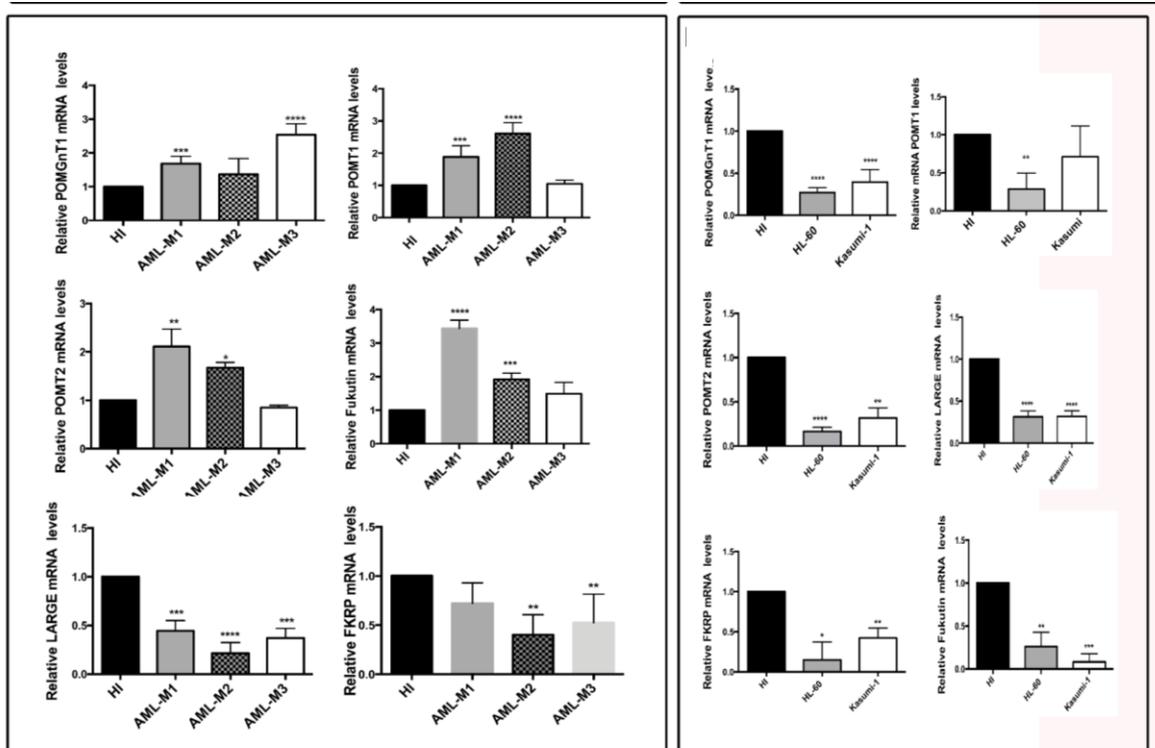


Figura 12.- Comparación de los niveles de expresión de RNAm de las Glicosiltransferasas. Se analizaron los niveles de expresión de las 6 diferentes glicosiltransferasas tanto en las muestras de pacientes con LMA en los diferentes subtipos (M1, M2 y M3), así como en las líneas celulares HL-60 y Kasumi-1, en comparación con las células CD34+ de individuos sanos. Los datos fueron normalizados con un gen de referencia: GAPDH. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Los resultados obtenidos demuestran una expresión heterogénea de las seis enzimas en las muestras de pacientes con LMA en los diferentes subtipos clínicos, en comparación con las muestras que representan los controles. Específicamente, como observamos en la figura 12, se observó mayor expresión de POMGnT-1, POMT-1, POMT-2, y Fukutina, en comparación con los controles, mientras que hay una reducción en la expresión de LARGE y FKRP. La expresión relativa de POMGnT1 en los pacientes con LMA subtipos M1, y M3 es aumentada en un 15% y 50% que la muestra control la cual fue representativamente

significativa. De igual manera para la expresión relativa de POMT1, tuvo una mayor expresión en los subtipos M1 y M2 del 50% y 70% en comparación de los controles sanos los cuales también fueron estadísticamente significativos. Para POMT2, la sobreexpresión mostró un porcentaje del 70%, y 30 % mayor para los subtipos M1 y M2 comparados con las muestras de individuos sanos. Para Fukutina, la expresión relativa mostró un dato mayor al control del 80% y 30% del subtipo M2 y M3 respectivamente, mostrando de igual manera un dato estadísticamente significativo. Comparado con la expresión de las diferentes glicosiltransferasas, LARGE y FKRП mostraron datos diferentes con una disminución de la expresión relativa en LARGE de aproximadamente el 15%, 70% y 60% en subtipos M1, M2 y M3 respectivamente, comparados con la expresión relativa del control utilizado en el ensayo, así como de FKRП con una disminución del 40%, 65% y 60% del subtipo M1, M2 y M3 respectivamente, comparado con la expresión relativa de los individuos sanos. Los ensayos se realizaron a partir de tres muestras diferentes de cada tipo de leucemia y cada muestra se procesó por triplicado.

Analizando los datos obtenidos del RNA mensajero en las líneas celulares, de las 6 enzimas glicosilantes de α -Distroglicano, se observó una reducción relativa tanto en HL-60 como en Kasumi-1, comparadas con los controles.

Para POMGnT1 la disminución fue del 75% y 65 % en la línea celular HL-60 y Kasumi-1 respectivamente comparada con la expresión relativa del control, mostrando una estadística significativa en ambas líneas. Para POMT1, se arrojó el dato de una disminución del 80% menor en la línea celular HL-60, en comparación con el control del experimento, observando una disminución significativa a excepción de la línea celular Kasumi-1. En la expresión relativa de POMT2, la expresión disminuyó un 80% y 75% en las líneas HL-60 y Kasumi-1 respectivamente, mostrando ambos una disminución significativa. LARGE obtuvo datos iguales en la disminución de la expresión tanto en la línea celular HL-60 y Kasumi-1 del 70%, ambas teniendo una significancia estadística. Para FKRП, se mostró una disminución del 85% y 65% de las líneas celulares HL-60 y Kasumi-1

respectivamente comparadas con la expresión relativa de las células control. Y por último, se midió la expresión relativa de Fukutina con una expresión del 80% y 95% menor en las líneas HL-60 y Kasumi-1 respectivamente, comparados con la expresión relativa de las células control.

En las células HL-60, todas las enzimas glicosídicas demostraron una expresión mucho más disminuida comparada con Kasumi-1, LARGE arrojó unos datos muy similares en ambas líneas celulares, aunque en Kasumi-1, la enzima Fukutina, demostró una expresión muy baja, comparada a la línea celular HL-60. El ensayo se realizó por triplicado, y se obtuvo el análisis por medio de la prueba estadística *T student* no pareada, la significancia estadística fue definida como $p < 0.05$.

8.- DISCUSIÓN

En el presente estudio se mostró por primera vez el patrón de expresión y la distribución subcelular del Distroglicano en células CD34+ de pacientes con Leucemia Mieloide Aguda subtipos M1, M2 y M3 tanto en una línea celular humana leucémica subtipo M2, (Kasumi-1), y una línea celular humana leucémica subtipo M3, (HL-60). Cabe resaltar que se escogieron estos subtipos porque son los subtipos más indiferenciados. Estos modelos celulares nos permitieron determinar la expresión y distribución de los Distroglicanos y relacionarlos con lo que ocurre en pacientes con dicha enfermedad.

En el presente estudio, se mostró por primera vez, el patrón de expresión y la distribución subcelular del Distroglicano, en células CD34+ de pacientes con Leucemia Mieloide Aguda.

Una disminución del peso molecular relativo de α -Distroglicano (140 kDa) fue evidente, comparado a los reportados en nuestros estudios previos para células HL-60 y Kasumi-1 (160 kDa) [54],[55]. Así que nosotros sugerimos que la proteólisis del ectodominio de β -Distroglicano [56], o de la porción amino terminal de α -Distroglicano [57],[58],[59] producida por las metaloproteasas (MMP, Furina y γ -secretasa [60] respectivamente, puede contribuir a la patofisiología de la LMA, como ha estado implicada en la progresión del cáncer en otros modelos celulares.

En ésta patología los niveles proteicos del Distroglicano, las especies glicosiladas de la subunidad de α -Distroglicano, así como para la subunidad de β -Distroglicano y su forma fosforilada demostraron una expresión reducida. Esta disminución no correlaciona con la severidad clínica como se ha reportado en otros modelos [61], en contraste al nivel transcripcional detectado con ensayos de qRT-PCR.

Mediante los ensayos de Inmunofluorescencia indirecta pudimos ubicar la distribución de los Distroglicanos en la periferia de la membrana con patrones similares a la distribución de actina, lo que sugiere una participación de dichos filamentos de acuerdo a los modelos ya caracterizados que los describen en estructuras basadas en actina como es el Complejo de Proteínas Asociadas a

Distrofina. Recientemente se ha descrito la presencia de Distroglicano en el núcleo ha sido descrito formando parte del nucleoesqueleto, así como modulando las regiones activas transcripcionales [62]. La presencia de β -Distroglicano pY892 en los núcleos de las células leucémicas puede ser indicativo de la ubiquitinación activa, el cual puede exacerbar la desregulación en procesos de proliferación y diferenciación, como se propuso en cáncer de próstata [63].

Así mismo se ha descrito que la hipoglicolización, altera severamente la capacidad de α -Distroglicano a unirse a proteínas de la MEC facilitando su degradación por la MMP2 o por enzimas no identificadas hasta la fecha [64] además en algunos pacientes afectados por Distroglicanopatías, se identificó una importante reducción de la parte central de la proteína Distroglicano [65] éstos eventos correlacionan con nuestros resultados ya que observamos una significativa reducción en las formas de α -Distroglicano glicosiladas así como una disminución en la expresión de la proteína central del Distroglicano.

Una proteína más pequeña de α -Distroglicano también fue observada (110kDa), independientemente del origen de la muestra (línea celular o paciente), ésta forma no puede ser detectada por el anticuerpo IIH6 dependiente de carbohidratos, sugiriendo alteración en la glicosilación de α -Distroglicano y pérdida de la función del receptor, como ha sido descrito en músculo esquelético en pacientes con Distroglicanopatía [66]. A través del análisis de Western Blot, por el peso de la proteína, pudimos suponer que la ausencia de glicosilaciones en ésta, conlleva a una falta de adhesión de las células a la matriz extracelular de la medula ósea, y que migran de forma inmadura e indiferenciada al torrente sanguíneo, lo que es el caso de la leucemia.

En apoyo a éstos hallazgos, se realizó la cuantificación de 6 enzimas responsables de la modificación del sitio mucina de α -Distroglicano que a su vez modula el anclaje de laminina porque se han encontrado defectos similares en líneas celulares de cáncer [67],[40],[68],[69].

Resultados derivados de los blastos de LMA así como las líneas celulares leucémicas mostraron una disminución de LARGE. En algunos cánceres, cambios

en la metilación del promotor de ésta enzima permite la pérdida de su expresión [70].

Es importante recalcar que en otros trabajos del laboratorio, en los que se realizó una transfección para la expresión del Dg por medio de un vector en cada uno de los sistemas celulares ya descritos (HL-60 y Kasumi-1), se observó una recuperación fenotípica a medida que se reducía la proliferación celular. El proceso de diferenciación y fagocitosis se incrementaron lo que demuestra la importancia del Distroglicano en la estructura, y su papel de señalización relacionados con la fisiopatología de la Leucemia Mieloide Aguda.

9.- CONCLUSIONES

Los resultados derivados del presente proyecto ha contribuido de manera importante a dilucidar las implicaciones clínicas que los cambios del Distroglicano a nivel cualitativo y cuantitativo pudieran tener. Alteraciones en las propiedades adhesivas le pueden conferir una ventaja proliferativa que afecta a la liberación de células blásticas de la medula ósea, facilitando la proliferación o migración a través de la pared vascular. Los cambios en el nivel de expresión de los Distroglicanos en las células mieloides de los pacientes leucémicos pudieran funcionar como indicadores pronósticos o como un biomarcador potencial no solo para el diagnóstico de leucemia, sino para el pronóstico de la enfermedad.

10.- PERSPECTIVAS

Dados los resultados obtenidos en este trabajo y en reportes anteriores, en que se conoce la disminución de la expresión del Distroglicano en diferentes tipos de cáncer, en un primer plano estará los trabajos destinados a sobreexpresar la expresión del Distroglicano en células leucémicas humanas para lograr revertir el comportamiento del fenotipo leucémico.

Otro punto que sería importante para complementar sería el utilizar un inhibidor de la furina y metaloproteasas implicadas en ciertos cánceres; y comprobar si estas metaloproteasas están implicadas en la degradación tanto del ectodominio de β -Distroglicano o la porción amino terminal de α -Distroglicano en células leucémicas humanas.

Sería importante trabajar con un modelo leucémico *in vivo* y sobreexpresar al Distroglicano, para evaluar el papel y comportamiento de la proteína en el modelo y ver si los ensayos revelados *in vitro* se observan *in vivo*.

11.- REFERENCIAS

1. Takaku T, Malide D, Chen J, Calado RT, Kajigaya S, Young NS: **Hematopoiesis in 3 dimensions: human and murine bone marrow architecture visualized by confocal microscopy.** *Blood* 2010, **116**(15):e41-55.
2. Kokkaliaris KD, Loeffler D, Schroeder T: **Advances in tracking hematopoiesis at the single-cell level.** *Curr Opin Hematol* 2012, **19**(4):243-249.
3. Wang LD, Wagers AJ: **Dynamic niches in the origination and differentiation of haematopoietic stem cells.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011, **12**(10):643-655.
4. MM M: **Clinical Hematology and Fundamentals of Hemostasis.** Philadelphia; 1997.
5. Pelayo R, Santa-Olalla J, Velasco I: **Células Troncales y Medicina Regenerativa** 1st edn. México, DF; 2011.
6. Kapustay PM: **Blood cell transplantation: concepts and concerns.** *Semin Oncol Nurs* 1997, **13**(3):151-163.
7. Montesinos JJ, Mayani H: **Nuevos conceptos en la biología de la leucemia mieloide aguda**, vol. 138: Gaceta Médica Mexicana; 2012.
8. Lane SW, Scadden DT, Gilliland DG: **The leukemic stem cell niche: current concepts and therapeutic opportunities.** *Blood* 2009, **114**(6):1150-1157.
9. Domen J, Weissman IL: **Hematopoietic stem cells need two signals to prevent apoptosis; BCL-2 can provide one of these, Kitl/c-Kit signaling the other.** *J Exp Med* 2000, **192**(12):1707-1718.
10. Piacibello W, Sanavio F, Garetto L, Severino A, Bergandi D, Ferrario J, Fagioli F, Berger M, Aglietta M: **Extensive amplification and self-renewal of human primitive hematopoietic stem cells from cord blood.** *Blood* 1997, **89**(8):2644-2653.
11. Shingu T, Jaskelioff M, Yuan L, Ding Z, Protopopov A, Kost-Alimova M, Hu J: **Utilizing murine inducible telomerase alleles in the studies of tissue degeneration/regeneration and cancer.** *J Vis Exp* 2015(98).
12. Harley CB, Futcher AB, Greider CW: **Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts.** *Nature* 1990, **345**(6274):458-460.
13. Bellantuono I, Keith WN: **Stem cell ageing: does it happen and can we intervene?** *Expert Rev Mol Med* 2007, **9**(31):1-20.
14. Sidney LE, Branch MJ, Dunphy SE, Dua HS, Hopkinson A: **Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors.** *Stem Cells* 2014, **32**(6):1380-1389.
15. Hoffman R, Benz EJ, Silberstein LE: **Hematology: Basic Principles and Practice**, 3era edn; 2000.
16. Luczak M, Kazmierczak M, Handschuh L, Lewandowski K, Komarnicki M, Figlerowicz M: **Comparative proteome analysis of acute myeloid leukemia with and without maturation.** *J Proteomics* 2012, **75**(18):5734-5748.
17. Buitron-Santiago N, Arteaga-Ortiz L, Rosas-Lopez A, Aguayo A, Lopez-Karpovitch X, Crespo-Solis E: **[Acute myeloid leukemia in adults: experience at the Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutricion Salvador Zubiran from 2003 to 2008].** *Rev Invest Clin* 2010, **62**(2):100-108.

18. Sala ML, Blanco B, Pérez M, Pérez M: **Hematología Clínica.**
19. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, Kantarjian HM: **Chronic myelogenous leukemia: biology and therapy.** *Ann Intern Med* 1999, **131**(3):207-219.
20. Buzzai M, Licht JD: **New molecular concepts and targets in acute myeloid leukemia.** *Curr Opin Hematol* 2008, **15**(2):82-87.
21. Mejia-Arangure JM, Nunez-Enriquez JC, Fajardo-Gutierrez A, Rodriguez-Zepeda MD, Martin-Trejo JA, Duarte-Rodriguez DA, Medina-Sanson A, Flores-Lujano J, Jimenez-Hernandez E, Nunez-Villegas NN *et al*: **[Descriptive epidemiology of children with acute myeloid leukemia residing in Mexico City: a report from the Mexican Inter-Institutional Group for Identifying Childhood Leukemia Causes].** *Gac Med Mex* 2016, **152**(Suppl 2):66-77.
22. Estrov Z, Manna SK, Harris D, Van Q, Estey EH, Kantarjian HM, Talpaz M, Aggarwal BB: **Phenylarsine oxide blocks interleukin-1beta-induced activation of the nuclear transcription factor NF-kappaB, inhibits proliferation, and induces apoptosis of acute myelogenous leukemia cells.** *Blood* 1999, **94**(8):2844-2853.
23. Gallagher R, Collins S, Trujillo J, McCredie K, Ahearn M, Tsai S, Metzgar R, Aulakh G, Ting R, Ruscetti F *et al*: **Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia.** *Blood* 1979, **54**(3):713-733.
24. Larizza L, Magnani I, Beghini A: **The Kasumi-1 cell line: a t(8;21)-kit mutant model for acute myeloid leukemia.** *Leuk Lymphoma* 2005, **46**(2):247-255.
25. Asou H, Tashiro S, Hamamoto K, Otsuji A, Kita K, Kamada N: **Establishment of a human acute myeloid leukemia cell line (Kasumi-1) with 8;21 chromosome translocation.** *Blood* 1991, **77**(9):2031-2036.
26. Geiger B, Spatz JP, Bershadsky AD: **Environmental sensing through focal adhesions.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009, **10**(1):21-33.
27. Frantz C, Stewart KM, Weaver VM: **The extracellular matrix at a glance.** *J Cell Sci* 2010, **123**(Pt 24):4195-4200.
28. Karp G: **Biología Celular y Molecular** Editorial Mc Graw Hill Interamericana 2005.
29. Sandona D, Betto R: **Sarcoglycanopathies: molecular pathogenesis and therapeutic prospects.** *Expert Rev Mol Med* 2009, **11**:e28.
30. Pilgram GS, Potikanond S, Baines RA, Fradkin LG, Noordermeer JN: **The roles of the dystrophin-associated glycoprotein complex at the synapse.** *Mol Neurobiol* 2010, **41**(1):1-21.
31. Bougrid A, Claudepierre T, Picaud S, Ayad G, Mornet D, Dorbani-Mamine L, Rendon A, Darbeida H: **Expression of dystrophins and the dystrophin-associated-protein complex by pituicytes in culture.** *Neurochem Res* 2011, **36**(8):1407-1416.
32. Rees ML, Lien CF, Gorecki DC: **Dystrobrevins in muscle and non-muscle tissues.** *Neuromuscul Disord* 2007, **17**(2):123-134.
33. Newey SE, Howman EV, Ponting CP, Benson MA, Nawrotzki R, Loh NY, Davies KE, Blake DJ: **Syncoilin, a novel member of the intermediate filament superfamily that interacts with alpha-dystrobrevin in skeletal muscle.** *J Biol Chem* 2001, **276**(9):6645-6655.

34. Cerecedo D, Cisneros B, Gomez P, Galvan IJ: **Distribution of dystrophin- and utrophin-associated protein complexes during activation of human neutrophils.** *Exp Hematol* 2010, **38**(8):618-628 e613.
35. Koeppe BM, Stanton BA: **Bern & Levy Physiology** 7th edn: Elsevier; 2008.
36. Koeppe BM, Stanton BA: **Physiology**, 6th edn; 2008.
37. Hara Y, Kanagawa M, Kunz S, Yoshida-Moriguchi T, Satz JS, Kobayashi YM, Zhu Z, Burden SJ, Oldstone MB, Campbell KP: **Like-acetylglucosaminyltransferase (LARGE)-dependent modification of dystroglycan at Thr-317/319 is required for laminin binding and arenavirus infection.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, **108**(42):17426-17431.
38. Barresi R, Campbell KP: **Dystroglycan: from biosynthesis to pathogenesis of human disease.** *J Cell Sci* 2006, **119**(Pt 2):199-207.
39. Cross SS, Lippitt J, Mitchell A, Hollingsbury F, Balasubramanian SP, Reed MW, Eaton C, Catto JW, Hamdy F, Winder SJ: **Expression of beta-dystroglycan is reduced or absent in many human carcinomas.** *Histopathology* 2008, **53**(5):561-566.
40. de Bernabe DB, Inamori K, Yoshida-Moriguchi T, Weydert CJ, Harper HA, Willer T, Henry MD, Campbell KP: **Loss of alpha-dystroglycan laminin binding in epithelium-derived cancers is caused by silencing of LARGE.** *J Biol Chem* 2009, **284**(17):11279-11284.
41. Brancaccio A, Schulthess T, Gesemann M, Engel J: **The N-terminal region of alpha-dystroglycan is an autonomous globular domain.** *Eur J Biochem* 1997, **246**(1):166-172.
42. Yoshida-Moriguchi T, Yu L, Stalnaker SH, Davis S, Kunz S, Madson M, Oldstone MB, Schachter H, Wells L, Campbell KP: **O-mannosyl phosphorylation of alpha-dystroglycan is required for laminin binding.** *Science* 2010, **327**(5961):88-92.
43. Hewitt JE: **Abnormal glycosylation of dystroglycan in human genetic disease.** *Biochim Biophys Acta* 2009, **1792**(9):853-861.
44. Han R, Kanagawa M, Yoshida-Moriguchi T, Rader EP, Ng RA, Michele DE, Muirhead DE, Kunz S, Moore SA, Iannaccone ST *et al*: **Basal lamina strengthens cell membrane integrity via the laminin G domain-binding motif of alpha-dystroglycan.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**(31):12573-12579.
45. Martin PT, Freeze HH: **Glycobiology of neuromuscular disorders.** *Glycobiology* 2003, **13**(8):67R-75R.
46. Stevens E, Torelli S, Feng L, Phadke R, Walter MC, Schneiderat P, Eddaoudi A, Sewry CA, Muntoni F: **Flow cytometry for the analysis of alpha-dystroglycan glycosylation in fibroblasts from patients with dystroglycanopathies.** *PLoS One* 2013, **8**(7):e68958.
47. Sotgia F, Lee H, Bedford MT, Petrucci T, Sudol M, Lisanti MP: **Tyrosine phosphorylation of beta-dystroglycan at its WW domain binding motif, PPxY, recruits SH2 domain containing proteins.** *Biochemistry* 2001, **40**(48):14585-14592.
48. Alberts B, Johnson A, J L: **Biología Molecular de la Célula.** New York: Garland Science; 2002.

49. Schwartz MA: **Integrins and extracellular matrix in mechanotransduction.** *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010, **2**(12):a005066.
50. Swiderski K, Shaffer SA, Gallis B, Odom GL, Arnett AL, Scott Edgar J, Baum DM, Chee A, Naim T, Gregorevic P *et al*: **Phosphorylation within the cysteine-rich region of dystrophin enhances its association with beta-dystroglycan and identifies a potential novel therapeutic target for skeletal muscle wasting.** *Hum Mol Genet* 2014, **23**(25):6697-6711.
51. Thompson O, Kleino I, Crimaldi L, Gimona M, Saksela K, Winder SJ: **Dystroglycan, Tks5 and Src mediated assembly of podosomes in myoblasts.** *PLoS One* 2008, **3**(11):e3638.
52. Sgambato A, Brancaccio A: **The dystroglycan complex: from biology to cancer.** *J Cell Physiol* 2005, **205**(2):163-169.
53. Bozzi M, Morlacchi S, Bigotti MG, Sciandra F, Brancaccio A: **Functional diversity of dystroglycan.** *Matrix Biol* 2009, **28**(4):179-187.
54. Martinez-Zarate AD, Martinez-Vieyra I, Alonso-Rangel L, Cisneros B, Winder SJ, Cerecedo D: **Dystroglycan depletion inhibits the functions of differentiated HL-60 cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 2014, **448**(3):274-280.
55. Escarcega-Tame MA, Martinez-Vieyra I, Alonso-Rangel L, Cisneros B, Winder SJ, Cerecedo D: **Dystroglycan Depletion Impairs Actin-Dependent Functions of Differentiated Kasumi-1 Cells.** *PLoS One* 2015, **10**(12):e0144078.
56. Losasso C, Di Tommaso F, Sgambato A, Ardito R, Cittadini A, Giardina B, Petrucci TC, Brancaccio A: **Anomalous dystroglycan in carcinoma cell lines.** *FEBS Lett* 2000, **484**(3):194-198.
57. Singh J, Itahana Y, Knight-Krajewski S, Kanagawa M, Campbell KP, Bissell MJ, Muschler J: **Proteolytic enzymes and altered glycosylation modulate dystroglycan function in carcinoma cells.** *Cancer Res* 2004, **64**(17):6152-6159.
58. Saito F, Saito-Arai Y, Nakamura-Okuma A, Ikeda M, Hagiwara H, Masaki T, Shimizu T, Matsumura K: **Secretion of N-terminal domain of alpha-dystroglycan in cerebrospinal fluid.** *Biochem Biophys Res Commun* 2011, **411**(2):365-369.
59. Hesse C, Johansson I, Mattsson N, Bremell D, Andreasson U, Halim A, Anckarsater R, Blennow K, Anckarsater H, Zetterberg H *et al*: **The N-terminal domain of alpha-dystroglycan, released as a 38 kDa protein, is increased in cerebrospinal fluid in patients with Lyme neuroborreliosis.** *Biochem Biophys Res Commun* 2011, **412**(3):494-499.
60. Leocadio D, Mitchell A, Winder SJ: **gamma-Secretase Dependent Nuclear Targeting of Dystroglycan.** *J Cell Biochem* 2016, **117**(9):2149-2157.
61. Jimenez-Mallebrera C, Torelli S, Feng L, Kim J, Godfrey C, Clement E, Mein R, Abbs S, Brown SC, Campbell KP *et al*: **A comparative study of alpha-dystroglycan glycosylation in dystroglycanopathies suggests that the hypoglycosylation of alpha-dystroglycan does not consistently correlate with clinical severity.** *Brain Pathol* 2009, **19**(4):596-611.
62. Martinez-Vieyra IA, Vasquez-Limeta A, Gonzalez-Ramirez R, Morales-Lazaro SL, Mondragon M, Mondragon R, Ortega A, Winder SJ, Cisneros B: **A role for beta-**

- dystroglycan in the organization and structure of the nucleus in myoblasts.** *Biochim Biophys Acta* 2013, **1833**(3):698-711.
63. Mitchell A, Mathew G, Jiang T, Hamdy FC, Cross SS, Eaton C, Winder SJ: **Dystroglycan function is a novel determinant of tumor growth and behavior in prostate cancer.** *Prostate* 2013, **73**(4):398-408.
64. Sbardella D, Inzitari R, Iavarone F, Gioia M, Marini S, Sciandra F, Castagnola M, Van den Steen PE, Opdenakker G, Giardina B *et al*: **Enzymatic processing by MMP-2 and MMP-9 of wild-type and mutated mouse beta-dystroglycan.** *IUBMB Life* 2012, **64**(12):988-994.
65. Humphrey EL, Lacey E, Le LT, Feng L, Sciandra F, Morris CR, Hewitt JE, Holt I, Brancaccio A, Barresi R *et al*: **A new monoclonal antibody DAG-6F4 against human alpha-dystroglycan reveals reduced core protein in some, but not all, dystroglycanopathy patients.** *Neuromuscul Disord* 2015, **25**(1):32-42.
66. Michele DE, Barresi R, Kanagawa M, Saito F, Cohn RD, Satz JS, Dollar J, Nishino I, Kelley RI, Somer H *et al*: **Post-translational disruption of dystroglycan-ligand interactions in congenital muscular dystrophies.** *Nature* 2002, **418**(6896):417-422.
67. Bao X, Kobayashi M, Hatakeyama S, Angata K, Gullberg D, Nakayama J, Fukuda MN, Fukuda M: **Tumor suppressor function of laminin-binding alpha-dystroglycan requires a distinct beta3-N-acetylglucosaminyltransferase.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**(29):12109-12114.
68. Martin LT, Glass M, Dosunmu E, Martin PT: **Altered expression of natively glycosylated alpha dystroglycan in pediatric solid tumors.** *Hum Pathol* 2007, **38**(11):1657-1668.
69. Cerecedo D, Martinez-Rojas D, Chavez O, Martinez-Perez F, Garcia-Sierra F, Rendon A, Mornet D, Mondragon R: **Platelet adhesion: structural and functional diversity of short dystrophin and utrophins in the formation of dystrophin-associated-protein complexes related to actin dynamics.** *Thromb Haemost* 2005, **94**(6):1203-1212.
70. Akhavan A, Griffith OL, Soroceanu L, Leonoudakis D, Luciani-Torres MG, Daemen A, Gray JW, Muschler JL: **Loss of cell-surface laminin anchoring promotes tumor growth and is associated with poor clinical outcomes.** *Cancer Res* 2012, **72**(10):2578-2588.

