

**ESTUDIO DEL EFECTO DEL D- $\alpha$ -TOCOFEROL POLIETILENGLICOL 1000 SUCCINATO  
(TPGS) COMO POTENCIAL AGENTE TERAPÉUTICO EN EL TRATAMIENTO DE LA  
LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

**(Para optar al título de Magíster en Ciencias Básicas Biomédicas- Énfasis en  
Neurociencias)**

**Presentado por**

**JAZMIN CELESTE CALVO ÁLVAREZ, BIÓLOGA**

**Tutor**

**CARLOS VÉLEZ PARDO, M.Sc. D.Sc.**

**Comité Tutorial**

**MARLENE JIMÉNEZ DEL RIO, M.Sc. D.Sc.**

**JUAN ÁLVARO LÓPEZ, M.Sc. D.Sc.**

**MIGUEL ÁNGEL MENDIVIL, M.Sc. D.Sc.**

**CORPORACIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA**

**MEDELLÍN – ANTIOQUIA**

**2020**

## CONTENIDO

**AGRADECIMIENTOS**

**PRESENTACION**

**RESUMEN**

**ABSTRACT**

**LISTA DE FIGURAS**

**LISTA DE TABLAS**

**CAPÍTULO 1: LEUCEMIA**

**1.1 Definición**

**1.2 Clasificación de la leucemia**

**1.3 Características biológicas de las células leucémicas**

**CAPÍTULO 2: LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA (LMC)**

2.1. Historia de la LMC

2.2. Definición

2.3. Importancia del estudio de la LMC

2.4. Epidemiología de la LMC en el Mundo y en Colombia

2.5. Etiología y fisiopatología de la LMC

2.6 Diagnóstico de la LMC

2.7. Tratamientos en la LMC

2.8. La Línea celular K562: **modelo de** estudio y nuevas terapias en LMC

**CAPÍTULO 3: EL ESTRÉS OXIDATIVO Y SU IMPACTO EN EL TRATAMIENTO DE LA LMC**

3.1. El estrés oxidativo (EO) y la LMC

3.1.1 Definición del EO

3.1.2 El EO en la fisiopatología de la LMC

3.2. El EO como estrategia antitumoral

3.3. El EO, los Mitocanes y la Mitocondria como blanco terapéutico en la LMC

## **CAPÍTULO 4: LA INDUCCIÓN DE APOPTOSIS COMO MÉTODO EFECTIVO PARA EL TRATAMIENTO DE LA LMC**

- 4.1. Definición de apoptosis
- 4.2. Vías de señalización de la apoptosis
  - 4.2.1. Vía extrínseca de la apoptosis
  - 4.2.2. Vía intrínseca de la apoptosis
- 4.3. La inhibición de la apoptosis en el desarrollo de LMC
- 4.4. Regulación del EO como mecanismo inductor de apoptosis en LMC
- 4.5. Principios activos emergentes con propiedades prooxidantes y pro-apoptóticas

## **CAPÍTULO 5: REPOSICIONAMIENTO DE MEDICAMENTOS EFECTIVOS COMO ALTERNATIVA FARMACÓLOGICA EN EL TRATAMIENTO DE LA LMC**

- 5.1. Reposicionamiento Farmacológico de los derivados de la Vitamina E en el tratamiento de la LMC
- 5.2. La Vitamina E y sus derivados en el tratamiento de la LMC
- 5.3. El D- $\alpha$ -tocoferol succinato (TPGS) en la terapia de la LMC

## **CAPÍTULO 6: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN**

- 6.1. Pregunta de investigación
- 6.2. Hipótesis
- 6.3. Objetivo general
- 6.4. Objetivos específicos

## **CAPÍTULO 7: DESARROLLO DE LOS OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN**

### **7.1. MATERIALES Y MÉTODOS.**

- 7.1.1. Cultivo de la línea celular K562 y reactivos
- 7.1.2. Análisis del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) utilizando citometría de Flujo
- 7.1.3. Evaluación morfológica de la muerte celular empleando microscopia de fluorescencia
- 7.1.4. Determinación de la fragmentación del ADN y análisis del ciclo celular por citometría de flujo
- 7.1.5. Evaluación de los niveles de peróxido de hidrógeno intracelular ( $H_2O_2$ ) utilizando citometría de flujo

7.1.6 Evaluación de la actividad antioxidante y farmacológica en células K562.

7.1.7. Evaluación de la oxidación del sensor de estrés oxidativo (DJ1-OX) y el marcador de muerte (CASPASA-3) empleando citometría de flujo

7.1.8. Evaluación de factores de transcripción y marcadores pro-apoptóticos utilizando Western blot

7.1.9. Análisis estadístico

## **7.2 RESULTADOS DE LA INVESTIAGACION.**

7.2.1. TPGS induce fragmentación del ADN y alteración del potencial de membrana mitocondrial

7.2.2. TPGS induce oxidación del DJ-1 mediada por el peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ).

7.2.3. El TPGS induce la activación de factores de transcripción, proteínas pro-apoptóticas y CASPASA 3 en K562

## **7.3. Discusión.**

## **CAPÍTULO 8: CONTRIBUCIONES Ó APORTES CIENTÍFICOS**

## **CAPÍTULO 9 CONCLUSIONES GENERALES**

## **CAPÍTULO 10: PERSPECTIVAS**

## **BIBLIOGRAFÍA**

## LISTA DE FIGURAS

### Figuras introductorias

**Figura 1.** Transformación multietapa de células madre leucémicas.

**Figura 2.** Esquema del cromosoma filadelfia.

**Figura 3.** Proteína BCR y sus funciones.

**Figura 4.** Diferenciación del linaje mieloide.

**Figura 5.** Fases de la LMC y sus hallazgos en muestras de sangre periférica y médula ósea evaluadas por microscopía

**Figura 6.** Mecanismos de acción del imatinib

**Figura 7.** Fotografías que muestran morfología y crecimiento de células en diferentes tiempos.

**Figura 8.** Fotografías y esquematización del proceso de muerte celular por apoptosis.

**Figura 9.** Esquema de las vías extrínseca e intrínseca de apoptosis y la comunicación entre las dos vías vía la proteína BID.

**Figura 10.** Mecanismos involucrados en a la evasión de la apoptosis.

**Figura 11.** Esquematización de los pasos y los esfuerzos para el descubrimiento clásico de fármacos (de novo) en comparación con el reposicionamiento farmacológico

**Figura 12.** Estructura química de compuestos-de la familia de la Vitamina E

**Figura 13.** Estructura química de la vitamina E (isoforma  $\alpha$ ) y principales derivados ( $\alpha$ -TOS) y dominios comprometidos en actividades biológicas

**Figura 14.** Estructura química del D- $\alpha$ -tocoferol polietilenglicol 1000 succinato (TPGS).

### Figuras resultados

**Figura 1.** EL TPGS induce pérdida de  $\Delta\Psi_m$  en K562 y fragmentación nuclear en células K562 de forma dependiente de la concentración.

**Figura 2.** El TPGS induce fragmentación nuclear y arresto del ciclo celular en fase S.

**Figura 3.** El TPGS induce la generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) en células K562, de forma dependiente de la concentración.

**Figura 4.** EL TPGS induce oxidación de la proteína DJ-1 y activación de CASPASA-3 células K562 de forma dependiente de la concentración.

**Figura 5.** El antioxidante NAC reduce la pérdida del  $\Delta\Psi_m$  inducido por TPGS en células K562.

**Figura 6.** EL TPGS aumenta la expresión de PUMA y c-JUN fosforilada en células K562.

**Figura 7.** El inhibidor selectivo de JNK (SP600125) reduce la pérdida del  $\Delta\Psi_m$  inducido por TPGS en células K562.

**Figura 8.** EL TPGS no afecta el ratio BAX/BCL-2 en células K562.

**Figura 9.** EL TPGS aumenta la expresión de caspasa 3 clivada en células K562.

**Figura 10.** El inhibidor selectivo de CASPASA-3 (NSCI) reduce la pérdida del  $\Delta\Psi_m$  inducido por TPGS en células K562.

**Figura 11.** Esquema del procesamiento que sufre el TPGS al entrar a la célula.

**Figura 12.** Esquema del sitio donde  $\alpha$ -TOS realiza su inhibición en la cadena transportadora de electrones.

**Figura 13.** Modelo esquemático de la apoptosis inducida por TPGS en K562

## LISTA DE TABLAS

**Tabla 1.** Anormalidades cromosómicas más importantes asociadas a diferentes tipos de leucemia según la OMS (Organización Mundial de la Salud)

**Tabla 2.** Indicadores diagnósticos para las fases (crónica, acelerada y blástica) de LMC.

**Tabla 3.** Inhibidores de la tirosina quinasa de 1era, 2da y 3era generación utilizados para el tratamiento de LMC.

**Tabla 4.** Criterios presentados por el proyecto ReDO para la selección de medicamentos con viabilidad de reposicionamiento farmacológico.

## AGRADECIMIENTOS

Inicialmente, me gustaría agradecer a mis tutores, Drs Carlos Vélez Pardo y Marlene Jiménez Del Rio, que decidieron darme la oportunidad de emprender este reto y darme grandes lecciones de disciplina y constancia, por el apoyo económico, la experiencia investigativa y todo el nuevo conocimiento impartido a través de los cursos, y al comité tutorial: Drs Juan Álvaro López y Miguel Mendívil, por las sugerencias, cuestionamientos, crecimiento y evolución que tuvo este proyecto bajo su tutoría.

A mi adorada familia, especialmente a mi madre por todo el apoyo físico, moral y psicológico, por el pilar que es en mi vida, a mi padre por apoyarme siempre y alentarme a realizar esta locura, al graduarse del pregrado uno siempre espera tener la oportunidad de trabajar y ahorrar, y luego te avientas al vacío, con una matrícula que pagar y el apoyo económico de una familia que solo quiere verte crecer. A mis hermanos por hacerme reír y distraerme cuando realmente lo necesitaba.

A mi pareja, Jonathan, por aguantar la falta de tiempo y los tremendos cambios de humor, porque nunca dudo que podría dar finalización a este proceso, y porque siempre estuvo para sostenerme y volverme a levantar cuando sentía que iba a desfallecer, y, sobre todo, para darme una visión realista, centrada y sin filtros, aunque doliera, era lo que necesitaba en muchas ocasiones para sacudirme y continuar en el camino.

A mis mejores amigas, Daniela y Chalarquita, porque me escucharon, me dieron la razón, me cuestionaron, me acompañaron y en general, fueron y siguen siendo las mejores amigas: Por los helados, los cafés, las papitas, las charlas filosóficas, las anécdotas, los aciertos y desaciertos. A mi mejor amigo, Abdul, por estar pendiente a pesar de la distancia que se dio entre nosotros durante este proceso de formación.

A las personas nuevas que trajeron este proceso: Dayana y Ana, por estar allí, escuchar y acompañarme en el proceso, por las risas, los almuerzos, y permitirme una distracción en mi ambiente laboral.

Por supuesto, darle un especial agradecimiento a mis compañeros, colegas y amigos del laboratorio, cada uno de ellos me ayudó y me permitió un gran crecimiento personal y científico: a Diani, eres un gran ejemplo de lucha y profesionalismo, te admiro profundamente, gracias por las conversaciones, por siempre verme como un igual, por la confianza y tu excelente actitud; Dani por sus enseñanzas en la técnica más desafiante que he aprendido hasta hoy, por las risas y por la compañía, a Vivi por sus consejos y por su característica alegría, a An por la escucha, el apoyo administrativo y la empatía ante las situaciones y por compartir conmigo con confianza y aguantar mis abrazos y ternura, a Migue por ser un mentor y guía fabuloso, que tuvo más fe en mis resultados que yo misma, por ser el ejemplo de investigador y profesional que quiero ser en el futuro. Y a la persona que más estuvo para mí sin importar tiempo u ocupaciones, la que soportó mi llanto, mis tristezas y celebró mis triunfos, riéndose de mis payasadas, escuchando mis desvaríos, enseñándome de aceptación, Cathe.

Gracias totales, mis amados, porque gracias a ustedes, soy un nuevo yo.

## PRESENTACIÓN

Una de los primeros cuestionamientos que posiblemente se haga el lector es ¿por qué investigar una terapia contra la leucemia en el grupo de Neurociencias? Este interrogante se abordó a lo largo del proceso de formación, esta presentación tiene como objetivo responder a esta inquietud.

En la actualidad, y en el área de investigación de Enfermedades Neurodegenerativas, Neuroquímica y Biología Molecular, del grupo de Neurociencias de Antioquia, la cual es coordinada por los doctores Carlos Vélez Pardo y Marlene Jiménez del Río es posible encontrar una conexión entre las enfermedades neurodegenerativas y el cáncer, lo que permite apreciar que no son tan distantes como se pensaba. Tres de los puntos que muestran que tienen conexión y mecanismos en común son : 1), el estrés oxidativo (EO), eje central como mediador de mecanismos moleculares de muerte neuronal en las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (EA) y la enfermedad de Parkinson (EP), efecto que se ve reducido al utilizar antioxidantes a concentraciones bajas (Jimenez-del-Río & Vélez-Pardo, 2015; Martínez-Pérez et al., 2018; Ortega-Arellano et al., 2019). Mientras que en el cáncer, aunque el EO se encuentra regulado, puede verse aumentado con el uso de las mismas moléculas antioxidantes o derivadas de estas, las cuales a altas concentraciones se convierten en prooxidantes, promisorios para una terapia anti-cáncer en modelos de leucemia, neuroblastoma y glioma (Bonilla-Porras et al., 2011; Bonilla-Porras et al., 2013; Ruiz-Moreno et al., 2016; Ruiz-Moreno et al., 2018; Soto-Mercado et al., 2020).

La segunda característica molecular que comparten las dos entidades clínicas es la alteración de genes y vías de señalización que coinciden con mecanismos moleculares de muerte celular similares, como la mutación en el gen del sensor de estrés oxidativo DJ-1 y del protooncogén Abelson (c-Abl), importante por su fusión con el BCR en la leucemia mieloide crónica (LMC). Asimismo, la quinasa Abl se ha relacionado con la EP y EA, siendo activada por el estrés oxidativo, involucrada en marcadores neuropatológicos relacionados con estas enfermedades: la hiperfosforilación de la proteína Tau en el caso de EA (Alvarez et al., 2004; Schlatterer et al., 2011) y la fosforilación de CDK5,  $\alpha$ -sinucleína y parkina en el caso de EP (Zhou et al., 2017), por lo tanto, se ha propuesto como blanco terapéutico tanto en cáncer como en neurodegenerativas.

La afectación de la quinasa c-Abl y desregulación de la fosforilación es un fenómeno compartido por las dos enfermedades (cáncer y neurodegenerativas), nos lleva a la última característica en común: La posibilidad de emplear las mismas moléculas en el tratamiento de



las dos entidades, o del re-uso de medicamentos utilizados en cada trastorno, estos fármacos pueden trasladarse como terapia alternativa entre las dos patologías. En este contexto, un ejemplo son los inhibidores del complejo gamma secretasa, que han sido utilizados para la EA, y que se han reposicionado con éxito en modelos *in vitro* e *in vivo* para el tratamiento de leucemia linfoblástica aguda (Okuhashi et al., 2010; Takam Kamga et al., 2019; Habets et al., 2019). Otro ejemplo interesante, es el uso de inhibidores tirosina quinasa, específicamente de c-Abl como el nilotinib, que se usa para el tratamiento de leucemia mieloide crónica, y que se re-utilizado como neuro protector en modelos de EP y EA (Lonskaya et al., 2014; Lindholm et al., 2016; Fowler et al., 2019)

## RESUMEN

La leucemia mieloide crónica (LMC) es un desorden mieloproliferativo caracterizado por la presencia del cromosoma filadelfia (Ph+) en el 90% de los casos diagnosticados. La leucemia constituye actualmente el 8,5% de mortalidad en Latinoamérica y el Caribe para ambos sexos, principalmente en población adulta; por otro lado, LMC corresponde a un 20% de los casos de leucemia en el mundo. El cromosoma filadelfia se presenta por la translocación recíproca entre el cromosoma 9 y el 22, conllevando a la expresión de una proteína de fusión BCR-ABL, que presenta función tirosina quinasa de forma constitutiva, que ocasiona la fosforilación de múltiples blancos celulares relacionados a tumorigenesis y progresión tumoral, afectando vías de supervivencia y proliferación celular, por lo que ha sido considerada un importante blanco terapéutico para el tratamiento de la LMC. Las tasas de respuesta a las diferentes aproximaciones terapéuticas disponibles actualmente (quimioterapia, radioterapia, trasplante de células madre) se han visto reducidas, entre un 15-20% de los pacientes presenta resistencia o intolerancia a este tipo de tratamientos, en especial para los tipos más agresivos o resistentes de LMC.

Son variadas las características que poseen las células cancerosas que les permiten mantener el fenotipo maligno, un ejemplo es la evasión de los mecanismos de muerte celular regulada (apoptosis) por diferentes estímulos que pueden inducir apoptosis en las células cancerosas, como cambios en el metabolismo redox; por esto, la regulación del estrés oxidativo (EO) surge como un mecanismo interesante para el tratamiento de la LMC. El EO es el desbalance entre la alta producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) provenientes del metabolismo celular y los mecanismos moleculares antioxidantes diseñados para degradar los EROs. Este fenómeno permitiría que mediante el uso de moléculas prooxidantes capaces de aumentar las EROs, se estimulen las vías de señalización encaminadas a la inducción de apoptosis, conduciendo a la muerte de las células cancerosas.

El desarrollo de nuevos medicamentos contra el cáncer como alternativas terapéuticas que subsanen la resistencia e intolerancia a los tratamientos convencionales requiere de una gran inversión de tiempo y presenta altos costos para la industria, en la cual solo 1 de cada 250 moléculas probadas es capaz de llegar a ensayos clínicos. El reposicionamiento se define como el proceso de encontrar nuevos usos fuera de la indicación médica original para fármacos existentes; esta estrategia se presenta como una excelente herramienta para ahorrar tiempo y abaratar costos. Por otro lado, el TPGS (D-  $\alpha$ -tocoferol polietilenglicol 1000 succinato) es una molécula anfipática, derivada de la vitamina E, que ha sido ampliamente estudiada y utilizada

para el nanoencapsulamiento de principios activos, aumentando su biodisponibilidad y mejorando la solubilidad de algunos compuestos lipofílicos, esta molécula ha mostrado en la última década potencial antitumoral.

A partir de esto, surge la pregunta ¿Podría el TPGS inducir apoptosis en células K562 y ser utilizado como una alternativa terapéutica para la leucemia mieloide crónica? Se propone entonces evaluar la capacidad del TPGS en la inducción de apoptosis en un modelo *in vitro* de leucemia mieloide crónica, como potencial agente terapéutico en el tratamiento de la LMC, utilizando marcadores de muerte celular a través de citometría de flujo, microscopía de fluorescencia y western blot. En este trabajo de investigación demostramos que el compuesto TPGS es capaz de eliminar las células leucémicas del modelo K562, empleado como modelo celular tumoral de las células de LMC. TPGS disminuyó el potencial de membrana mitocondrial de las células K562, comprometiendo la integridad de su membrana plasmática, indujo fragmentación del ADN de estas células, que se han reportado previamente como indicativos de muerte celular por apoptosis. Adicionalmente, en este trabajo se muestra que TPGS es capaz de inducir EROs ( $H_2O_2$ ) y oxidación de proteínas como DJ-1, cascada abajo se presenta la activación de factores de transcripción (c-JUN), proteínas pro-apoptóticas (PUMA) y la presencia de la forma activa de moléculas ejecutoras como CASPASA-3. Estos resultados sugieren que TPGS es una molécula promisorio para el tratamiento de LMC en pacientes que presentan resistencia o intolerancia a los inhibidores de tirosin quinasa (ITQ).

**Palabras claves:** Leucemia, Leucemia mieloide crónica, TPGS, K562, reposicionamiento, apoptosis, estrés oxidativo.

## ABSTRACT

Chronic myeloid leukemia (CML) is a myeloproliferative disorder characterized by the presence of the Philadelphia chromosome (Ph+) in 90% of diagnosed cases. Leukemia currently constitutes 8.5% of mortality in Latin America and the Caribbean for both sexes, mainly in the adult population; On the other hand, CML corresponds to 20% of leukemia cases worldwide. The Philadelphia chromosome is formed by the reciprocal translocation between chromosome 9 and 22, leading to the expression of a BCR-ABL fusion protein, which has constitutive tyrosine kinase function, which leads to phosphorylation of multiple cell targets related to tumorigenesis and tumor progression, affecting pathways of cell survival and proliferation, which is why it has been considered an important main therapeutic target for CML treatment. The response rates to the different therapeutic approaches currently available (chemotherapy, radiotherapy, stem cell transplantation) are diminished, between 15-20% of patients have resistance or intolerance to this type of treatment, especially for the most aggressive or resistant types of CML.

The characteristics of cancer cells that allow them to maintain the malignant phenotype are varied. Evasion of the mechanisms of regulated cell death (apoptosis) by different stimuli that can induce apoptosis in cancer cells like changes in redox metabolism, the regulation of oxidative stress (OS) arises as an interesting mechanism for the treatment of CML. OS is the imbalance between the high production of reactive oxygen species (ROS) from cellular metabolism and the antioxidant molecular mechanisms designed to degrade ROS. This phenomenon would allow signaling pathways to induce apoptosis to be stimulated through the use of pro-oxidant molecules capable of increasing ROS, leading to the death of cancer cells.

The development of new anticancer drugs as therapeutic alternatives that rectify resistance and intolerance to conventional treatments requires a great investment of time and presents high costs for the industry, in which only 1 in 250 tested molecules is capable of reaching to clinical trials. Repositioning the process of finding new uses outside the original medical indication for existing drugs, this strategy is presented as an excellent tool to save time and reduce costs.

TPGS (D-  $\alpha$ -tocopherol polyethylene glycol 1000 succinate) is an amphipathic molecule, derived from vitamin E, that has been extensively studied and used for nanoencapsulation of active ingredients, increasing its bioavailability and improving the solubility of some lipophilic compounds, this compound evidence an anti-tumoral activity in the last decade. Hence, we are asking: Could TPGS induce apoptosis in K562 cells and be used as a therapeutic alternative for chronic myeloid leukemia? The aim of this research is to evaluate the ability of TPGS in the induction of apoptosis as the potential therapeutic agent in the treatment of CML through a

model in vitro of chronic myeloid leukemia , also using cell death markers through flow cytometry, fluorescence microscopy and western blot. Interestingly, in this research work we demonstrate that the TPGS compound is capable of eliminating leukemic cells from model K562, used as a tumor cell model of CML cells. TPGS decreased the mitochondrial membrane potential of K562 cells, compromising the integrity of their plasma membrane, induced DNA fragmentation of these cells, which have been previously reported as indicative of cell death by apoptosis. Additionally, in this work it is shown that TPGS is capable of inducing ROS ( $H_2O_2$ ) and oxidation of proteins like DJ-1, the activation of transcription factors (c-JUN), pro- apoptotic (PUMA) and the presence of the active form of executing molecules such as caspase 3. These results suggest that TPGS is a promising molecule for the treatment of CML in patients who present resistance or intolerance to tyrosine kinase inhibitors (TKI).

**Keywords:** Leukemia, Chronic myeloid leukemia, TPGS, K562, repositioning of drugs, apoptosis, oxidative stress.

## **CAPÍTULO 1: LEUCEMIA**

### **1.1 Definición**

Es bien conocido que las células sanguíneas derivan de células progenitoras pluripotentes con la capacidad de renovarse constantemente y diferenciarse a linajes específicos (Groarke & Young, 2019). Esta capacidad es una función fisiológicamente importante para el recambio de las células del tejido sanguíneo: eritrocitos, linfocitos y células mieloides como el neutrófilo, basófilo y eosinófilo y se conoce como hematopoyesis. Cuando se genera una desregulación de la proliferación celular en estas células progenitoras, producto de la acumulación de diferentes mutaciones que afectan los mecanismos de control celular, puede aparecer las neoplasias hematopoyéticas, como la leucemia (Jan et al., 2017).

La leucemia es un tipo de desorden proliferativo que se origina en el tejido hematopoyético, comprende un grupo de enfermedades malignas, en las que se induce la proliferación descontrolada de progenitores en la médula ósea y la sangre (Zhang et al., 2012). El origen de la leucemia ha sido atribuido a diferentes causas incluyendo translocaciones cromosómicas y mutaciones en las células madre hematopoyéticas de linaje mieloides o linfoides (National Institute of Cancer, 2014; Qureshi & Hall, 2013). Posterior a la generación de las células anormales, estas se distribuyen a través del sistema circulatorio, proliferando e infiltrando tejidos como el hígado, bazo y nódulos linfáticos (Qureshi & Hall, 2013). Dependiendo de su malignidad, las células leucémicas pueden migrar a otros tejidos, como el cerebro, los huesos, entre otros, empeorando el pronóstico y dificultando el tratamiento de los pacientes (Deng & Zhang, 2010).

### **1.2. Clasificación de la leucemia**

Las leucemias se han clasificado de acuerdo con el linaje celular afectado y el tiempo de su evolución. De acuerdo con el linaje hematopoyético, las leucemias son clasificadas como linfoides o mieloides. Basado en su tiempo de evolución, son clasificadas como aguda, cuando se desarrolla en meses y crónica cuando evoluciona durante varios años. Se han identificado alteraciones genéticas características de diferentes tipos de leucemia (Arber et al. 2016, Bain, 2017), algunas de las cuales se resumen en la Tabla 1.

**Tabla 1. Anormalidades cromosómicas más importantes asociadas a diferentes tipos de leucemia según la OMS**  
(Organización Mundial de la Salud) (Construida a partir de Arber et al. 2016, Bain, 2017)

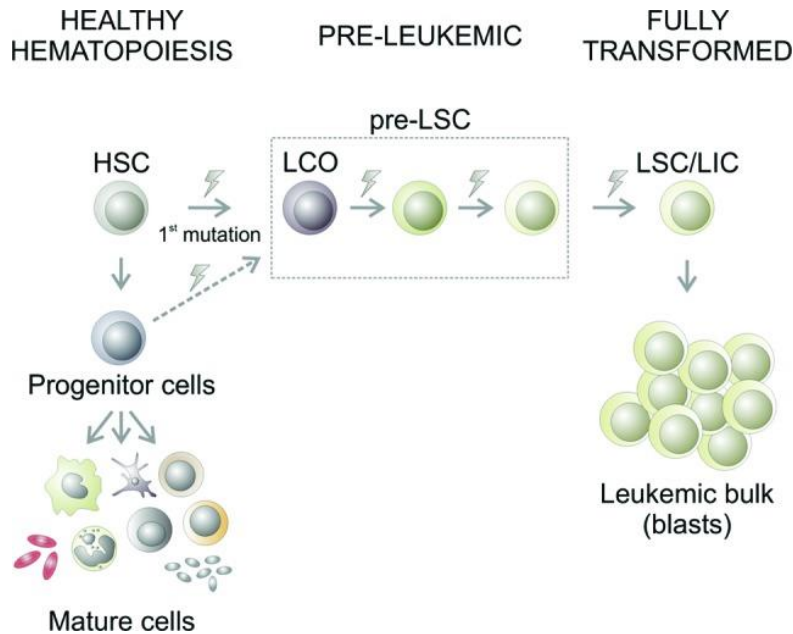
<b>Clasificación OMS</b>	<b>Anormalidades genéticas asociadas</b>
Leucemia Mieloide Aguda (LMA)	<i>RUNX1-RUNX1T1</i> [t (8;21) (q22; q22)] <i>CBFB-MYH11</i> [t (16;16) (p13.1; q22)]; inv. (16) (p13.1q22) <i>PML-RARA</i> [t (15;17) (q22; q12)] <i>KMT2A-MLL3</i> [t (9; 11) (p22; q23)]
Leucemia Mieloide Crónica (LMC)	<i>BCR-ABL 1</i> t (9;22) (q34;11.2)
Leucemia Neutrófila Crónica (LNC)	Mutaciones en <i>CSF3R</i> en el 90% de los casos
Leucemia eosinófila Crónica (LEC)	No se ha identificado una anomalía genética específica asociada
Leucemia Mielomonocítica Crónica (LMMC)	No se ha identificado una anomalía genética específica asociada
Leucemia Mieloide Crónica Atípica (LMCA)	Anormalidades cromosómicas +8 en más del 80% de los casos, común mutaciones en <i>PTPN11</i> en el 35% de los casos.
Leucemia Mielomonocítica Juvenil (LMMJ)	<i>NRAS</i> y <i>KRAS</i> ; <i>NFL1</i> ; <i>CBL</i>
Leucemia Linfoblástica de Células B (LL-B)	Arreglos clonales en genes <i>IGH</i> ; rearrreglos en <i>TCR</i> <i>BCR-ABL 1</i> [t (9;22) (q34;11.2)] Rearreglos en <i>KMT2A</i> [t v; 11q23] <i>ETV6-RUNX1</i> [t (12;21) (p13; q22)] Hiperdiploidías (Cromosomas 4, 14, 21 y X son los más comunes) e hipodiploidías. <i>IL3-IGH</i> [t (5;14) (q31; q32)] <i>TCF3-PBX1</i> [t (1;19) (q23; p 13.3)].
Leucemia Linfoblástica de Células T (LL-T)	Rearreglos de <i>TCR</i> y de genes <i>IGH</i>

Las leucemias con mayor incidencia son: leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mieloide aguda (LMA) Y leucemia mieloide crónica (LMC) (Swerdlow et al., 2017), lo que las posiciona como enfermedades hematológicas de gran importancia en salud pública en el mundo, convirtiéndose en uno de los focos de desarrollo diagnóstico y terapéutico

### 1.3. Características biológicas de las células leucémicas.

La hematopoyesis en individuos sanos está organizada jerárquicamente, iniciando con células multipotentes, y células madre quiescentes que tienen la capacidad de perpetuarse a través de la autorrenovación, generando progenie madura a través de la diferenciación. En pacientes con leucemia se ha demostrado que las células hematopoyéticas inmaduras surgen de la

acumulación de múltiples cambios genéticos y epigenéticos en las células madre (HSC) y progenitoras hematopoyéticas transformándolas, paso a paso a través de una serie de eventos transformadores que da lugar a las células madre preleucémicas (pre-LSC), cuyo origen inicia con las células de origen de la leucemia (LCO), que precede la formación de las células madre (LSC) completamente transformadas en leucémicas (Pandolfi et al., 2013) (Figura 1).



**Figura 1. Transformación multifacética de células madre leucémicas.** Durante una hematopoyesis saludable, HSC dan lugar a células progenitoras comprometidas con un linaje que posteriormente se diferenciarán a células maduras. La leucemia aparece a partir de células hematopoyéticas que han adquirido progresivamente modificaciones genéticas y/o epigenéticas, con capacidad de autorrenovarse (LSC), estas son las células que dan lugar a la enfermedad y permiten su progresión. (Tomado de Pandolfi et al., 2013)

Las células leucémicas mieloides provienen de progenitores celulares hematopoyéticos o estadios intermedios de la maduración de células como monocitos, eritrocitos, megacariocitos, entre otros tipos celulares. Un factor que se ha asociado a la aparición de la leucemia mieloide es la mutación que origina una transformación genética distintiva: una translocación recíproca entre el cromosoma 9 y el 22, formando un gen de fusión conocido como *BCR-ABL* (*BCR*: breakpoint cluster region protein y *ABL*: Abelson). Este a su vez produce una proteína anormal con acción tirosina-quinasa que se expresa de forma constitutiva y aberrante (González et al., 2016).

Dependiendo del sitio de ruptura en el gen *BCR*, se pueden formar tres tipos de *BCR-ABL* (proteína liviana, intermedia y pesada), dando lugar a expresión diferencial del gen y a la

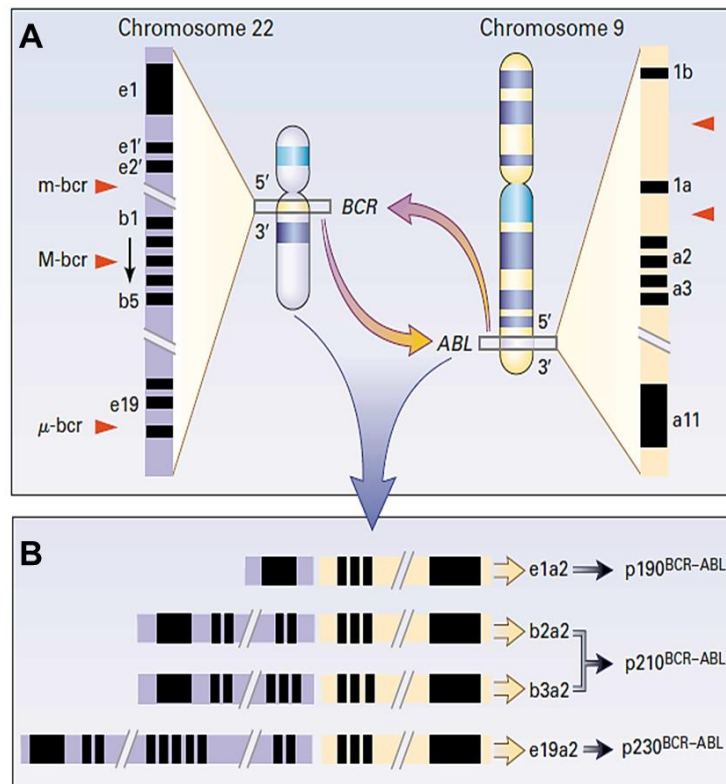


expansión de células diferenciadas más específicos (González et al., 2016). Este da lugar a un cromosoma 22 más corto, conocido como cromosoma filadelfia (Ph), el cual se encuentra en el 95% de los pacientes con leucemia mieloide crónica (Morales et al., 2010), 5% de los niños y entre un 15-30 % de los adultos con leucemia linfocítica aguda (Faderl et al., 1999a). La translocación añade al segmento 3' del gen *ABL* ubicado en el cromosoma 9q34 a la parte 5' del gen *BCR* ubicado en el cromosoma 22q11. El gen *ABL* codifica para una proteína con actividad tirosina-quinasa con un peso molecular de 145 kDa. El punto de quiebre en el gen *ABL* ocurre generalmente en el extremo 5' del exón 2, por lo que la región del exón 2 hasta el 11 se transloca a la región donde se ubica el *BCR* entre los exones 12 y 16 (Figura 2A). Estos transcritos dan lugar a la traducción de una proteína, generalmente de un peso molecular de 210 kDa; sin embargo, pueden ocurrir cortes alternativos, que dan lugar a tres isoformas de esta proteína híbrida (p-BCR-ABL de 190, 210 y 230 respectivamente). Estas isoformas de la proteína conducen a modificaciones en algunas de las características de las manifestaciones clínicas de los pacientes, en la respuesta a los tratamientos y en la prognosis de la enfermedad en los pacientes, estas variaciones se han asociado al tipo de isoforma que presenten, la proteína más pesada (p230) o la proteína más liviana (p190) (Faderl et al., 1999b) (Figura 2B).

En la proteína híbrida BCR-ABL se conservan los dominios funcionales que corresponden a los fragmentos de las proteínas que lo conforman; en la parte central de *ABL* se encuentra la región con actividad tirosina quinasa que contiene un sitio de auto fosforilación y en la *BCR* existe una tirosina en la posición 177; esto conlleva a que la función se presente de forma constitutiva promoviendo la transmisión de señales mediante la transmisión de un grupo fosfato del ATP que se une con las diferentes proteínas que le sirven de sustrato; entre las diferentes vías de señalización que se encuentran afectadas principalmente la vía de MAPK, involucrada en proliferación y supervivencia. Se ha evidenciado el rol de los transcritos BCR-ABL como mediadores centrales en la proliferación mieloide y en la transformación de células, se ha mostrado que estos transcritos causan una independencia de factores y crecimiento de la población de células leucémicas dentro de las líneas hematopoyéticas normales (Deininger et al., 2000; Swerdlow et al., 2017)

El segmento N-terminal de la proteína *ABL* incluye dos dominios de homología tipo SRC (SH2 y SH3) que regulan la función tirosina quinasa, un dominio catalítico y una secuencia que puede sufrir miristoilación que conecta la proteína *ABL* con la membrana plasmática. Las variaciones en los dominios reguladores, como SH2 puede disminuir la fosforilación y, por lo tanto, la capacidad funcional de la proteína; por otro lado, el dominio SH3 funciona como un regulador

negativo de la función quinasa, por lo que se ha reportado que las mutaciones de este dominio promueven la transformación de ABL. El extremo C-terminal de ABL contiene un dominio de unión al DNA, señales de localización nuclear y un sitio de unión a actina; esto muestra que ABL es capaz de activar genes cascada abajo de su activación. Entre las funciones de ABL se encuentra la polimerización de la actina, la activación de la transcripción, funciones proapoptóticas a través de la vía que involucra a Hippo, activación de la proteína Parkina, mostrando una gran variedad de sustratos (Wang J.Y., 2014)



**Figura 2. Esquema del cromosoma filadelfia.** (A) Representación gráfica de la translocación recíproca entre el cromosoma 9 y el 22, dando lugar al cromosoma filadelfia. (B) Representación esquemática de las diferentes formas RNA mensajero y las diferentes isoformas de la proteína de fusión BCR-ABL: p190, p210 y p230. Tomada de Faderl et al., 1999b

En la proteína de fusión, el dominio N-terminal posee un motivo que le permite a BCR aumentar su actividad tirosina-quinasa y permite la unión a actina de ABL. Además, el dominio serina-treonina quinasa de BCR activa vías de señalización mediadas por ABL y el transcrito p210. Por otro parte, el N terminal fusionado de BCR añade una larga cadena de aminoácidos al segmento SH2 de ABL, favoreciendo su actividad quinasa, por un lado, por otra parte, BCR interfiere con el dominio regulador SH3 de ABL, lo que hace que la proteína se encuentre constitutivamente activa. Se ha descrito que existe una interacción entre p210 y la proteína

RAS, involucrada en proliferación y diferenciación celular, con un papel central en la señalización que se da durante la patogénesis de la leucemia mieloide crónica (Deininger et al., 2000)

La proteína BCR-ABL se localiza en el citoplasma, unida a la F actina, microfilamentos o estructuras similares a vesículas. En cuanto a los sustratos que activa BCR-ABL, pueden ser las proteínas RAS y las relacionadas con su traducción, forma complejos con Crkl, las proteínas adaptadoras SH2/SH3, se une a Jak/Stat específicamente a Stat 5 y previene la apoptosis (Ren, 2005). Por otra parte, BCR-ABL puede inducir alteraciones en la adhesión celular, se une a la vía PI3K/Akt y activa la c-JUN. La capacidad transformadora de BCR-ABL posiblemente es mediada por vía Ras (Laurent et al., 2001) (Figura 3).

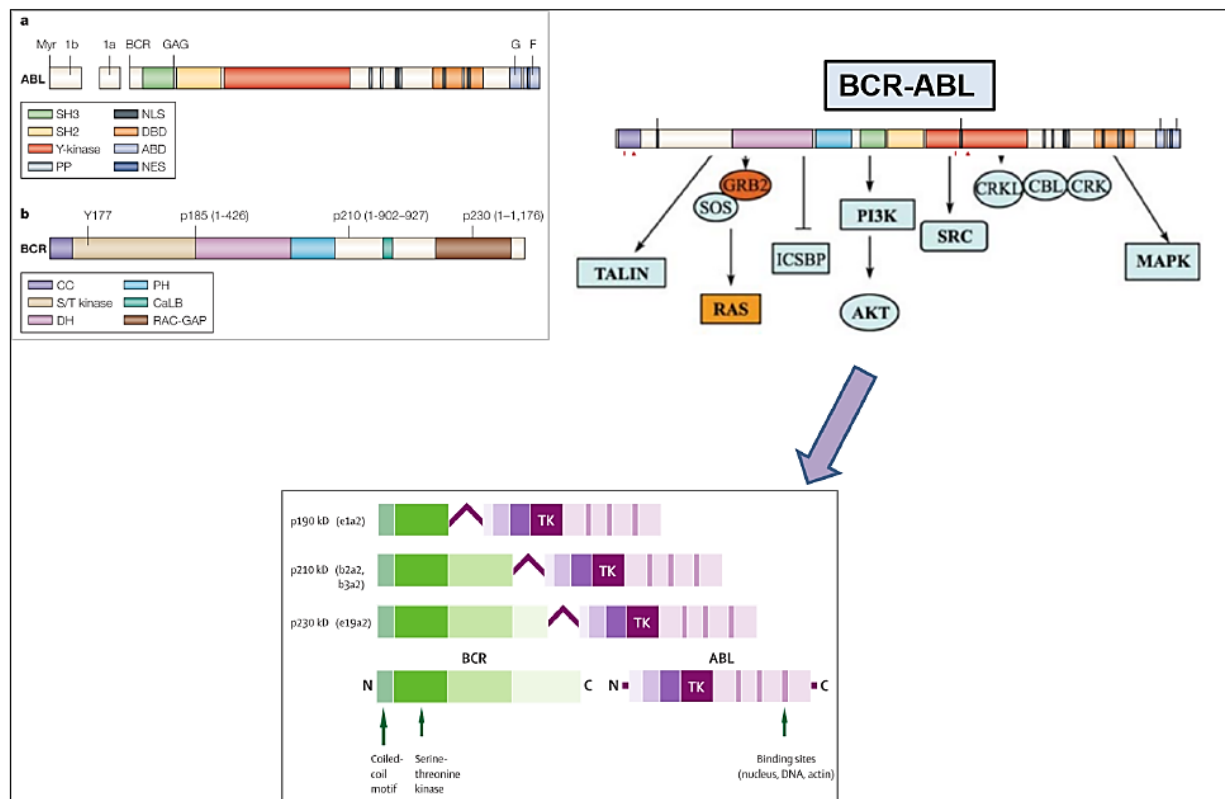


Figura 3. Estructura de la proteína BCR-ABL y sus funciones. Modificada a partir de Ren (2005).

Otras características moleculares de las células cancerosas son: evasión del sistema inmune, replicación sostenida, descontrolada e inmortal, promoción de la inflamación, inducción de angiogénesis, metástasis, inestabilidad genómica, invasión y metástasis y la resistencia a mecanismos de muerte celular regulada, entre ellos, a la apoptosis (Hanahan & Weinberg, 2011). La resistencia a la muerte celular implica varios mecanismos como modificar el balance

entre moléculas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas, aumentando la expresión de estas últimas. Específicamente, se incrementan proteínas inhibitoras de la apoptosis como proteínas de supervivencia (BCL-2 y otros miembros de esta familia), y la inhibición de genes supresores de tumor, como TP53. Adicionalmente, se producen daños en la señalización de receptores de muerte y reducción de la función de las caspasas (Wong, 2011).

Los mecanismos de evasión y resistencia de las células cancerosas se considera un importante blanco terapéutico para los diferentes tipos de leucemia, en este capítulo resaltamos la relevancia de la alteración molecular más importante en la leucemia mieloide crónica, el cromosoma filadelfia (Ph+) de gran interés para el desarrollo de este trabajo, sobre todo por su rol en supervivencia celular; demostrando que a pesar de la importancia de las alteraciones moleculares en cáncer anteriormente mencionadas, la estrategia antitumoral induciendo muerte celular por apoptosis es un blanco de investigación para el desarrollo de terapias alternativas.

## CAPÍTULO 2: LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA (LMC)

La leucemia mieloide se caracteriza por la proliferación de células precursoras del linaje hematopoyético mieloide temprano afectando la diferenciación a granulocitos que incluyen eosinófilos, basófilos y neutrófilos y otros tipos celulares como monocitos, eritrocitos, megacariocitos y plaquetas (Figura 4). Esta leucemia afecta principalmente la médula ósea (American Heritage Dictionary of the English Language, 2011).

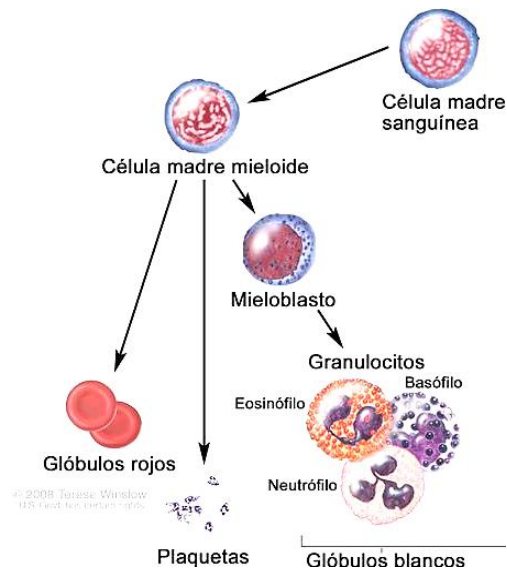


Figura 4. Diferenciación del linaje mieloide. Modificada de la referencia National Cancer Institute (NCI), 2008

### 2.1. Historia de la LMC

La leucemia mieloide crónica fue el primer tipo de leucemia que se reconoció, en el año 1841, David Craigie hizo observaciones de un paciente con fiebre, esplenomegalia y leucocitosis, pasados tres años, vio un paciente con síntomas similares y esto llevo a su colega, el patólogo John Hughes Bennett, a realizar una autopsia y describir los descubrimientos para el año 1845. Simultáneamente, Rudolph Virchow tuvo una aproximación con un paciente con sintomatología similar, del cual también se realizó una autopsia, cuyo reporte fue publicado cinco semanas después del que realizó Bennett. (Deininger, 2008; Goldman, 2010). Virchow presentó la visión de que la causa de esta enfermedad es una alteración primaria en la hematopoyesis. Posteriormente, Ernst Neumann en 1872 reconoció que la leucemia se originaba en la médula ósea. El siguiente paso importante no ocurrió sino hasta 1960, donde Petter Nowel y David Hugerford, describen una anomalía cromosómica en los pacientes de LMC, un cromosoma

22 de menor tamaño (Nowell, 2007) (cromosoma acrocéntrico) que inicialmente se pensó era producto de una deleción y se planteó como causal de la enfermedad (Druker, 2008).

El cromosoma Filadelfia (Ph<sup>+</sup>), fue la primera descripción de una anomalía cromosómica vinculada como causal de la enfermedad en las leucemias, posteriormente, Janet Rowley en 1973, identifica que el cromosoma 22 de menor tamaño es el producto de la translocación recíproca entre los brazos largos de los cromosomas 9 y 22t (9:22) (q34; q11) (Rowley, 1998). En 1970, Abelson y Rabstein describen el virus del linfosarcoma, un nuevo virus oncogénico murino aislado que induce tumores sólidos que no comprometen el timo (Abelson & Rabstein, 1970), posterior a este descubrimiento se describió el gen transformante *v-ABL* (Abelson murine leukemia virus) y la clonación de su homólogo celular normal *c-ABL* (Heisterkamp et al., 1982; Heisterkamp & Groffen, 2002; Hunter, 2007).

A continuación, se identificó que *c-ABL* normalmente reside en el cromosoma 9, se transloca al cromosoma 22 en los pacientes de LMC y que los puntos de corte en el cromosoma 22 se encuentran en clúster en una región relativamente pequeña denominada breakpoint clúster región o *BCR* (Heisterkamp & Groffen, 2002). Finalmente, se descubrió que el mRNA de *ABL* es más largo en los pacientes de LMC, permitiendo la descripción de la proteína BCR-ABL producto de la translocación y fusión de los genes (Druker, 2009; Heisterkamp & Groffen, 2002; Hunter, 2007).

## **2.2. Definición**

La leucemia mieloide crónica se define como un trastorno hematológico maligno mieloproliferativo, que forma parte de los desórdenes de las células madre hematopoyéticas de carácter clonal, caracterizados por la proliferación excesiva de granulocitos inmaduros de uno o más linajes mieloides.

En este tipo de leucemia, las células que circulan son estadios intermedios de la maduración o blastos de las células mieloides, que se pueden observar en sangre periférica y otros tejidos, incluyendo órganos como el bazo. En la presentación clínica de la forma crónica de la enfermedad se presentan diferentes grados de diferenciación, lo que la distingue de los tipos agudo. Las leucemias crónicas presentan características donde la progresión de la enfermedad es más lenta y en algunos casos asintomática; sin embargo, esto puede cambiar rápidamente a la versión aguda de la enfermedad, dificultando su adecuado tratamiento (American Cancer Society, s.f.). La LMC se clasifica en subtipos, dependiendo del progenitor celular que se

encuentre afectado como Leucemia crónica granulocítica, leucemia neutrofílica crónica, leucemia mielomonocítica crónica, y leucemia mieloide crónica atípica (Shepherd et al., 1987).

La leucemia mieloide crónica se origina en el progenitor mieloide común, donde surge la translocación t (9:22) (q34; q11), resultando en la fusión génica *BCR-ABL*, que codifica para una proteína quinasa constitutivamente activa. Sin embargo, se desconocen los mecanismos que inducen la translocación. La fusión de *BCR-ABL* es esencial para el inicio, mantenimiento y progresión de la LMC y la transformación de la fase crónica a la fase blástica, requiere de anormalidades genéticas y epigenéticas adicionales (Ren, 2005). La inestabilidad genética consecuencia de la translocación *BCR-ABL* puede ser responsable de las aberraciones cromosómicas o mutaciones adicionales, observadas en la crisis blástica.

La LMC presenta tres fases, según la progresión de la enfermedad, el reconocimiento de esta progresión es importante para el tratamiento y pronóstico, sin embargo, las características morfológicas entre las fases no siempre son claras, por lo que los parámetros para definir las suelen variar entre los investigadores (Swerdlow et al., 2017). Algunas de las características se describen a continuación: **fase crónica**, un período poco activo inicial que puede durar de meses a años, donde se muestran varios estadios de maduración de células mieloides. La **fase acelerada**, es bastante heterogénea entre los pacientes, donde se presenta fracaso terapéutico, empeoramiento de la anemia, evolución clonal (Spivak, 2017, Swerdlow et al., 2017). Finalmente, la **fase blástica**, donde se da acumulación de blastos en sitios extramedulares (p. ej., el hueso, SNC, los ganglios linfáticos, la piel), induciendo complicaciones fulminantes que se asemejan a las de la leucemia aguda, como sepsis y hemorragia (Spivak, 2017)

### 2.3 Importancia del estudio de la LMC

En la actualidad, LMC es el modelo molecular de leucemia mejor estudiado que ha aportado innumerables contribuciones a la biología celular molecular y a las alteraciones genéticas de las células cancerosas leucémicas. De hecho, La leucemia mieloide crónica fue la primera enfermedad maligna asociada con una lesión genética y constituye la primera forma de leucemia definida como una entidad distintiva.

La leucemia se encuentra entre los diez tipos de cáncer con mayor mortalidad en Colombia y el mundo (Bray et al., 2018; INC, 2017). De acuerdo a los estudios genéticos y epidemiológicos

descritos previamente, las neoplasias del sistema hematopoyético, principalmente la LMC, fueron pioneras en la incorporación de herramientas genéticas que contribuyeron a los algoritmos diagnósticos de la medicina (Swerdlow et al., 2017); esto último le da gran relevancia a los estudios que siguen imponiéndose como logro en la integración de aspectos morfológicos, clínicos y genéticos para la clasificación y diagnóstico, que a su vez ha sido utilizada como guía para el tratamiento (Goldman, 2003; Goldman & Melo, 2003). No obstante, se presentan entre un 20-30% de pacientes refractarios o resistentes al tratamiento convencional; esto puede deberse a que aún se desconocen aspectos importantes de la fisiopatología y etiología de la enfermedad, la variabilidad de respuesta entre los pacientes u otros aspectos genéticos más particulares inherentes a cada individuo (Hernández, 2001); además, la necesidad de desarrollo de nuevas terapias que den oportunidades de tratamiento a los pacientes intolerantes o que desarrollan resistencia por la presión selectiva del tratamiento convencional con inhibidores de tirosinquinasa (ITQ), cada vez se hace más imperiosa, lo que lleva a los investigadores a enfocarse en el desarrollo de estas estrategias terapéuticas, buscando moléculas promisorias para el tratamiento, posicionando este campo de investigación en la actualidad como uno de los más activos y con más desarrollos y desafíos de la actualidad.

Todo lo anterior, sumado a los aspectos epidemiológicos (incidencia y mortalidad) resaltan la importancia del estudio de los mecanismos de señalización de desarrollo de la enfermedad y la búsqueda de posibles alternativas terapéuticas.

#### **2.4. Epidemiología de la LMC en el Mundo y en Colombia**

Según el registro poblacional de datos de cáncer mundial, GLOBOCAN para el año 2018, la estimación de cifras de incidencia y mortalidad en leucemia para ambos sexos y en todos los grupos de edad fue de 2,5% y 2,3%, respectivamente (Castañeda-Rodríguez, 2016; INC, 2017). Este padecimiento afecta predominantemente hombres, y se espera que, con aumento de la esperanza de vida en las distintas regiones del mundo, se observe un incremento de la incidencia de la enfermedad (Leyto-Cruz, 2018).

La incidencia de la LMC en el mundo es de 1.9 casos por cada cien mil personas para ambos sexos por año en países occidentales, esta incidencia incrementa con la edad, con una media de diagnóstico de 65 años. La mortalidad es de 0.3 por cada cien mil habitantes para ambos sexos, por año (SEER, 2017). No se reportan variaciones significativas respecto a la etnia o la



ubicación geográfica de los individuos, no obstante, se ha reportado que hay aparición de la enfermedad a edades más tempranas en áreas de estrato socioeconómico bajo (Swerdlow et al., 2017). Afecta principalmente a los hombres, entre los 45 y 70 años, siendo más frecuente en caucásicos y no hispánicos (Swerdlow et al., 2017).

En los Estados Unidos, alrededor de 1 de cada 526 personas padecerá LMC en su vida, es decir, alrededor del 15% de todos los nuevos casos de leucemia son leucemia mieloide crónica. Este tipo de leucemia afecta principalmente a los adultos, raramente se observa en los niños. De acuerdo a la sociedad americana contra el cáncer para el año 2020, proyectan que aproximadamente 8,450 nuevos casos de LMC (4,970 hombres y 3,480 mujeres) serán diagnosticados y alrededor de 1,130 personas morirán a causa de LMC (670 hombres y 460 mujeres). Estas cifras tienden al aumento, ya que se ha mejorado la expectativa de vida de las personas con el paso del tiempo (American Cancer Society, 2018)

La prevalencia de LMC ha aumentado en el mundo por el uso de inhibidores tirosina quinasa. El porcentaje de sobrevivida a 5 años del diagnóstico es del aproximadamente 70,4%%, según datos del 2007-2013 (SEER, 2017).

En Colombia, para el año 2012, las leucemias se ubicaron en el quinto lugar de los tipos de cáncer, con tasas de incidencia y mortalidad ajustadas por edad de 5,8 y 4,1 por cada cien mil habitantes respectivamente; las neoplasias malignas son la tercera causa de muerte en hombres, y la segunda en mujeres, posicionando a la leucemia entre los primeros diez tipos de neoplasia más frecuente para ambos sexos, afectando principalmente personas entre los 15 y los 45 años (Colombia & Salud, 2014; Castañeda-Rodríguez, 2016; INC, 2017). En el 2013 se presentaron en Colombia 21 nuevos casos de LMC que representan el 7.3% del total de nuevos casos de cáncer hematológico y el 0.3% del total de cánceres en el país (Colombia & Salud, 2014). Interesantemente, en estudios moleculares de una población de pacientes de Antioquia, Colombia, el 93.6% presentaban el transcritto p210<sup>BCR-ABL</sup>, siendo la fusión genética b2a2 la más frecuente (Aya et al., 2014).

## **2.5. Etiología y fisiopatología de la LMC**

Las causas directas que inducen al desarrollo de la LMC se desconocen, sin embargo, se han asociado varios factores de riesgo exógenos y endógenos con la enfermedad, las mutaciones heredadas o predisposiciones congénitas podrían generar la perturbación genética necesaria

para el desarrollo de esta neoplasia mieloproliferativa, no obstante, actualmente se desconoce la proporción exacta de casos que se pueden atribuir a predisposición genética (Shallis et al., 2020)

Sin embargo, es más probable que la mayoría de los pacientes que desarrollan LMC sea por la adquisición esporádica de mutaciones, y no debido a heredar alguna anomalía genética o cromosomal, en el caso del cromosoma filadelfia (Ph+) se tiene información limitada de factores de riesgos que pueden llevar a su formación, además de ser del género masculino y el envejecimiento. Según la organización mundial de la salud (OMS), se ha evidenciado que la exposición aguda a radiación podría estar implicada en el aumento de la incidencia de LMC (Swerdlow et al., 2017); ). debido al incremento de casos de LMC en Japón, posterior a la bomba atómica de Hiroshima y Nagasaki (Hehlmann et al., 2007). También se ha descrito que algunas enfermedades autoinmunes que tienen un fuerte componente inflamatorio, como la polimialgia reumática son factores de riesgo para el desarrollo de LMC (Boddu & Zeidan, 2019; Shallis et al., 2020), no obstante, las terapias inmunosupresoras convencionales que se ofrecen a los pacientes podrían, de manera inadvertida, modular la supervivencia de las células de la médula ósea y permitir el desarrollo y expansión clonal de desórdenes mieloproliferativos presentes anteriormente, y de esta forma permitir el establecimiento de la enfermedad (Shallis et al., 2018).

El consumo de tabaco de forma activa y alta (mayor o igual a 20 cigarrillos al día) se ha reportado como un alto riesgo asociado al desarrollo de LMC. Algunos estudios han mostrado evidencia, aunque de forma limitada, de que las personas que dejan de consumir tabaco tienen una disminución del riesgo de desarrollo de LMC conforme aumenta el tiempo sin fumar (Musselman et al., 2013)

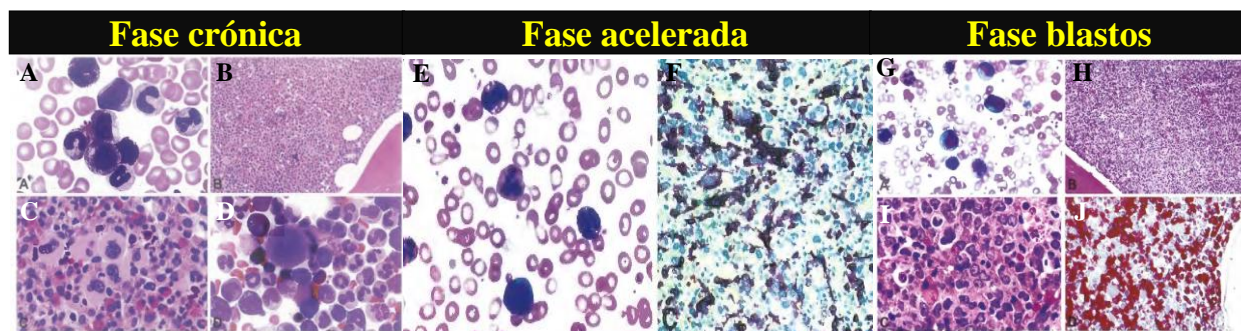
En general, la presentación clínica de la leucemia mieloide crónica presenta unos criterios básicos, tiene una gran variabilidad de paciente a paciente, lo cual depende de las características biológicas y genéticas de las células cancerosas y también de las particularidades farmacocinéticas y farmacodinámicas de respuesta que tenga cada paciente a los tratamientos. Esta es una característica que se presenta en la mayoría de cánceres y se considera uno de los mayores desafíos para la implementación de nuevos blancos terapéuticos y tratamientos alternativos (Shallis et al., 2020).

La presencia del Ph+ es capaz de evidenciarse a través de técnicas de citogenética, realizando el cariotipo del paciente y por técnicas con mayor sensibilidad y resolución como la hibridación

*in situ*. A partir de esta alteración, y de acuerdo con la evolución y el desarrollo de la progresión de la enfermedad, el primer evento que se puede observar es el aumento de células indiferenciadas (blastos) en la médula ósea y la visualización de células intermedias en los procesos de diferenciación, estos hallazgos hematológicos caracterizan la **fase crónica** de la enfermedad que en la mayoría de los casos es asintomática (Figura 5). Es en esta fase donde se-realizan la mayoría de los diagnósticos, ya que se pueden detectar las primeras alteraciones en un examen de sangre de rutina, que de acuerdo a sus resultados puede conducir a un procedimiento más específico como el aspirado de médula. Con estos procedimientos se pueden evidenciar fallas en los mecanismos que regulan y controlan la liberación de las células inmaduras, lo que permite que circulen células que no han terminado el proceso de madurez ni diferenciación celular (Swerdlow et al., 2017).

Después de esta fase se ha identificado, la existencia de un estadio intermedio conocida como **fase acelerada**, que no se presenta en todos los pacientes. De hecho, existe una gran controversia respecto a las características clínicas y citogenéticas de esta fase ya que la enfermedad se considera bifásica por diversos autores (Houshmand et al., 2019). A pesar de esto, la OMS la incluye como una posible fase de presentación intermedia (Figura 5).

Posteriormente, las células inmaduras o leucémicas pueden adquirir nuevas mutaciones, aumentando su adaptación, proliferación y resistencia, desplazan las células normales del nicho hematopoyético, hasta que en estadios avanzados de la enfermedad se puede observar células altamente indiferenciadas circulando en el torrente sanguíneo. Estas células leucémicas tienen gran capacidad invasiva, se les ha reportado tropismo hacia zonas como los ganglios linfáticos, el hígado y el bazo, que son los primeros órganos que se afectan, además de la médula ósea; esta fase es conocida como **fase de blastos**, y en su presentación clínica es similar a las leucemias agudas (Figura 5).



**Figura 5. Fases de la LMC y sus hallazgos en muestras de sangre periférica y médula ósea evaluadas por microscopía.** En la fase crónica: en el (A) extendido de sangre periférica se observa leucocitosis y células neutrofilicas en varios estadios de maduración y en la (B). biopsia de médula ósea se muestra hiperplasia granulocítica debido a la proliferación granulocítica; también se

observan (C) megacariocitos más pequeños que los normales, característicos de LMC y en un (D). extendido de médula ósea en donde se evidencia neutrófilos maduros, aumento de basófilos y megacariocitos “enanos”. En la fase acelerada: en el (E) extendido de sangre periférica se observan blastos ocasionales, y un incremento de blastos CD34+ (marcaje azul). En (F) se observa una biopsia de médula ósea. En la Fase blástica: en el (G) extendido de sangre periférica, la mayoría de las células blancas presentes son blastos; en (H y I) se observa biopsias de médula ósea con gran cantidad de blastos y en el (J) muestra que los blastos provienen del linaje mieloide con un marcaje de mieloperoxidasa (MOP). Modificada de Swerdlow et al., 2017

## 2.6 Diagnóstico de la LMC

El diagnóstico de la LMC en el 85% de los casos se realiza durante la fase crónica de la enfermedad, y alrededor del 50% de estos tienen diagnóstico accidental (Moreno, 2009). Al realizarle el examen físico a los pacientes, en el 50% puede encontrarse el tamaño del bazo aumentado, también conocido como esplenomegalia. Al solicitar un análisis de sangre, se evidencia una leucocitosis; estas son los primeros signos de sospecha de LMC. A continuación, un hematólogo diagnostica la enfermedad a través del análisis de pruebas como el hemograma, estudio de médula y análisis bioquímicos, (Asociación Española de Afectados por Linfoma, Mieloma y Leucemia, por sus siglas, AEAL, s.f.) Otros síntomas asociados a la presentación de la enfermedad incluyen fatiga, malestar, pérdida de peso, sudoración nocturna y anemia (Spivak, 2017). Algunos de los indicadores diagnósticos utilizados para cada una de las fases de LMC se resumen en la Tabla 2.

Uno de los principales desafíos que enfrenta hoy el diagnóstico temprano de los pacientes con la leucemia mieloide crónica es encontrar un ensayo simple, rápido, sensible y específico que facilite los tratamientos tempranos en la clínica. El diagnóstico se puede basar en características de los recuentos sanguíneos, confirmándose con el uso de FISH (Fluorescence *in situ* hybridization, por sus siglas en inglés), cariotipo o transcritos para identificar el cromosoma filadelfia (Ph+) en muestras de médula ósea o sangre a través de una reacción de la cadena de polimerasa reversa en tiempo real (RT-qPCR) (Geng et al., 2020). No obstante, la baja sensibilidad cuando se realizan acercamientos por medio de la citogenética, y los costos, tiempo de detección y probabilidad de falsos positivos en el caso de HFIS y RT-qPCR muestran que los métodos diagnósticos requieren de actualización y desarrollo de nuevas estrategias más efectivas y eficientes para mejorar el diagnóstico temprano de la enfermedad, brindando mayores y mejores oportunidades de tratamiento a los pacientes (Geng et al., 2020).

**Tabla 2. Indicadores diagnósticos para las fases (crónica, acelerada y blástica) de LMC.** Construida a partir de Swerdlow et al., 2017

Fase de la enfermedad	Expectativa de vida	Indicadores para el diagnóstico
<b>Crónica</b>	3-5 años	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Leucocitosis (<math>12-1000 \times 10^9/L</math>, mediana <math>\sim 80 \times 10^9/L</math>).</li> <li>- Trombocitosis.</li> <li>- Conteo de blastos <math>&lt;5\%</math> en médula ósea.</li> <li>- Médula ósea hiper celular, con proliferación granulocítica marcada y patrón de maduración similar al observado en sangre, incluido la expansión de mielocitos.</li> <li>- La proporción entre precursores eritroides esta significativamente disminuido, megacariocitos pequeños y con núcleo hiposegmentado.</li> <li>- Aumento de número de eosinófilos y basófilos.</li> <li>- Esplenomegalia en un 30-40% de las biopsias durante el diagnóstico</li> </ul>
<b>Acelerada</b>	1-2 años	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Persistencia o aumento del conteo de leucocitos (<math>&gt;10 \times 10^9/L</math>), - Persistencia o aumento de la esplenomegalia</li> <li>- Persistencia de trombocitosis (<math>&gt;1000 \times 10^9/L</math>) y trombocitopenia (<math>&lt;100 \times 10^9/L</math>).</li> <li>Todas las características anteriores no presentan respuesta a la terapia, cuando esta se administra durante la progresión de la enfermedad.</li> <li>- Conteo de blastos entre 10-19% en sangre periférica y médula ósea.</li> <li>- Anormalidades cromosómicas clonales adicionales al cromosoma filadelfia (Ph+).</li> <li>- Resistencia hematológica, fallo para alcanzar una respuesta hematológica completa, indicadores moleculares, hematológicos o moleculares de resistencia y/o ocurrencia de dos o más mutaciones en el gen <i>BCR-ABL</i> durante la terapia.</li> </ul>
<b>Blástica</b>	Meses	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Conteo <math>&gt;20\%</math> de blastos en sangre periférica y médula ósea, la mayoría de los blastos son mieloides, pero en un 20-30% se presentan blastos linfoides (generalmente de células B, con menor frecuencia de células T y células natural killer NK).</li> <li>- Proliferación de blastos, principalmente en piel, nódulos linfáticos, hueso y sistema nervioso central.</li> <li>- Expresión heterogénea de antígenos de más de un linaje (CD34, CD33, CD13, CD14, CD11b, CD11c, KIT (CD117), CD15, CD41, CD61 y glicoforina A y C), también pueden expresar antígenos de linaje linfóide (CD19, CD10, CD79a, PAX5 y CD20)</li> <li>- En esta fase se presenta alta resistencia al tratamiento, además, se ha presentado evidencia de que la terapia con ITQ en esta fase puede generar tipos poco usuales de blastos, empeorando el pronóstico del paciente.</li> </ul>

## 2.7 Tratamientos en la LMC

El tratamiento para los pacientes que padecen LMC depende de la fase de la enfermedad en la que son diagnosticados (crónica, acelerada o blástica), por mucho tiempo el trasplante alogénico se consideró el único tratamiento disponible para tratar y curar la LMC (Mahon, 2017), debido a que los pacientes que habían sido trasplantados se mantenían libres de anormalidades citogenéticas y hematológicas asociadas a la enfermedad, sin necesidad de mantener una terapia; posteriormente, se evidenció que la mayoría de los pacientes estaban aparentemente curados a pesar de no haber erradicado completamente las células leucémicas (van Rhee et al., 1997; Pavlu et al., 2011). Para los pacientes que no podían recibir un trasplante alogénico, se administraba un régimen basado en interferón alfa (IFN- $\alpha$ ) y quimioterapia paliativa como hidroxiurea (Mahon et al., 1998). Con el descubrimiento y el uso de los inhibidores de tirosina quinasa (Tyrosine kinase inhibitor, TKI por sus siglas en inglés) se logró reducir los índices de mortalidad en un 2-3% de la LMC (Swerdlow et al., 2017). De hecho, el primer inhibidor de la tirosina quinasa (ITQ), el imatinib, aprobado en 2001 en Europa y Estados Unidos para todas las fases de LMC, cambió completamente la expectativa de vida de los pacientes (Druker et al., 2001) y en la actualidad está disponible como medicamento genérico (European Medicines Agency, 2019).

Los ITQ como su nombre lo indica, se encargan de inhibir específicamente proteínas y receptores que tienen como función la modificación de sustratos mediante la fosforilación. La transmisión del grupo fosfato teniendo como sustrato el ATP y otras proteínas de interés tiene diferentes funciones y blancos en la célula, una de las vías que está basada casi exclusivamente en esta modificación es la vía de las MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase), en la cual diferentes enzimas que guardan una jerarquía van fosforilándose de forma consecutiva hasta que se llega a la activación de factores de transcripción que pueden activar genes involucrados en supervivencia, migración y muerte celular (Faderl et al., 1999b; Deininger et al., 2000; Álvarez et al., 2007). Este ejemplo resalta la importancia de las proteínas tirosina quinasa en todo el sistema biológico, en la LMC principalmente, como se describió en el apartado anterior, existe una proteína con acción quinasa que se encuentra constitutivamente activa, BCR-ABL, y es esta proteína la que se ha vuelto blanco terapéutico de los diferentes medicamentos inhibidores que describimos en este apartado. En la Tabla 3 se destacan algunos de los medicamentos, su blanco y su uso (Miller et al., 2013).

**Tabla 3. Inhibidores de la tirosina quinasa de 1era, 2da y 3era generación utilizados para el tratamiento de LMC.** Modificada de Miller et al., 2013 y Vener et al., 2020.

Inhibidor	Nombre comercial	Generación	Blanco celular	Fase	Tipo de cáncer
Imatinib mesilato	Gleevec	Primera	ABL, c-KIT, PDGFR	CP, AP, BP	LMC Ph <sup>+</sup> , TEGI, LLA
Dasatinib	Sprycel	Segunda	SFK, ABL	CP, AP	LMC, LLA
Nilotinib	Tasigna	Segunda	ABL	CP, AP	LMC
Bosutinib	Bosulif	Segunda	SFK, ABL	CP, AP, BP.	LMC
Ponatinib	Iclusing; ARIAD	Tercera	SRC, ABL, FGFR, PDGFR, VEGFR, ABL-T135I	CP, AP, BP	LMC, LLA

**Abreviaciones:** ABL: quinasa Abelson; PDGFR: Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas; SFK: Quinasas de la familia Src; VEGFR: receptor del factor de crecimiento vascular endotelial; LMC Ph<sup>+</sup>: Leucemia mieloide crónica positiva para cromosoma Filadelfia; TEGI: Tumor estromal gastrointestinal; LLA: Leucemia linfoblástica aguda; CP: Fase crónica; AP: Fase acelerada; BP: Fase blástica. ABL-T135I: Mutación en ABL cambiando una treonina en la posición 135 por una isoleucina (Miiller et al., 2013; Vener et al., 2020)

El imatinib es considerado como uno de los fármacos más relevantes en el tratamiento de la LMC y de otros tipos de cáncer, marcando un precedente en el desarrollo de medicamentos para la quimioterapia. El imatinib fue desarrollado a finales de la década de los noventa por el químico Nicholas B. Lydon, el oncólogo Brian J. Druker y Charles L. Sawyers (Álvarez et al., 2007), los cuales iniciaron los ensayos clínicos confirmando su eficacia contra la leucemia mieloide crónica. Su desarrollo es un ejemplo de diseño racional de medicamentos (Álvarez et al., 2007). Poco después de la identificación del BCR-ABL como blanco de tratamiento farmacológico, se inició la búsqueda de un inhibidor. Con este objetivo en mente, los químicos usaron un método de screening de archivos de compuestos químicos, que les permitió identificar la molécula 2-fenilaminopirimidina (Druker & Lydon, 2000). Este fue el compuesto inicial que fue probado y modificado con la introducción de los grupos metilo y benzamida que le proporcionó el incremento en su capacidad de adherencia al imatinib, que funciona como un inhibidor específico de una cantidad de enzimas tirosina quinasa y que puede ser administrado de forma oral (Druker & Lydon, 2000). El imatinib es actualmente comercializado por Novartis bajo el nombre de Gleevec (EE. UU.) o de Glivec (Europa/Australia) o como su sal denominado mesilato de imatinib (Álvarez et al., 2007). El medicamento bloquea la proliferación e induce la apoptosis de las células de LMC y leucemia linfoblástica aguda que expresan BCR-ABL (Beran

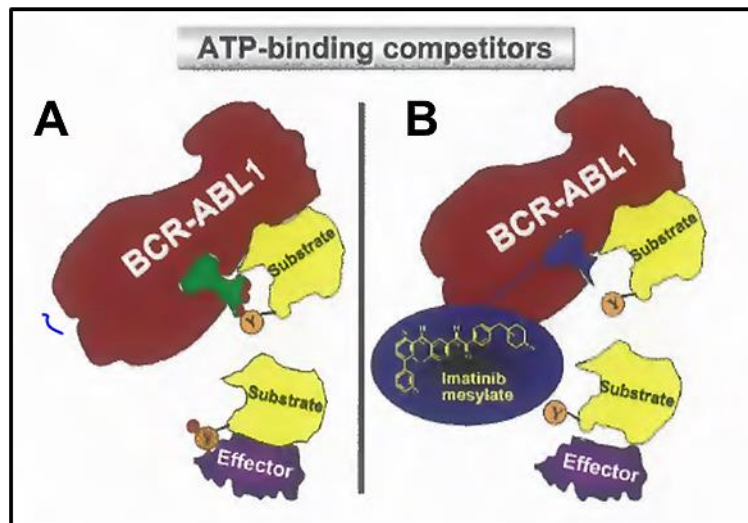
et al., 1998). Se ha demostrado que el mecanismo de acción del imatinib está asociado a su unión a la forma inactiva de la quinasa ABL, inhibiendo de forma competitiva la unión del ATP a la proteína de fusión BCR-ABL (Druker et al., 1996) (Figura 6). Su principal efecto es el bloqueo de la autofosforilación de esta proteína, que impide su acción de quinasa y la inducción de la transducción de señales de proliferación celular. Sin embargo, también tiene efectos secundarios que son mínimos, como las náuseas, mialgias, edemas y diarrea. En un estudio realizado con pacientes intolerantes a la terapia con interferón alfa en las etapas tardías durante la fase crónica con LMC en el 2002, mostró que el 95% de los pacientes que recibieron imatinib mostraron respuesta y aproximadamente el 89% de los pacientes no progresaron a fase acelerada o blástica durante los 18 meses posterior al tratamiento (Druker et al., 2001). Estudios posteriores, mostraron que la respuesta mejora cuando se realiza un tratamiento continuo del imatinib y un monitoreo de la enfermedad mínima residual, mejorando las tasas de supervivencia de los pacientes (Cervantes et al., 2003; O'Brien et al., 2003; Druker et al., 2006).

A pesar de la eficacia del imatinib en el tratamiento contra la LMC, se ha demostrado que algunos pacientes presentan resistencia al este fármaco. Esta resistencia, se ha propuesto puede ser debido a la sobreexpresión de la proteína de fusión BCR-ABL, a las mutaciones en el dominio quinasa de esta proteína, a las variaciones genéticas o alteraciones en la expresión de los genes transportadores de medicamentos. De los mecanismos descritos que confieren resistencia al imatinib, se ha estudiado muy bien una mutación en el dominio quinasa de la proteína de fusión (T315I) como uno de los mecanismos más comunes (Ammar et al. 2020).

Estas observaciones se han confirmado *in vivo* en una amplia cantidad de pacientes que muestran una enfermedad residual persistente tras un periodo de cese de terapia con ITQ (Hughes et al., 2010). Actualmente, se conoce que aproximadamente en un 20%-30% de los pacientes con LMC no responden a la terapia con imatinib o experimentan una recaída tras mostrar una respuesta al inicio del tratamiento (Miller et al., 2014). Aproximadamente en el 50% de los casos que se presenta resistencia al imatinib en la fase crónica, los pacientes adquieren cambios de aminoácidos de forma recurrente en BCR-ABL, debido a la presión selectiva por administración de la terapia con ITQ (Nicolini et al., 2013). Otro mecanismo que ha demostrado inducir modificaciones en BCR-ABL, es el estrés oxidativo; ya que las cisteínas presentes en la oncoproteína son sensibles a la oxidación y cuando se encuentran en presencia de EROs pueden darse cambios conformacionales de la estructura tridimensional del dominio quinasa de la proteína ABL que conducen a la resistencia al tratamiento con imatinib (Zhang et al., 2008)



En estudios *in vitro* con células de pacientes se ha podido comprobar que las células madre de LMC permanecen en estado quiescente viables, convirtiéndose en un reservorio para eventos oncogénicos adicionales, lo que se puede ocasionar una recaída en la enfermedad después de la terapia prolongada (Yang & Fu, 2015). Por lo tanto, se hace necesario más estudios en modelos *in vitro* que permitan dilucidar los mecanismos de resistencia a la muerte de las células leucémicas y que permitan, adicionalmente, identificar nuevas alternativas terapéuticas.



**Figura 6. Mecanismos de acción del imatinib.** Fisiológicamente, (A) el ATP se une al bolsillo de la proteína BCR-ABL que le permite fosforilar residuos selectivos de tirosina del sustrato. (B) El mesilato de imatinib, agente mimético sintético similar al ATP, encaja en el bolsillo de unión del ATP, sin proveer del grupo fosfato necesario para cumplir su función de quinasa de esta forma, los eventos cascada abajo de la activación del sustrato son bloqueados. Tomada de Swerdlow et al., 2017

El desarrollo de inhibidores de segunda generación como el nilotinib, dasatinib y bosutinib (Vener et al., 2020) obedece a la necesidad que se presentó al evidenciar la respuesta de pacientes intolerantes o que desarrollaban resistencia al imatinib a través de mutaciones, como la T315I (Ammar et al., 2020). El nilotinib se une de manera similar al imatinib, con mejor reconocimiento de BCR-ABL normal o mutada. El dasatinib se une a BCR-ABL activa. El bosutinib también inhibe SRC y a la forma activa de ABL (Vener et al., 2020). A continuación, se desarrollaron los ITQ de tercera generación como ponatinib que inhibe la mutación T315I, desafortunadamente también inhibe una amplia gama de quinastas y es poco tolerada por los pacientes (Gray & Fabbro, 2014, Deininger et al., 2016). En Colombia, un estudio demostró que una alta proporción de pacientes requieren cambiar a los ITQ de segunda línea nilotinib y dasatinib (Machado-Alba & Machado-Duque, 2017).

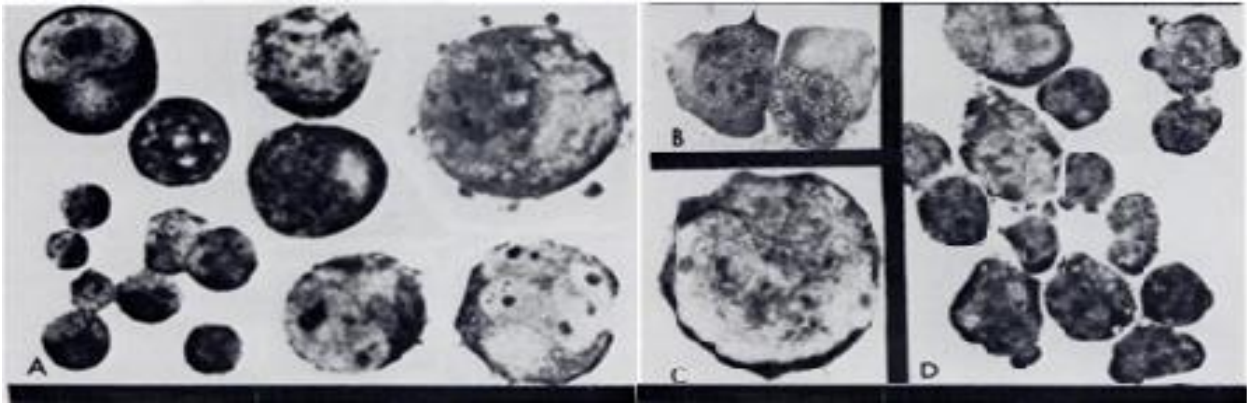
Los mecanismos moleculares de resistencia en LMC estimulan diferentes vías de señalización, como PI3K/AKT/mTOR, RAS/RAF/MAP quinasa, JAK/STAT, Hedgehog, WNT/ $\beta$  (Ahmed & Van Etten, 2013; Yaghmaie & Yeung, 2019), adicionalmente se ha descrito JNK y NF- $\kappa$ B, induciendo proliferación y bloqueando la apoptosis (Al Baghdadi et al., 2012), siendo estas vías de señalización, posibles blancos terapéuticos en las células resistentes (Bhatia, 2017).

## **2.8. La Línea celular K562: modelo de estudio en LMC**

El primer reporte realizado sobre la obtención de la línea celular K562, fue por Lozzio & Lozzio en 1975, quienes describiendo que la línea celular se derivó de células leucémicas aisladas a finales de 1970 de una efusión pleural de un paciente de sexo femenino de 53 años que padeció de una leucemia mieloide crónica desde el año 1964. La paciente se encontraba bajo tratamiento, se identificó en muestras de sangre periférica positividad para el cromosoma filadelfia (Ph+), lo cual llevó a una intervención quirúrgica de remoción del bazo. A partir de este evento, la paciente sufrió una crisis de blastos, acumulándose las células altamente indiferenciadas en tumores en diversos tejidos de su cuerpo, provocándole la muerte luego de una efusión pleural. La agresividad de las células infiltradas sugirió una marcada alteración genética, comprobada durante estudios citogenéticos realizados por los mismos investigadores que describieron la línea celular K562 (Lozzio & Lozzio, 1975). Curiosamente, esta línea celular K562 no necesitó de estímulos ni modificaciones para su immortalización, se estableció directamente a partir del fluido pleural de la paciente, sin periodo de latencia (Lozzio & Lozzio, 1975). Esta fue la primera línea celular estudiada que se describe con presencia del cromosoma filadelfia, lo que permitió la realización de estudios en este modelo *in vitro* que no había sido posible hasta 1980 (Koeffler y Golde, 1980), esto caracteriza la línea como un modelo ampliamente utilizado y conocido que aún se mantiene vigente

Las K562 son células con morfología similar a blastos, altamente indiferenciadas, con tamaños heterogéneos y positivas para el cromosoma filadelfia, con una gran capacidad proliferativa (tiempo de doblaje poblacional de 18-24 horas aproximadamente) (Figura 7). La capacidad proliferativa y estabilidad cromosomal de esta línea celular puede variar dependiendo del pase en el que se encuentren estas células en cultivo. Se ha demostrado que se debe utilizar pases inferiores al 30 para evitar la variabilidad en el cariotipo, que puede contribuir a que varíen las características de la línea celular y los resultados experimentales de un laboratorio a otro (Lozzio & Lozzio, 1975). Las células K562 crecen en suspensión y presentan la fusión BCR-

ABL, así como mutaciones en el gen *CDKN2A* en condición homocigota y *TP53* (ATCC, s.f.). Estas células expresan proteínas reguladoras del complemento como CD59, CD55 y CD46 asociadas a la membrana, secretan factores solubles y expresan ectoproteasas (Meshkini & Yazdanparast, 2012).



**Figura 7. Fotografías de morfología y crecimiento en diferentes intervalos de tiempo de las células K562.** (A). Fotografía compuesta donde se muestra el crecimiento de las células durante 7 días de cultivo. (B-D). Células de LMC creciendo en agar semisólido en un periodo de 15 días. Se logra apreciar que las células pueden crecer en diferentes tamaños, su morfología es similar, con un núcleo grande basófilo. Modificada de Lozzio & Lozzio (1975).

Respecto a la mutación que poseen estas células en la proteína TP53, que la mantiene inactiva, se presenta por una adición de una citocina en la posición 136 de la proteína, que modifica el marco de lectura, conduciendo a la aparición de un codón de parada prematuro en la posición 148, dando lugar a una proteína truncada que no es funcional (Law et al., 1993). Adicionalmente, estas células al ser inmaduras, puede inducirse la diferenciación a diferentes tipos celulares dentro del linaje mieloide como eritrocitos, granulocitos y macrófagos, entre otros (Kang et al., 1996; Nurhayati et al., 2014; Yu et al., 2014;). Todas estas características convierten esta línea celular en un modelo *in vitro* excelente para el estudio de blancos terapéuticos para la evaluación preclínica de moléculas promisorias para la LMC

Las células K562 han permitido el estudio de las vías de señalización moduladas por BCR-ABL y su inhibición. Por ejemplo, se ha probado que es necesario que BCR-ABL interactúe en el citoplasma para ejercer todas sus funciones leucemogénicas (Dixon et al., 2009), así como que el gen *MS2* (Musashi-2) modula la proliferación y apoptosis en esta línea celular a través de la activación de MAPK vía ERKMAPK-p38 convirtiéndolo en un blanco terapéutico (Zhang et al., 2014). En las células K562 se ha caracterizado el efecto de compuestos pro-apoptóticos que

inducen arresto en ciclo celular G2/M, fragmentación del ADN, activación de vías de reparación ATM/ATR; así como se ha reportado un aumento en la expresión de P73 en esta línea celular que carece de TP53 funcional y Apaf-1 (Guo et al., 2014; Martinez-Castillo et al., 2016). Otro de los usos experimentales de esta línea celular son la evaluación de genes de resistencia a fármacos, nuevas terapias ante la resistencia y como modelo para la inducción de leucemia en ratones desnudos (Gao et al., 2006; Zhao et al., 2017). A su vez, el modelo celular K562 se ha usado para la evaluación de fármacos antioxidantes, por ejemplo, la administración resveratrol o una manganasa mitocondrial recientemente formulada que contiene superóxido dismutasa en combinación con dasatinib y nilotinib, para evaluar su efecto sobre la producción de EROs e inducción de apoptosis (Damiano et al., 2018). Otro ejemplo es el uso de vitamina E para el restablecimiento de los niveles de RNA mensajero del factor de transcripción C/EBP, a través del cual se puede activar la diferenciación granulocítica como terapia alternativa a los tratamientos con ITQ (Shvachko et al., 2018).

## **CAPÍTULO 3: EL ESTRÉS OXIDATIVO Y SU IMPACTO EN EL TRATAMIENTO DE LA LMC**

### **3.1. El estrés oxidativo (EO) y la LMC**

Dada la resistencia primaria y secundaria observada con los ITQ y con la disponibilidad del modelo *in vitro* K562, se hace necesario estudiar otras estrategias terapéuticas que permitan evaluar moléculas promisorias para combatir la LMC. Interesantemente, en las células madre hematopoyéticas (CMH) los factores inductores de hipoxia mantienen las células en un estado quiescente y las acondicionan a un ambiente con un metabolismo energético glicolítico anaerobio (Cheng et al., 2018). En consecuencia, hay una baja producción de EROs y poseen una alta concentración de antioxidantes, esto se debe a la importancia de estas EROs en el proceso de compromiso y diferenciación a los diversos linajes presentes en el sistema hematopoyético (Hu et al., 2019). Por el contrario, las células madre leucémicas encargadas de iniciar y mantener el proceso de leucemogénesis son más dependientes de la respiración oxidativa que de la glicólisis y son más sensibles al estrés oxidativo que las CMH, por lo que una terapia que incremente el estrés oxidativo induciría muerte celular principalmente en las células madre leucémicas (Testa et al., 2016).

De hecho, recientemente, se ha reportado en diferentes tipos de cáncer, especialmente en leucemia, que la generación de estrés oxidativo (EO) producto del exceso de moléculas pro-oxidantes ( $H_2O_2$ ), consecuencia del metabolismo celular, poseen una gran cantidad de alteraciones genéticas (mutaciones puntuales, y anormalidades cromosómicas) y metabólicas (aumento del metabolismo glucolítico sobre fosforilación oxidativa), que pueden afectar la estructura mitocondrial (Mendivil-Perez et al., 2015; Kudryavtseva et al., 2016; Gurer-Orhan et al., 2018; Soto-Mercado et al., 2018).

Con las observaciones experimentales anteriores, es razonable pensar que las especies reactivas del oxígeno (EROs) juegan un papel importante en el metabolismo de las células cancerosas y que, por consiguiente, el EO podría usarse como estrategia alternativa para atacar selectivamente células de la LMC.

#### **3.1.1 Definición del EO**

Por definición, el EO es el desbalance entre la alta producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) provenientes del metabolismo celular y los mecanismos moleculares antioxidantes diseñados para degradar los EROs (Sies, 1997). Sin embargo, durante los últimos años varios grupos de investigación incluido el nuestro, han reevaluado la definición de

EO definiéndolo como un estado crónico y /o transitorio de desbalance entre los oxidantes y antioxidantes (enzimáticos o no enzimáticos) en favor de los oxidantes, conllevando a una disrupción de la señalización redox, control y/o daño molecular (Halliwell, 2007; Lushchak, 2014; Sies, 2015; Sies, 2017).

### **3.1.2 El EO en la fisiopatología de la LMC**

El papel del EO en la leucemia mieloide crónica no se ha esclarecido completamente, ni se ha establecido un mecanismo específico que pueda determinar la función de EO en células leucémicas (Thannickal & Fanburg, 2000). En este contexto, se ha evidenciado que las EROs son importantes iniciadoras y promotores de la carcinogénesis y que altos niveles de EROs promueven la supervivencia, proliferación, inestabilidad genómica y mutagénesis, produciendo la progresión de la enfermedad y a resistencia contra los medicamentos (Irwin et al., 2013). El estrés oxidativo EO puede ser estimulado por los oncogenes tirosina quinasa de forma intracelular en células de leucemia (Bourgeois et al., 2017; Hole et al., 2011). Asimismo, se ha demostrado que la expresión de BCR-ABL promueve la generación de EROs y un desequilibrio del sistema redox celular en general que promueve la oxidación de residuos cisteína de la proteína de fusión BCR-ABL y cambios en la conformación tridimensional de la proteína, principalmente en el dominio quinasa (Sattler et al., 2000; Kim et al., 2005; Koptyra et al., 2006; Zhang et al., 2008). Estos cambios conformacionales de la proteína de fusión BCR-ABL a su vez ocasionan a la resistencia al tratamiento con imatinib en la LMC.

A pesar de los numerosos estudios durante décadas de los efectos del EO en células leucémicas, no se ha establecido con claridad el papel del EO y si su efecto es adverso o favorecedor sobre la progresión de tumores hematológicos (Hole et al., 2011, Bazi et al., 2016). Sin embargo, se ha demostrado que el EO tiene un papel beneficioso en las terapias contra LMC, induciendo la regulación de células progenitoras y la muerte por apoptosis de las células leucémicas (Bonilla-Porras et al., 2011; Du et al., 2014; Mendivil et al., 2014; Rojas-Valencia et al., 2017; Soto-Mercado et al., 2020)

Tomando en consideración los hallazgos anteriormente descritos, se muestra que el EO y su señalización a través de EROs inducen un papel importante en la señalización de las células leucémicas en modelos de LMC y cáncer, específicamente como inductor de apoptosis, por lo tanto, se propone el EO como un fenómeno que debe ser explorado como estrategia antitumoral.

### **3.2. El EO como estrategia antitumoral**

Uno de los pilares del cáncer es la desregulación de los sistemas energéticos celulares (Hanahan & Weinberg, 2011). Este mecanismo les permite a las células cancerosas proliferar y sobrevivir en microambientes que podrían inducir la muerte en células normales; como consecuencia de esta desregulación, las células cancerosas producen altas cantidades de EROs, acompañado de alteraciones en los sistemas y vías antioxidantes (Azad et al., 2009). Se ha mostrado que las EROs pueden contribuir a la supervivencia, proliferación, metástasis, sobrevivir en ambientes hipóxicos y la resistencia a medicamentos en una gran variedad de cánceres, sin embargo, cuando las EROs se salen de control, pueden llevar a la muerte celular (Moloney y Cotter, 2018; Xie y Simon, 2017). Esto ha llevado a pensar que potenciar la producción de EROs, produciendo estados críticos de EO celular, podría usarse como una estrategia novedosa de tratamiento selectivo para el cáncer (Postovit et al., 2018).

Modificaciones de los niveles del EO intracelulares en las células cancerosas han sido investigados por Roy Chowdhury y Banerji (2017), quienes mostraron que se puede utilizar como blanco bioenergético la mitocondria como una estrategia efectiva y selectiva para eliminar células cancerosas. De igual forma, Dielschneider y colaboradores (2017) evidenciaron que la activación de caspasa 8 y 9 está asociada a la permeabilización de la membrana lisosomal, esto podría explicarse a que posterior a la pérdida de potencial de membrana mitocondrial, se aumentan las EROs, las cuales desestabilizan las membranas del lisosoma a través de la peroxidación de lípidos y facilitan su ruptura. Estas observaciones les permitieron proponer a los lisosomas como blanco terapéutico en cáncer (Dielschneider et al., 2017).

Estos hallazgos experimentales han permitido a los investigadores en los últimos años, proponer una gran cantidad de principios activos modulares de las EROs, no solo como un mecanismo de inducción de muerte celular, sino como una estrategia para el mejoramiento de la multiresistencia a medicamentos (Bonilla-Porras et al., 2011; Mendivil et al., 2014; Rojas-Valencia et al., 2017; Cui et al., 2018; Soto-Mercado et al., 2020). Esta es una gran ventaja porque amplía el panorama de posibilidades terapéuticas, posicionando al EO como una alternativa promisoriosa y de alto impacto para el tratamiento contra el cáncer.

Durante la última década, numerosas investigaciones posicionan a las estrategias terapéuticas mediadas por EO como propuestas novedosas que exploran y toman ventaja de las

alteraciones metabólicas que poseen las células cancerosas, para el desarrollo de tratamientos alternativos con alta selectividad y eficiencia.

### **3.3. El EO, los Mitocanes y la Mitochondria como blanco terapéutico en la LMC**

Las mitocondrias son organelos esenciales para la vida, principalmente por su papel esencial en el proceso de biosíntesis de ATP. Paradójicamente, a mediados de la década de los 90, se evidencia un mecanismo emergente que presenta la mitocondria como un punto central en la muerte celular, principalmente en la apoptosis (Lopez y Tait, 2015). En este contexto, se ha considerado la mitocondria como un blanco prometedor en los cánceres hematológicos debido a la dependencia única de sus células a funciones mitocondriales comparado con otras líneas hematopoyéticas. Con este conocimiento, en los 2000 se identificaron agentes anti cancerígenos que se designaron como “mitocanes” (Neuzil et al., 2007, Neuzil et al., 2013). Estos compuestos se caracterizaron por su capacidad de causar desestabilización mitocondrial y activación subsecuente de mediadores mitocondriales de apoptosis como la familia BCL2, citocromo C, Smac/Diablo y AIF (Neuzil et al., 2007). De igual forma pueden inducir EO, ya que la mitocondria es, por excelencia, el mayor productor de especies oxidantes celulares, proponiendo los mitocanes como un tratamiento selectivo y efectivo (Neuzil et al., 2007)

Interesantemente, Wang y colaboradores, evidencian que el uso de un antiparasitario contra helmintos, la Ivermectina, genera muerte selectiva en células leucémicas, induciendo disfunción mitocondrial y EO. Los investigadores demostraron—en un modelo de K562 que la ivermectina ataca selectivamente el complejo I mitocondrial, suprimiendo la respiración celular, y se interpretó como un efecto tipo “mitocan” ya que este compuesto desestabilizó la mitocondria de forma específica (Wang et al., 2018).

Las células cancerosas han demostrado tener diversas características biológicas resultantes de la transformación genética y epigenética que estas sufren de células normales a células tumorales con un crecimiento y movimiento sin restricción (Kalyanaraman et al., 2018). Uno de las características más importantes es la tendencia a reprogramar sus capacidades metabólicas: La inhibición de la fosforilación oxidativa produciendo un metabolismo glucolítico elevado. La reprogramación metabólica está relacionada directamente a la activación de oncogenes, como *KRAS* (Chiaradonna et al., 2006), o a la inhibición de supresores tumorales como *PTEN* (Beckner et al., 2005).

Investigaciones recientes han descrito la importancia de los complejos mitocondriales juegan un papel importante para que se den los efectos antitumorales de ciertos medicamentos de re-



uso, como la metformina (Andrzejewski et al., 2014). Diferentes tipos de cáncer que poseen mutaciones en los genes mitocondriales, por ejemplo, en el complejo I de la cadena transportadora de electrones, son más susceptibles al uso de inhibidores mitocondriales; estas observaciones posicionan a la mitocondria como un blanco terapéutico de gran relevancia en estudios preclínicos (Kalyanaraman et al., 2018)

Finalmente, en este capítulo se evidencia la importancia del EO y del uso de mitocanes o compuestos desestabilizadores de la cadena respiratoria mitocondrial como blanco terapéutico para las células tumorales, principalmente, a través de la inducción de muerte celular por apoptosis.

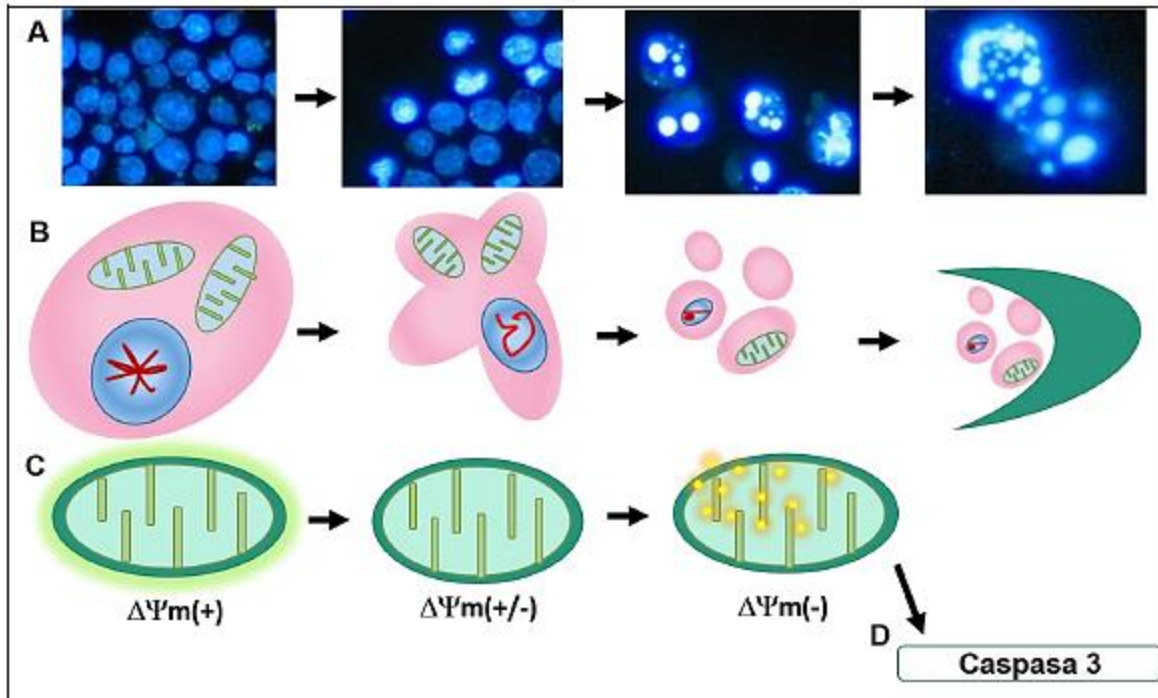
## CAPÍTULO 4: LA INDUCCIÓN DE APOPTOSIS COMO ESTRATEGIA EFECTIVA PARA EL TRATAMIENTO DE LA LMC

### 4.1. Definición de apoptosis

El término apoptosis proviene del griego apo (desde) y ptosis (cayendo) que hace referencia a la caída de las hojas de los árboles y los petalos de las flores. El término apoptosis fue acuñado en 1972 por Kerr y colaboradores (Kerr, 2002) para describir una forma común de muerte celular que los autores observaron repetidamente en distintos tejidos y tipos celulares. Los autores observaron que las células en proceso de muerte compartían características morfológicas que diferentes a las observadas en las células necróticas y sugirieron que esas características morfológicas compartidas podrían ser el resultado de un modo común conservado y endógeno relacionado al programa de muerte celular (Kerr et al., 1972). Kerr y colaboradores describen dos estadios de la apoptosis de acuerdo a sus características morfológicas: la condensación y la fragmentación (Kerr et al., 1972).

La apoptosis es un tipo de muerte celular regulada para eliminar una célula, es un proceso complejo. Una vez que se toma la decisión de muerte, la correcta ejecución del programa de apoptosis requiere la activación y ejecución regulada y coordinada de múltiples subprogramas. El proceso de apoptosis involucra cambios morfológicos y bioquímicos típicos y se compone de tres fases distintivas: una fase de iniciación, una efectora y una fase de ejecución. (Valentin et al., 2018). Usualmente, dura varias horas entre el inicio de la apoptosis y la fragmentación celular final (Fulda & Debatin, 2006). La apoptosis presenta cambios morfológicos característicos como la presencia de células redondeadas, retracción de pseudópodos, reducción del volumen celular (picnosis), condensación de la cromatina, fragmentación nuclear (cariorrésis), poca o nula afectación de organelos citoplasmáticos, gemación de la membrana plasmática y fagocitosis de los cuerpos apoptóticos generados (Kroemer et al., 2018; Tang et al., 2019) (Figura 8)

La apoptosis también presenta marcadores bioquímicos, como la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, y la activación de vías que se han descrito como proapoptóticas, donde se regulan diversas proteínas que se han establecido como posibles mediadores y efectores dentro de la cascada de señalización de las vías **extrínseca e intrínseca de la apoptosis**.



**Figura 8. Fotografías y esquematización del proceso de muerte celular por apoptosis.** A. Fotomicrografía mostrando la secuencia de cambios morfológicos celulares: condensación, fragmentación nuclear, y formación de cuerpos apoptóticos, características morfológicas importantes del proceso de apoptosis. B. Esquematización del proceso de fagocitosis de los cuerpos apoptóticos por células como macrófagos y otros fagocitos. C. Ilustración del proceso de la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, que se da cuando se abre el poro mitocondrial, a través del cual pueden salir moléculas como Smac/Diablo y Citocromo C y caspasa 9 las cuales inducen la activación de la caspasa 3 importantes señalizadores cascada abajo en la vía apoptótica. Modificada a partir de Mizuta et al., (2013)

## 4.2. Vías de señalización de la apoptosis

### 4.2.1. Vía extrínseca de la apoptosis

La vía extrínseca del proceso de apoptosis es inducida por señales extracelulares de estrés que son reconocidas por receptores de membrana específicos y termina en la activación de proteasas de cisteína específicas de aspartato como la familia de las CASPASAS. La vía extrínseca se desencadena cuando se da la activación de un receptor de muerte por su ligando, los cuales inician una cascada de señalización que esta mediada por la activación de caspasa 8. Específicamente, la apoptosis se induce a través de la interacción de un ligando con su respectivo receptor de muerte como Fas (APO-1, CD95), TNFR-1, DR3 (TRAMP), DR-4 (TRAIL-R1) o DR5 (TRAIL-R2) (Ulukaya et al. 2011). Estos receptores que se ubican en la membrana celular, hacen parte de la familia de TNFR. La unión ligando-receptor causa su oligomerización, resultando en su activación. La oligomerización de los receptores es seguida por la unión de proteínas adaptadoras (FADD, TRADD) al complejo formado por el receptor, que resulta en el reclutamiento de la procaspasa 8 y 10, donde se activa la proenzima. Una vez

las caspasas 8 y 10 son activadas, estas activan la caspasa 3 efectora en una cascada secuencial de activación de caspasas (Wajant, 2002). Los ligandos mejor caracterizados y sus respectivos receptores incluyen, FasL/FasR, TNF $\alpha$ /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 y Apo2L/DR5 (Patarroyo & Vargas, 2013). Alternativamente, las señales proapoptóticas extrínsecas pueden transducirse a través de los llamados receptores de dependencia. Estos receptores inducen apoptosis cuando existe la ausencia de su ligando o estímulo, al cual están constantemente unidos (Ulukaya et al. 2011)

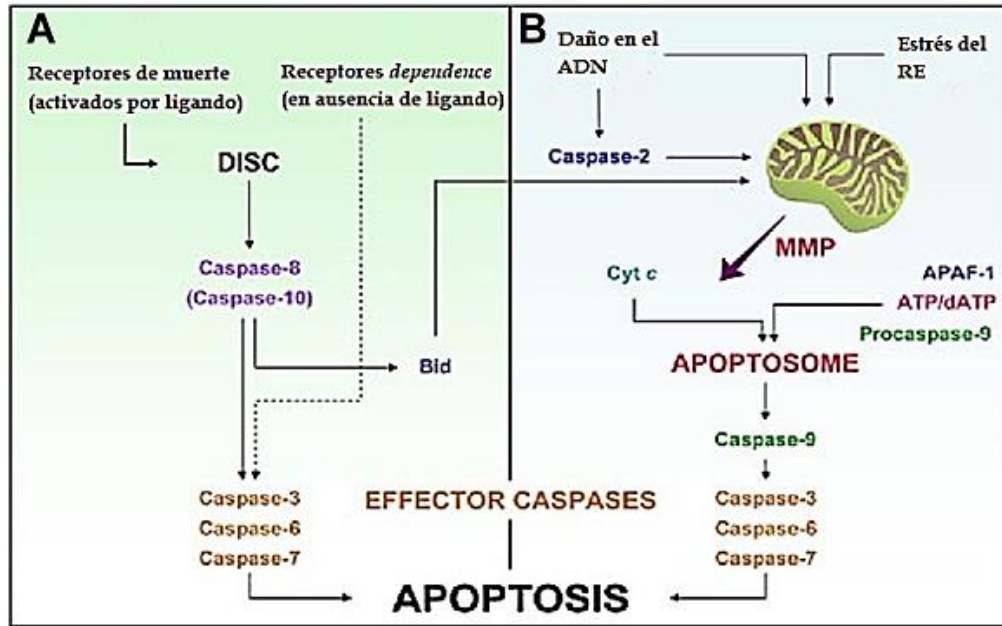
#### **4.2.2. Vía intrínseca de la apoptosis**

La vía intrínseca de señalización de la apoptosis es activada por estímulos internos, como el daño irreparable al ADN, EO, privación de citoquinas y aumento excesivo de las concentraciones de Ca<sup>2+</sup> citosólicas, que ocasionan la catástrofe metabólica y bioenergética de la mitocondria. Esta vía de señalización conduce a una serie de mecanismos regulados molecularmente en la mitocondria (Galluzzi et al., 2012). En la membrana mitocondrial confluyen señales pro-apoptóticas y anti-apoptóticas y el proceso culmina con la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, que aumenta la permeabilidad mitocondrial y la liberación de moléculas proapoptóticas al citoplasma. Las señales celulares en la mitocondria se encuentran reguladas por la familia de proteínas BCL2 que consta de dos grandes grupos: el primer grupo de las proteínas que son capaces de inhibir la muerte celular como BCL2, MCL-1, BCL-xL, BCL-w y BFL-1, promoviendo la supervivencia; y el otro grupo que son las proteínas proapoptóticas, que pueden subdividirse en (1) proteínas BH3-único, como BIM, PUMA, BID, BIK, NOXA y (2) BAX y BOK. Todas las proteínas de la familia BCL-2 comparten un dominio de homología BH. Las proteínas como BAX y similares poseen entre 3-4 dominios BH, mientras que las proteínas BH3-único, solo comparten el dominio BH3 entre sí (Leber et al., 2010; Patarroyo & Vargas, 2013; Valentin et al., 2018). Por la naturaleza de las proteínas de la familia BCL-2 existen algunas que son más promiscuas que interactúan indiscriminadamente, como PUMA, capaz de unirse a cualquiera de las proteínas anti-apoptóticas, mientras que algunas son mucho más selectivas, como NOXA, que se une principalmente a MCL-1 (Patarroyo & Vargas, 2013).

Las proteínas de dominio BH2-único son activadas como un estímulo de muerte temporal y con manejo específico del tipo celular, iniciando además con un proceso de desplazamiento/activación de las proteínas BAX y similares a BAX. Las proteínas

proapoptóticas BAX y BAK promueven la liberación de citocromo C (Wong, 2011). Después de haber sido activadas por proteínas que contienen únicamente el dominio BH3. En su estado normal BAX y BAK se encuentran inhibidas por proteínas pro-supervivencia de la familia Bcl-2 mediante interacciones directas. Estas proteínas sufren cambios conformacionales durante la transición de monómeros inactivos a oligómeros activos (Westphal et al., 2014). BAX y BAK forman homodímeros y heterodímeros que posteriormente se ensamblan en estructuras similares a poros en la membrana externa de la mitocondria, causando la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP, por sus siglas en inglés). Se ha propuesto que estos dímeros de BAX y/o BAK son capaces de interactuar con VDAC, un canal dependiente de voltaje que se ha estudiado como parte importante de la formación del poro mitocondrial y de la permeabilización de la membrana externa (Shoshan-Barmatz et al., 2017). Una vez activadas estas proteínas, el citocromo c que normalmente reside en la membrana interna mitocondrial, es liberado por medio de los poros formados en la membrana mitocondrial, al igual que factor inductor de apoptosis (AIF), Smac, DIABLO y HtrA2 que son factores proapoptóticos que se translocan al citoplasma (van Gurp et al., 2003). La salida de estos factores genera la pérdida del gradiente iónico, la disminución de la producción de ATP por la ATP sintasa y adicionalmente la activación de cascadas proteolíticas como las caspasas y metaloproteinasas (Westphal et al., 2014).

En la figura 9 se presenta una esquematización de las vías extrínseca e intrínseca de la apoptosis y la activación de la proteína BID por las caspasas 8 y 10 que puede inducir la vía intrínseca de la apoptosis al cortar las proteínas de dominio único BH3, lo que permite el corte de las proteínas BID que en su estado proteolizado y la activación de las proteínas efectoras BAX y BAK. La activación de la proteína BID permite la transición de la vía extrínseca a la vía intrínseca de la apoptosis generando la desestabilización mitocondrial.



**Figura 9. Esquema de las vías extrínseca e intrínseca de apoptosis y la comunicación entre las dos vías vía la proteína BID.** (A) vía extrínseca, mediada por la unión de un receptor de muerte a su ligando que activa a DISC (Death-inducing Signaling Complex) el cual desencadena la activación de la cascada de CASPASA 8 o 10 las cuales a su vez activan la proteína BID, por otra parte, los receptores de dependencia pueden activar la vía cuando carecen de la unión a su ligando a través de activación directa de la cascada de caspasas (CASPASA 3,6,7). (B) Vía intrínseca, un daño en el ADN o estrés en el RE que se induce en la mitocondria, apertura del poro mitocondrial, pérdida del potencial de membrana de este organelo y liberación del citocromo C, APAF1, Pro CASPASA 9, formando un complejo molecular conocido como apoptosoma, donde se da la activación de la cascada de caspasas, empezando por la CASPASA 9 que posteriormente activa las caspasas ejecutoras 3,6 o 7 (Patarroyo & Vargas, 2013).

### 4.3. La inhibición de la apoptosis en el desarrollo de LMC

Desde de los primeros estudios realizados de la apoptosis por Kerr y colaboradores se demostró la importancia de este proceso en la dinámica y homeostasis de la mayoría de tejidos en el organismo y en el cáncer (Kerr et al., 1972). De hecho, la regulación de los mecanismos apoptóticos se ha implicado como una de las principales estrategias de adaptación fundamental de las células cancerosas para mantenerse en proliferación y evadir la muerte (Wong, 2011).

Los mecanismos de evasión de la apoptosis ocurren a través de tres principales vías de señalización: la primera es la disrupción del balance entre proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas; la segunda está relacionada con la reducción de la función de las caspasas por inactivación y la tercera está relacionada con la alteración en la señalización de los receptores de muerte de la vía extrínseca (Figura 10)

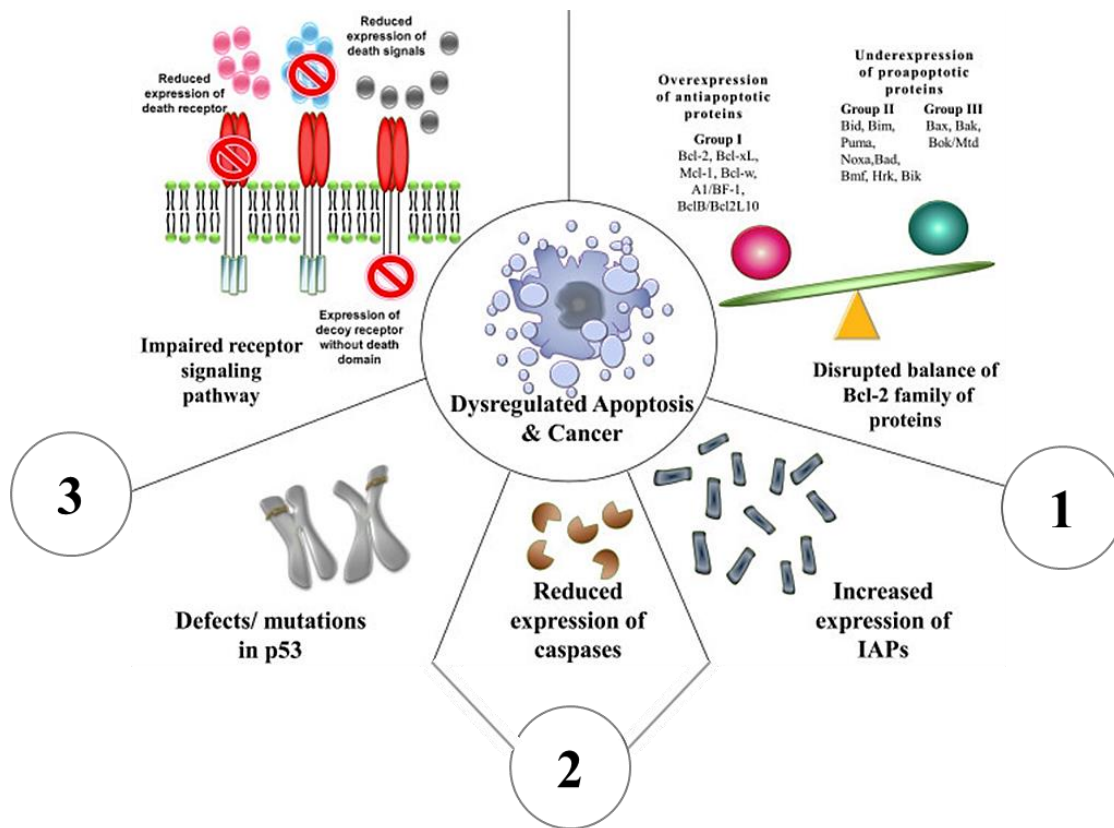


Figura 10. Mecanismos involucrados en a la evasión de la apoptosis. Modificado a partir de Wong (2011)

En la leucemia se ha visto dramáticamente aumentada la familia BCL2, y en algunos tipos de tumores (Strasser et al., 1990). Otros mecanismos que se comprometen con la evasión de la apoptosis en las células cancerosas se relacionan con la pérdida del supresor tumoral *TP53* (Law et al., 1993). De igual forma, se ha evidenciado la pérdida de función de las proteínas efectoras importantes como BAX o BAK. (Wang and Youle, 2012; Sarosiek et al., 2013).

Adicionalmente, al supresor tumoral *TP53*, una gran variedad de genes implicados en los mecanismos de señalización de la apoptosis se encuentra regulados negativamente o mutados en la LMC, como los miembros de las proteínas proapoptóticas BIM y BAD (Tzifi et al., 2012). Además, la sobreexpresión de la proteína de fusión BCR-ABL ha mostrado ser un potente inhibidor de la muerte celular, siendo capaz de promover la progresión entre las fases de la LMC previniendo la formación del apoptosoma con la CASPASA 9 (Deming et al., 2004; Kurokawa et al., 2008).

Otra de las vías de señalización que se encuentran reguladas de forma aberrante en este desorden hematológico y le confieren una serie de ventajas a las células para su proliferación,

expansión y posterior invasión: al alterar vías que permite que las células,—a pesar ser genómicamente inestables—, sean capaces de evadir los diferentes mecanismos celulares como: es el arresto del ciclo celular a través de TP53 o la inducción de muerte a través de la señalización de esta misma proteína. También mantiene la señalización de sobrevivencia y proliferación con la activación de la cascada abajo por parte de la proteína BCR-ABL que garantiza que el sistema celular sea altamente proliferativo y resistente a la muerte; no solo por el estrés endógeno generado por la gran inestabilidad genómica, sino también a los estímulos tóxicos externos inducidos por la quimioterapia (Zhang et al., 2008). El conocimiento molecular de los mecanismos de evasión de muerte en la leucemia representa el principal reto para el diseño de la formulación de estrategias terapéuticas eficientes, efectivas y selectivas.

Por lo tanto, la apoptosis es de gran interés en la búsqueda de compuestos que reactiven el proceso de apoptosis en las células cancerosas para los tratamientos contra la LMC (Hanahan & Weinberg, 2011).

#### **4.4. Regulación del EO como mecanismo inductor de apoptosis en LMC**

Uno de los mecanismos reconocidos que median la señalización para la inducción de la apoptosis en modelos *in vitro* de leucemia es el estrés oxidativo (Bonilla-Porras et al., 2013; Mendivil-Perez et al., 2014; Ruiz-Moreno et al., 2016). De hecho, las EROs, especialmente el peróxido de hidrógeno, se ha demostrado que juega un papel central como segundo mensajero en las vías que conducen a la activación de proteínas mediadoras y efectoras del proceso de apoptosis (Rojas-Valencia et al., 2017; Soto-Mercado et al., 2020) En este sentido, la estrategia con las células leucémicas es la desregulación de los sistemas antioxidantes y el aumento de los niveles de EO por encima de los umbrales de resistencia intrínseca que poseen las células cancerosas (Lopez y Tait, 2015).

La investigación en el diseño de terapias en la LMC ha focalizado sus esfuerzos en el desarrollo de estrategias para la inducción de apoptosis como mecanismo terapéutico para el tratamiento contra la leucemia. En esta línea, Zhou y colaboradores en el 2003 mostraron que el 2-metoxiestradiol, un inhibidor de la superóxido dismutasa, promueve la apoptosis mediada por de radicales libres en células de leucemia linfocítica crónica (LLC) (Zhou et al., 2003). Salimi y colaboradores (2015) demostraron que el uso de compuestos poli fenólicos como el ácido elagico, indujo la producción de EROs las cuales mediaron la apoptosis selectivamente a células de leucemia linfoblástica crónica tipo linfocitos-B (LLC) (Salimi et al., 2015). De igual



forma, al año siguiente, los mismos investigadores evidenciaron que el uso de una flavona natural, la acacetina, aumentó la producción de EROs, las cuales indujeron la pérdida del potencial de membrana mitocondria, la liberación del citocromo c y, consecuentemente la activación de la caspasa 3 en el mismo modelo de LLC (Salimi et al., 2016). Con respecto a la LMC, Khoshtabiat y colaboradores en el mismo año, mostraron que un compuesto activo de la familia de los ditiocarbamatos indujo aumento de la fragmentación del ADN, activación de la caspasa 3 y apoptosis mediada por EO, el cual se vio reflejado por el aumento significativo de la fluorescencia de la sonda DCHF-DA indicativo de generación de EROs en la línea celular K562 (Khoshtabiat et al., 2016).

Estas observaciones experimentales, muestran que el EO juega un papel importante como mediador de apoptosis, por lo tanto, la selección de moléculas generadoras de EROs podría ser compuestos promisorios para ser utilizados en el tratamiento de la LMC.

#### **4.5. Principios activos emergentes con propiedades prooxidantes y proapoptóticas**

Durante las últimas décadas se han identificado numerosas moléculas con propiedades prooxidantes y proapoptóticas capaces de inducir muerte en células leucémicas. Entre los ejemplos de estas moléculas con estas características se han reportado varios estudios, una de estas moléculas es la esfingosina 1-fosfato de primera generación, que se había utilizado previamente como inmunosupresor, pero también se le ha reportado actividad prooxidante con la generación de EROs e inducción de apoptosis en LMC (Neviani et al., 2007; Wallington-Beddoe et al., 2011; Takasaki et al., 2018). De igual forma, Mortezaee y colaboradores (2019) empleando la curcumina demostraron su capacidad de inducir aumento de EO y apoptosis en líneas celulares de leucemia mieloide (Mortezaee et al., 2019).

Recientemente, Yang y colaboradores demostraron el mismo efecto con la camalexina, una fitoalexina, de inducción de estrés del retículo endoplasmático, disminución del potencial de membrana mitocondrial y activación de una cascada de señalización de quinasas que conducen a la apoptosis a células de LM (Yang Y. et al., 2018). Asimismo, la taxodiona, una quinona aislada de *Taxodium distichum* mostró producción de EROs y apoptosis en células K562 a pesar que estas células presentaron la proteína de fusión BCR-ABL mutada en la posición 315, una mutación que le confiere resistencia a los tratamientos convencionales. Este efecto de la taxodiona fue revertido por la N-acetilcisteína (NAC), un antioxidante, lo que confirmó la participación del EO en el mecanismo de muerte por apoptosis en el modelo de

LMC (Uchihara et al., 2018). Interesantemente, en el mismo año, se demostró que el ácido úsnico, un derivado natural del dibenzofurano que se encuentra en varias especies de líquenes y que ha sido utilizado como antibiótico, presenta efectos prooxidantes produciendo EROs e induciendo apoptosis en líneas celulares K562 resistentes a medicamentos (Wang et al., 2019).

## **CAPÍTULO 5: REPOSICIONAMIENTO DE MEDICAMENTOS EFECTIVOS COMO ALTERNATIVA FARMACÓLOGICA EN EL TRATAMIENTO DE LA LMC**

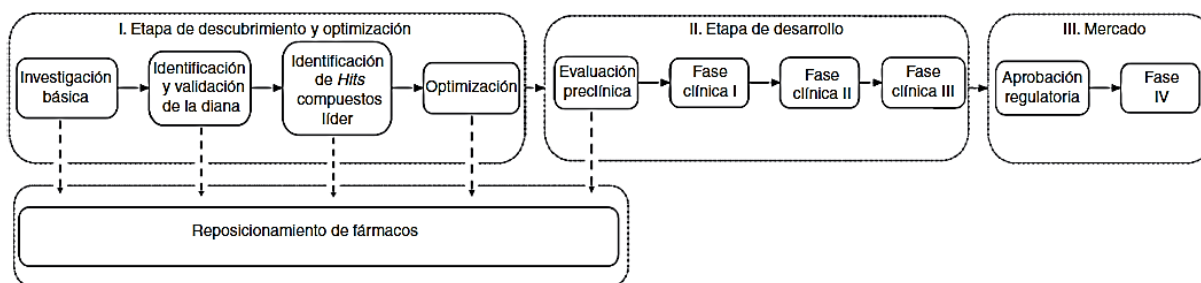
### **5.1. Reposicionamiento Farmacológico de los derivados de la Vitamina E en el tratamiento de la LMC.**

A pesar de los enormes recursos que se invierten en la prevención y el tratamiento del cáncer, esta patología sigue siendo una de las principales causas de mortalidad en todo el mundo (Gupta et al., 2013). Los esfuerzos se han dirigido en encontrar métodos terapéuticos más efectivos y eficientes, sin embargo, estos no han resultado en el descubrimiento de nuevos fármacos anti-tumorales (Issa et al., 2013; Reaume, 2012). Por lo tanto, se pensó en un segundo uso de medicamentos ya existentes que estuvieran disponibles en el mercado (Bernard et al., 2008; Tołoczko-Iwaniuk et al., 2019).

El reposicionamiento de medicamentos fue definido por primera vez por Ashburn y Thor en el 2004, como “el proceso de encontrar nuevos usos fuera de la indicación médica original para medicamentos existentes, también fue denominado como redireccionamiento, reutilización y modificación de perfil (Langedijk et al., 2015). De hecho, el reposicionamiento de fármacos ofrece grandes beneficios sobre el descubrimiento de fármacos *de novo*. La principal ventaja de este enfoque es que los perfiles farmacocinéticos, farmacodinámicos y de toxicidad (v.gr. dosis terapéuticas y tóxicas, efectos secundarios, interacciones medicamentosas) de los principios activos son generalmente bien conocidos (Deftereos et al., 2011; Shim & Liu, 2014). El hecho de que los fármacos disponibles ya cuenten con los diferentes estudios toxicológicos, reduce el costo y el tiempo de la aprobación de los compuestos para su uso clínico (Oprea et al, 2011)

Es importante anotar que para el desarrollo de fármacos es un proceso complejo, que inicia con la identificación y síntesis de moléculas que se unen a blancos terapéuticos de interés o que muestran alguna actividad biológica a través de modelamiento computacional o ensayos preclínicos que la convierten en promisorias, con lo cual continúan en estudio a la siguiente fase. El siguiente paso es asegurar que el compuesto tenga propiedades farmacológicas deseables, como baja toxicidad y solubilidad acuosa adecuada. A través de estos perfiles farmacocinéticos, farmacodinámicos y de toxicidad, se puede realizar la traslación de una molécula de estudios pre-clínicos que avalen su seguridad y eficacia terapéutica para el uso en estudios clínicos en humanos (Mudduluru et al., 2016; Saldívar-González et al., 2017). En general, el proceso de descubrimiento de fármacos nuevos es una labor que consume mucho tiempo, es costoso y representa una inversión de alto riesgo, según el reporte del *Easter*

*Research Group* (ERG), en donde se describe que puede tomar entre 10-15 años el desarrollo de un nuevo medicamento (Sertkaya et al., 2014). Adicionado a que el porcentaje de éxito, para este nuevo medicamento, es de tan solo 2% en promedio (Yeu et al., 2015; Xue et al., 2018). Por lo tanto, el re-uso del fármaco reduce significativa el tiempo desde su aprobación en el laboratorio hasta su uso en los pacientes, comparado con el desarrollo de medicamentos *de novo* (Oprea & Mestres, 2012; Würth et al., 2016). (Figura 11)



**Figura 11. Esquematización de los pasos y los esfuerzos para el descubrimiento clásico de fármacos (de novo) en comparación con el reposicionamiento farmacológico.** (Saldívar-González et al., 2017)

El reposicionamiento, posee innumerables ventajas como son los costos asociados a su síntesis (incluidos los posibles residuos peligrosos) ya se han invertido, lo que hace que el tratamiento terapéutico para las nuevas indicaciones sea atractivo económicamente. Además, el re-uso del fármaco reduce significativa el tiempo desde su aprobación en el laboratorio hasta su uso en los pacientes, comparado con el desarrollo de medicamentos *de novo* (Figura 11) (Oprea & Mestres, 2012; Würth et al., 2016). Adicionalmente, el reposicionamiento farmacológico reduce los riesgos de post-comercialización y de aplicabilidad clínica para las empresas farmacéuticas, lo que, a su vez, acelera el acceso exitoso de los pacientes afectados al tratamiento farmacológico (Issa et al., 2013; Würth et al., 2016)

La implementación del reposicionamiento como estrategia obedece a la demanda de alternativas terapéuticas para el tratamiento del cáncer, que ha aumentado su incidencia y mortalidad los últimos años, debido al desarrollo de resistencia a los tratamientos tradicionales (Xue et al., 2018, Pantziarka et al., 2020). En el caso de las enfermedades hematológicas, por ejemplo, representa una oportunidad interesante para la distribución de medicamentos de alta disponibilidad y precios asequibles (Kale et al., 2020). Algunos ejemplos de moléculas promisorias para la terapia contra el cáncer que ya se encuentran en estudio para su reposicionamiento son los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINES) como el celecoxib, un inhibidor selectivo de la ciclooxigenasa 2 (COX-2), la cual estimula los procesos

de angiogénesis, metástasis, proliferación celular y supervivencia, y esta sobre-expresada en malignidades hematológicas como leucemia linfoblástica crónica, leucemia mieloide crónica, linfoma de Hodgkin's (Bernard et al., 2008; Tołoczko-Iwaniuk et al., 2019). Asimismo, se ha demostrado en estudios con la celecoxib que inhibe la proteína MCL-1, perteneciente a la familia BCL-2 que promueve la supervivencia; de igual forma, también inhibe a la survivina, Akt y BCL-2, mostrando gran potencial como agente quimioterapéutico o coadyuvante en los regímenes terapéuticos del cancer (Jendrossek, 2013).

De esta manera, fármacos que originalmente han sido identificados como sedantes, analgésicos, antipiréticos, antiartríticos, anestésicos, antidiabéticos, relajantes musculares, inmunosupresores, antibióticos, antiepilépticos, cardio-protectores, antihipertensivos o inhibidores de gamma-secretasa están siendo reutilizados para el tratamiento del cáncer (Habets et al., 2019). Estos fármacos pueden clasificarse en dos categorías diferentes: (I) fármacos que fueron aprobados para otros usos, pero cuyas actividades biológicas se conocen suficientemente y que pueden ser seleccionados para que ejerzan actividades anticancerígenas (v.gr. talidomida, aspirina, ácido valproico, celecoxib, leflunomida, minociclina, vesnarinona, estatinas, metformina, tiocolchicosida, rapamicina, metotrexato, bisfosfonatos); y (II) agentes identificados a partir de un conjunto de fármacos aprobados arbitrariamente, elegidos para examinar su selectividad contra blancos específicos en las células cancerosas (v.gr. nitroxolina, noscapina) (Bertolini et al., 2015; Gupta et al., 2013).

En este contexto, la metformina ha sido utilizado para el tratamiento de diabetes tipo 2; este fármaco activa la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), incrementando la captación de glucosa en sangre por parte de los músculos y el hígado. Como medicamento de reposicionamiento en LMC, se ha demostrado que bloquea la señalización que promueve la supervivencia dependiente de PI3K/Akt/mTOR, inducida por la proteína de fusión BCR-ABL (Biondani y Peyron, 2018).

Es importante también anotar que para algunos principios activos, aún se desconocen los perfiles de interacción fármaco-molécula blanco, en particular, para los medicamentos más antiguos, lo que crea oportunidades para la reutilización de estos fármacos con el fin de asignarles nuevas indicaciones terapéuticas, mediante el descubrimiento de afinidades biológicamente y clínicamente relevantes para blancos en la célula tumoral, que juegan un papel determinante en la eliminación de esta población celular anormal (Oprea & Mestres, 2012).

En el 2014, el grupo de investigación de Pantziarka y colaboradores empezó el proyecto ReDO (Repurposing Drugs in Oncology, por su sigla en inglés), en búsqueda de reproponer drogas bien conocidas y caracterizadas (cuya indicación primaria se ha dirigido al tratamiento de una enfermedad diferente del cáncer), para darles un nuevo uso en el campo de la oncología. El proyecto ReDO ha definido criterios clave, mediante los cuales estos fármacos pueden ser elegidos eficientemente como candidatos de alto potencial para reevaluación ulterior como se observa en la Tabla 4 (Mudduluru et al., 2016; Pantziarka et al., 2014).

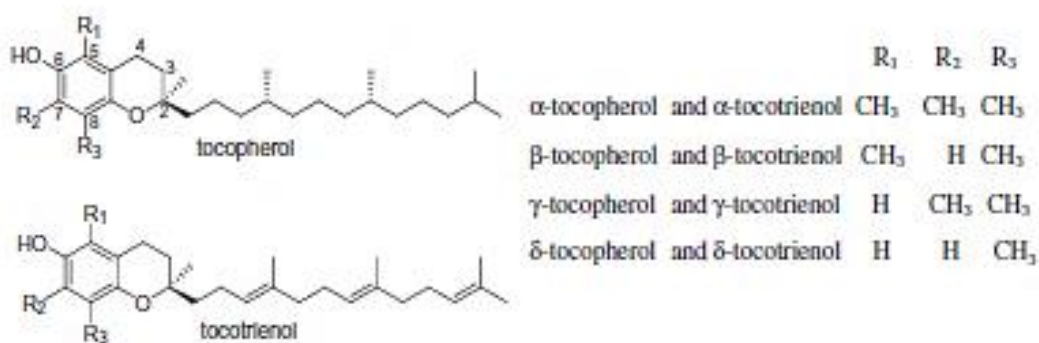
**Tabla 4. Criterios presentados por el proyecto ReDO para la selección de medicamentos con viabilidad de reposicionamiento farmacológico.** Modificado a partir de Pantziarka et al., 2014.

<b>Criterios de selección para reposicionamiento de fármacos</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>- La molécula/compuesto debe ser bien conocida durante una gran cantidad de años y ampliamente usada en la clínica. Por ejemplo, los medicamentos genéricos, que poseen una ventaja mayor.</li><li>- El fármaco debe poseer un buen perfil toxicológico, incluso cuando se usa por largos periodos de tiempo (baja toxicidad).</li><li>- Se debe conocer el mecanismo o tener un mecanismo putativo y un blanco de acción establecidos que ejerza una potencial actividad antitumoral.</li><li>- Se debe demostrar evidencia de su actividad anti-cancer y anti-tumoral a través de ensayos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>.</li><li>- La actividad antitumoral debe mostrarse en dosis estándar con baja toxicidad.</li><li>- La molécula promisorio con actividad anti-tumoral no debe ser conocida ni perseguida como un compuesto activo en las terapias convencionales del cáncer.</li></ul>

Por lo tanto, el reposicionamiento farmacológico se presenta como una importante alternativa a la disminución de la productividad del desarrollo de fármacos en el campo de la oncología, como estrategia para reducir los tiempos de desarrollo y como fuente de tratamientos de bajo costo para satisfacer las crecientes demandas y necesidades urgentes e insatisfechas de los pacientes con cáncer, especialmente con LMC resistente a las terapias convencionales (Mudduluru et al., 2016)

## 5.2. La Vitamina E y sus derivados en el tratamiento de la LMC

La Vitamina E fue descubierta por Herbert McLean Evans y Katharine Scott Bishop en 1922 a partir de un estudio que realizaron sobre los requerimientos nutricionales de las ratas (Evans & Bishop, 1992). La vitamina E es una vitamina liposoluble y representa un micronutriente esencial para preservar el equilibrio entre las reacciones antioxidantes y pro-oxidantes en los tejidos principalmente en las membranas celulares (Constantinou et al., 2008). Esta vitamina pertenece a la familia de compuestos poliprenoides y se compone de un anillo aromático, con un grupo hidroxilo y una cadena polipreniide (saturada o insaturada). Inicialmente, se investigó la vitamina E para la prevención del cáncer, basados en la capacidad antioxidante que posee este compuesto. Los estudios se realizaron utilizando una suplementación crónica de vitamina E y posteriormente, se evaluó a largo plazo, la influencia de esta vitamina en la incidencia de algunos tipos de cáncer. Sin embargo, las investigaciones determinaron que no había ningún efecto protector y/o terapéutico con su uso y que, por el contrario, ejercía un efecto perjudicial (Bjelakovic et al., 2007; Gupta-Elera et al., 2012; Hecht et al., 2016; Heckl et al., 2014; Su et al., 2012). A pesar de estos resultados, la evidencia en la literatura sugiere que algunas isoformas específicas de la vitamina E poseen actividad anticancerígena y está estrechamente asociada con su capacidad para inducir la apoptosis (Constantinou et al., 2012). La familia natural de la vitamina E consta de dos grupos estructurales: los tocoferoles con una cadena lateral isoprenoide saturada y los tocotrienoles con una cadena lateral insaturada. Específicamente, las isoformas de la vitamina E comprenden  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -tocoferol y  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -tocotrienol (Figura 12) (Colombo, 2010; Koufaki, 2016).



**Figura 12. Estructura química de compuestos de la familia de la Vitamina E:** Tocoferoles y tocotrienoles, sus isoformas y cadenas laterales. Tomado de Koufaki (2016).

Las isoformas naturales de la vitamina E tienen tres grupos principales con funciones biológicas distintas. El primero es el dominio funcional, compuesto por el grupo hidroxilo, el cual es activo en los fenómenos de óxido-reducción y está presente en todos los tocoferoles y tocotrienoles; este dominio es el responsable de su actividad antioxidante y puede ser modificado para producir derivados del tocoferilo o tocotrienol. Por ejemplo, el  $\alpha$ -tocoferol cuando se esterifica con un motivo succinil se produce  $\alpha$ -tocoferil succinato ( $\alpha$ -TOS) (Constantinou et al., 2008). El segundo es el dominio de señalización, que comprende los anillos aromáticos, los cuales se han visto implicados en la regulación de algunas vías de señalización y finalmente, el dominio hidrófobo, responsable de la unión de las isoformas de vitamina E a las lipoproteínas circulantes y a las membranas biológicas. Además, se ha descrito que la estructura de la cadena alifática puede desempeñar un papel en las propiedades apoptóticas de las isoformas de vitamina E (Figura 13) (Constantinou et al., 2008; Wang et al., 2006; Abraham et al., 2019)

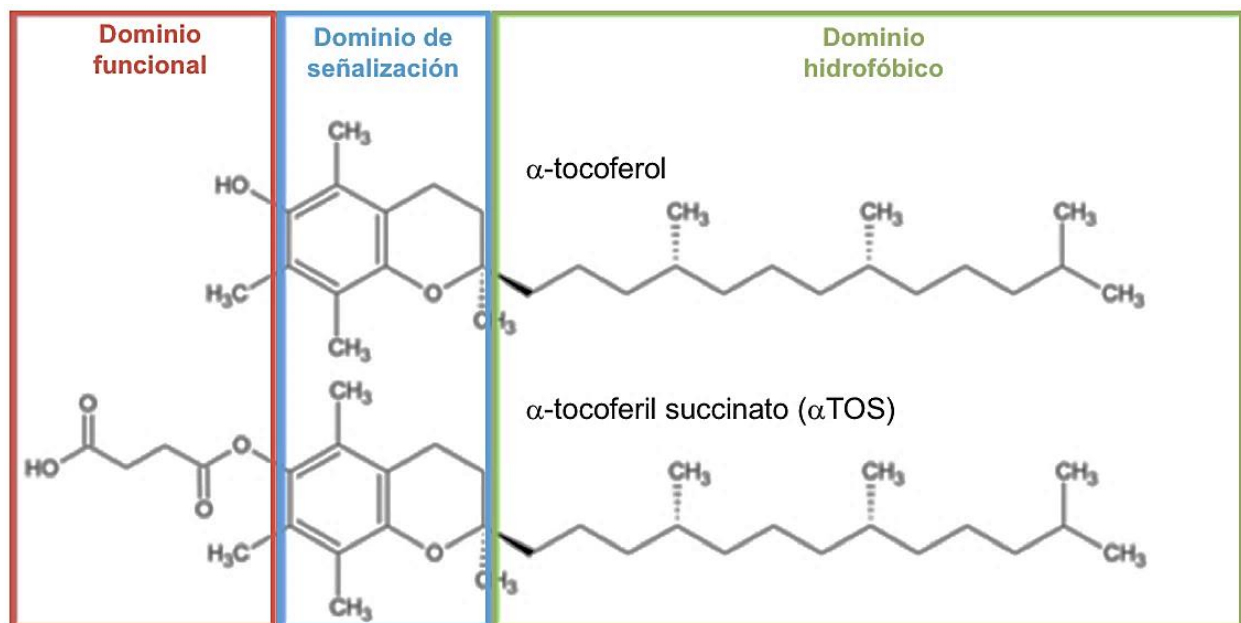


Figura 13. Estructura química de la vitamina E (isoforma  $\alpha$ ) y principales derivados ( $\alpha$ -TOS) y dominios comprometidos en actividades biológicas. Tomada de Koudelka et al., 2015

Las isoformas naturales de la vitamina E exhiben una gran homología estructural y tienen funciones similares, por ejemplo, la actividad antioxidante. Las propiedades antioxidantes de las isoformas de la vitamina E se le han atribuido a su anillo heterocíclico 6-hidroxicromano, responsable de la actividad *scavenger* de radicales y radicales provenientes de lípidos peroxidados (Burton y Ingold, 1986; van Acker et al., 1993). Sin embargo, numerosos estudios también sugieren que poseen actividades biológicas distintas como anti-cancerígenas contra



varios tipos de cáncer incluyendo cáncer de mama, próstata, pulmón, colon, gástrico y ovárico y se ha encontrado que afectan las vías de señalización involucradas en la supervivencia y proliferación regulando dichos procesos (Constantinou et al., 2012; Zingg & Azzi, 2004; Andreadou et al., 2006; Engin, 2009). Por lo tanto, la investigación en los últimos años se ha centrado en las variaciones estructurales del dominio funcional de las isoformas naturales de la vitamina E con el objetivo de mejorar la potencia pro-apoptótica de estos agentes y mejorar su biodisponibilidad. Los derivados sintéticos del  $\alpha$ -tocoferol, como el  $\alpha$ -TOS, han demostrado una mayor potencia pro-apoptótica y una acción anticancerígena en células tumorigénicas y modelos animales (Neuzil, 2004; Zhao et al., 2007). La actividad anticancerígena de  $\alpha$ -TOS está mediada a través de diversos mecanismos que implican la generación de EROs (Wang et al., 2005). Sin embargo, a pesar de estos excelentes resultados, el  $\alpha$ -TOS tiene un inconveniente para su aplicación, ya que el compuesto presenta una baja solubilidad, que limita su eficacia terapéutica. Interesantemente, se han realizado modificaciones químicas del  $\alpha$ -TOS, como la conjugación con polietilenglicol (PEG) que mejora la solubilidad y la biodisponibilidad permitiendo el diseño de nuevas moléculas con una mayor solubilidad y capacidad de inducción de apoptosis (Youk et al., 2005).

En este sentido, el  $\alpha$ -tocoferol ha demostrado poseer la mejor biodisponibilidad y solubilidad debido a su alta afinidad con la proteína de transferencia del  $\alpha$ -tocoferol y su baja tasa metabólica, mientras que otras formas como la  $\gamma$ - y  $\delta$ -tocoferol y el  $\gamma$ -tocotrienol poseen mayor actividad antiinflamatorias comparadas con el  $\alpha$ -tocoferol (Eidelman et al., 2004; Shen & Ji, 2012; Koufaki, 2016). Además, estas isoformas han mostrado que el efecto antiproliferativo se presenta por inducción de la apoptosis y arresto del ciclo celular, mediada por la activación de las caspasas 9, 3 y la ciclina D1 que conlleva al arresto del ciclo celular entre las fases G1 y S (Ju et al., 2010; Ling et al., 2012).

Otra de las ventajas del  $\alpha$ -tocoferol con respecto a las otras isoformas, es que está protegido por una proteína transferencia de  $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha$ -tocopherol transfer protein,  $\alpha$ -TTP, por sus siglas en inglés), la cual le permite que sea transportado hasta el hígado donde es metabolizado a través de CYP450 mediante  $\omega$ -hidroxilación u oxidación de la cadena lateral, teniendo como metabolito final el 3' carboxicromanol o el 2'-carboxietil-6-hidroxicromano y la porción de la vitamina E es también metabolizada por medio de sulfatación en el hígado (Jiang, 2014; Miyazawa et al., 2009; Meganatha y Fu, 2016; Manor y Morley, 2007).

Con el descubrimiento de la actividad antiproliferativa de los tocoferoles y sus análogos, los químicos orgánicos se inspiraron en el desarrollo de rutas de síntesis y modificaciones con

grupos funcionales que mejoraran su biodisponibilidad y solubilidad sin alterar su función biológica. Estas modificaciones llevaron al reconocimiento de una nueva familia de compuestos denominados análogos de la vitamina E (Vitamin E analogues, VEAs por sus siglas en inglés), como el  $\alpha$ -tocoferol succinato ( $\alpha$ -TOS), un análogo soluble del  $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha$ -TOH) y el  $\alpha$ -tocoferoxil-ácido acético ( $\alpha$ -TEA). (Angulo-Molina et al., 2014). Estudios con el análogo soluble del  $\alpha$ -tocoferol, y el  $\alpha$ -TOS mostraron actividad anticancerígena, en células de cáncer colorectal vía p21Waf1/Cip1, y en línea transformada de células T vía c-JUN y la proteína de unión nuclear AP1 que desencadenaron la apoptosis en estos modelos de cáncer (Chinery et al., 1997; Qian et al., 1997). Específicamente, el  $\alpha$ -TOS, compuesto semisintético derivado de la sustitución de uno de los grupos hidroxilo de la cabeza del  $\alpha$ -tocoferol-con un grupo succinato, ha mostrado potentes propiedades antineoplásicas, sin embargo, una de las principales limitaciones para su uso es su vulnerabilidad a las esterasas lo que dificulta su uso vía oral (Zingg, 2007). Asimismo, el  $\alpha$ -TOS ha sido documentado, además, de inductor selectivo de la apoptosis en células cancerosas, también como un *mitocan* que ataca específicamente el complejo II de la mitocondria, generando EROs (Neuzil et al., 2004; Neuzil et al., 2006).

Interesantemente, la modificación química del  $\alpha$ -TOS, ha permitido la formación de nuevas moléculas con mejores propiedades (v.gr. aumento de la solubilidad, mayor capacidad de inducción de apoptosis). Por ejemplo, la conjugación con polietilenglicol (PEG) mejora la solubilidad y la biodisponibilidad (Youk et al., 2005).

### **5.3 El D- $\alpha$ -tocoferol succinato (TPGS) en la terapia de la LMC**

Uno de los derivados más utilizados del  $\alpha$ -TOS es el conjugado con el polietilenglicol 1000, denominado TPGS (D- $\alpha$ -tocoferol polietilenglicol 1000 succinato). De hecho, el D- $\alpha$ -tocoferol succinato (TPGS) es un derivado sintético de la vitamina E, soluble en agua, que es capaz de potenciar la absorción y la biodisponibilidad de ciertos fármacos y en años recientes, se ha empleado como surfactante no iónico que es capaz de formar micelas estables en medios acuosos en concentraciones menores al 0,02% (peso/peso) (Guo et al., 2013; Palao-Suay et al., 2015). EL TPGS se sintetiza a partir de la esterificación del  $\alpha$ -TOS con el PEG (generalmente con un peso molecular de 1000) (Youk et al., 2005), es así que la molécula completa de TPGS tiene un peso molecular medio de 1513 (Zhang et al., 2010; Zhang et al., 2012). Estructuralmente, el TPGS es una molécula anfifílica, con una cola alquílica lipofílica ( $\alpha$ -tocoferol) y una cabeza polar hidrófila (PEG1000) (Figura 14). A temperatura ambiente tiene la

aparición de un sólido ceroso y puede disolverse completamente en agua (Wu y Hopkins, 1999; Neophytou & Constantinou, 2015). Es importante destacar que la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) (Duhem et al., 2014), así como la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), ya han aprobado el TPGS como un adyuvante farmacéutico seguro usado para la formulación de fármacos y han estimado los límites de seguridad con fines de investigación (Neophytou et al., 2014). De manera interesante, en 2005 el grupo de Youk y colaboradores demostraron que el TPGS, usado como agente único, era capaz de eliminar las células tumorales en un modelo in vitro de carcinoma pulmonar, a través de la formación de EROs y la posterior inducción de apoptosis en las células malignas. Adicionalmente, se demostró que el TPGS es más potente y efectivo que el  $\alpha$ -TOS (Youk et al., 2005). El TPGS también puede actuar de forma sinérgica con otros medicamentos anticancerígenos induciendo apoptosis, (Mi et al., 2011). De igual forma, se ha sugerido que el mecanismo de acción antiproliferativo del TPGS puede estar relacionado con un ataque selectivo a la mitocondria (mitocan), que finalmente desencadenara un proceso de muerte celular por apoptosis, este posible mecanismo se propone gracias a la información que existe respecto a otros derivados de la vitamina E, con estructura química similar (Youk et al., 2005). Respecto a otros derivados de la vitamina E, se ha descrito que TPGS induce apoptosis y genera especies reactivas de oxígeno de forma más efectiva que el  $\alpha$ -TOS (Youk et al., 2005).

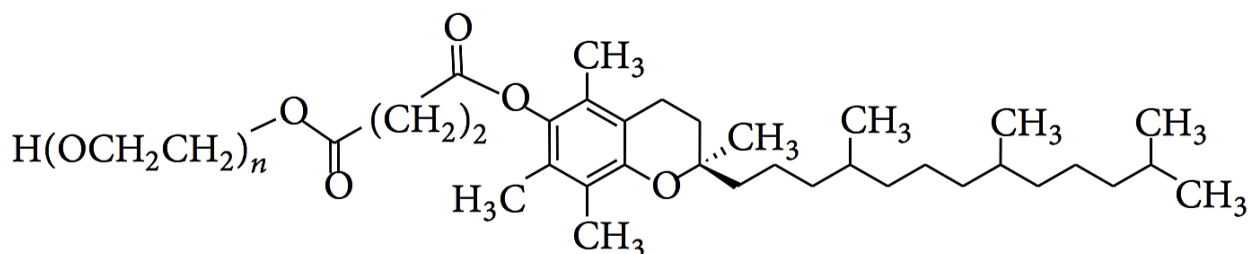


Figura 14. Estructura química del D- $\alpha$ -tocoferol polietilenglicol 1000 succinato (TPGS). Tomado de Guo et al. (2013)

A pesar de los avances de los mecanismos de acción del TPGS en células cancerígenas, las características y blancos biológicos de cada uno de los grupos funcionales de la molécula no han sido explorados a profundidad, no se ha descrito completamente el mecanismo molecular por el cual la molécula actúa una vez ingresa a la célula y ataca la mitocondria en la mayoría de los modelos estudiados de cáncer.

Estudios posteriores han descrito resultados prometedores en modelos *in vitro* de cáncer prostático y cáncer de seno (Constantinou et al., 2012; Neophytou et al., 2014). Asimismo, a pesar que los resultados previos indican que el TPGS es capaz de inducir ambas vías de la apoptosis (dependientes e independientes de las caspasas) (Constantinou et al., 2012), el mecanismo preciso mediante el cual ejerce sus propiedades anti-tumorales está aún bajo investigación. Interesantemente, estudios recientes realizados por Ruiz-Moreno & colaboradores en el 2016 demostraron que el TPGS induce selectivamente apoptosis mediada por EO en el modelo de la línea celular Jurkat de leucemia linfoblástica aguda (LLA) (Ruiz-Moreno et al. 2016). A pesar de los buenos hallazgos obtenidos con el TPGS en el modelo *in vitro* de LLA, hasta la fecha, se desconoce su potencial anti-tumoral en la LMC.

Con el conocimiento de las ventajas del reposicionamiento del fármaco en cuanto a la seguridad, a los bajos costos y facilidad para adquirir la molécula, además de su versatilidad y posible efecto sinérgico con otro tipo de fármacos quimioterapéuticos posicionan al TPGS como una molécula prometedora para su evaluación en estudios preclínicos como alternativas terapéuticas para los pacientes con LMC resistentes o con mala respuesta al tratamiento, que permitan mejorar la calidad de vida de los pacientes con esta resistencia a los tratamientos convencionales. Por lo anterior, nos proponemos evaluar la capacidad anti-leucémica del TPGS como molécula de reposicionamiento en el modelo *in vitro* K562 de LMC de mal pronóstico, permitiendo modelar mutaciones que posiblemente generen pobre respuesta a los tratamientos y determinar el papel del EO como un mediador efectivo para la eliminación de estas células cancerosas.

## CAPÍTULO 6: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

La leucemia es un trastorno hematológico que ocupa el décimo lugar entre los tipos de cáncer con mayor incidencia y mortalidad en el mundo. La LMC afecta globalmente a 100.000 personas cada año, con una prevalencia superior al 15 % entre todas las leucemias. En Colombia, se espera que la población que padece LMC se incremente a 3200 personas para el 2021, este aumento en casos, junto con los altos costos del tratamiento de los pacientes convierten esta enfermedad en un problema de salud pública en nuestro país.

El tratamiento más efectivo para la leucemia mieloide crónica en la actualidad, son los inhibidores de tirosina quinasa, que compiten por el sitio de unión del ATP en la quinasa BCR-ABL y de esta manera impide que fosforilen otras proteínas. El imatinib o Gleevec, fue el primero en desarrollarse, desafortunadamente algunos pacientes presentan nuevas mutaciones en la proteína, mostrando resistencia al tratamiento con inhibidores de tirosina quinasa de segunda y tercera generación. Adicionalmente, el imatinib es un medicamento con un costo elevado y el tratamiento con este fármaco es vitalicio. Esto significa, que para el 2021, más de 3200 personas en Colombia dependerán de la administración diaria de imatinib por el resto de su vida, lo cual representa grandes costos para la familia y el sistema de salud. De manera preocupante, hasta el momento, el imatinib le ha costado 400 mil millones de pesos al sistema de salud colombiano, por lo que surge la necesidad de estrategias alternativas que abaraten costos ante la problemática creciente que se presenta en el panorama nacional.

Teniendo en cuenta que un 15 a 20% de los pacientes son resistentes o refractarios al tratamiento con imatinib (Hochhaus et al., 2017; Shibata et al., 2019), y el elevado costo del medicamento actual, se hace necesario el estudio de nuevas estrategias terapéuticas de reposicionamiento que disminuyan los costos del tratamiento y más importante aún, disminuyan la resistencia que han presentado algunos pacientes al tratamiento con imatinib y los inhibidores de tirosina quinasa de segunda y tercera generación.

La estrategia del reposicionamiento de fármacos ofrece grandes beneficios sobre el desarrollo tradicional de fármacos como fue descrito anteriormente (principalmente en la reducción en el tiempo y costo de evaluación de los principios activos) (Gupta et al., 2013; Oprea et al., 2011). Son múltiples los fármacos y los mecanismos de acción que presentan potencial como agentes terapéuticos en el tratamiento de la LMC; sin embargo, aquellos fármacos que son capaces de

inducir la muerte de las células cancerosas por apoptosis, representan una alternativa interesante para el tratamiento de LMC.

Es por esto, que el estudio de moléculas con actividad prooxidante es considerado una oportunidad importante para implementar terapias efectivas en el tratamiento de la LMC. Dentro de los compuestos que ya han sido aprobados para su uso en humanos, pero que aún no se les ha dado una aplicación en la LMC se encuentran el TPGS. En este sentido, el TPGS (D- $\alpha$ -tocoferol polietilenglicol succinato) es un derivado sintético de la vitamina E, con características anfifílicas, soluble en agua, que es capaz de potenciar la absorción y la biodisponibilidad de ciertos fármacos y en años recientes, se ha empleado para la construcción de sistemas para el suministro de fármacos en modelos de cáncer de mama e hígado (Li. et al., 2019; Chen et al., 2020). De igual forma, ha mostrado capacidad de inducir apoptosis en otros tipos de cáncer como colon, próstata y en un modelo *in vitro* de LLA (mediante inducción de estrés oxidativo y activación de moléculas pro-apoptóticas (Ruiz-Moreno et al., 2016).

De acuerdo al potencial que representa este compuesto dentro del desarrollo de fármacos efectivos para combatir la LMC en pacientes resistentes a los medicamentos convencionales, resulta justificado investigar si el TPGS es capaz de eliminar las células leucémicas de manera efectiva permitiendo registrar un precedente para su posterior evaluación en modelos animales.

### **6.1. Pregunta de investigación**

¿Podría el TPGS inducir apoptosis en células K562 y ser utilizado como una alternativa terapéutica para la leucemia mieloide crónica? .

### **6.2. Hipótesis**

El TPGS induce apoptosis en células cancerosas mediada por mecanismos de señalización desencadenados por estrés oxidativo en un modelo *in vitro* de leucemia mieloide crónica.

### **6.3. Objetivo general**

Determinar la capacidad del TPGS en la inducción de apoptosis en un modelo *in vitro* de leucemia, como potencial agente terapéutico en el tratamiento de la LMC.

### **6.4. Objetivos específicos**

1. Evaluar el efecto citotóxico del TPGS sobre el potencial de membrana mitocondrial, ciclo celular y la integridad nuclear en el modelo de K562.

2. Evaluar el efecto prooxidante del TPGS sobre la producción de EROs y la oxidación de proteínas sensoras de EO en el modelo de K562.
3. Determinar el efecto señalizador del TPGS sobre proteínas de muerte/supervivencia mitocondrial BAX, BCL-2 y PUMA en el modelo de K562.
4. Determinar el efecto activador del TPGS sobre proteínas de factores de transcripción y efectores de muerte c-JUN y CASPASA 3 en el modelo de K562.
5. Evaluar el efecto proapoptótico del TPGS e inhibición farmacológica *in vitro* de efectores de muerte (CASPASA-3 y JNK) y antioxidantes en la inducción de apoptosis en el modelo de K562.

## CAPÍTULO 7: DESARROLLO DE LOS OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

### 7.1. MATERIALES Y MÉTODOS.

#### 7.1.1. Cultivo de la línea celular K562 y reactivos

Las células K562 (ATCC, Número de catálogo CCL-243TM; Manassas, Virginia, USA) fueron cultivadas de acuerdo a las indicaciones del proveedor. Las células en suspensión ( $1 \times 10^6$  células/pozo en 1 mL de volumen final) se expusieron a concentraciones incrementales de D- $\alpha$ -tocoferol polietilenglicol 1000 succinato (TPGS, CAS Number 9002-96-4, Sigma Aldrich, St Louis, Missouri, USA) en concentraciones (TPEN 10, 20, 40, 60 y 80  $\mu$ M) según Ruiz-Moreno et al. (2016), preparado a partir de una solución en PBS almacenada a  $-20^\circ\text{C}$  en alícuotas, en ausencia o presencia de diferentes productos de interés (antioxidante, N-acetilcisteína, NAC; y los inhibidores de CASPASA 3 (1-(4-metoxibenzil)-5[2-(piridin-3-il-oximetil) pirrolidina-1-sulfonyl]-1H-indol-2,3-diona, NSCI; inhibidor de JNK (1,9- pirazolantrona), SP600125) durante 24h a  $37^\circ\text{C}$ . 3,3'- yoduro de dihexiloxacarbocianina (DiOC6(3)), cat # D-273, Thermo Fisher Scientific Inc.) y 1,9- pirazolantrona (SP600125, cat # 420119) fueron comprados en Calbiochem (Merck Millipore). 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH2-DA) se adquirió en Invitrogen. Yoduro de propidio fue adquirido de BD Bioscience (San Jose, CA). Otros reagentes fueron comprados en Sigma-Aldrich (St Louis, Missouri, USA).

#### 7.1.2. Análisis del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) utilizando citometría de flujo

Células en suspensión ( $1 \times 10^6$  células/pozo en 1 mL de volumen final) se expusieron a concentraciones incrementales de TPGS (10-80  $\mu$ M) por 24 h a  $37^\circ\text{C}$ . Para evaluar el  $\Delta\Psi_m$ , se incubaron células ( $1 \times 10^5$ ) durante 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad con el colorante lipofílico catiónico 3,3'- yoduro de dihexiloxacarbocianina [(DiOC6(3), 10 nM concentración final] (Calbiochem, Darmstadt, Germany; cat # D-273) y el agente intercalante yoduro de propidio (PI, 12.5ng/mL, concentración final) de acuerdo a Ruiz-Moreno et al. (2018). El  $\Delta\Psi_m$  fue medido por la retención de DiOC6 (3), el cual es incorporado selectivamente por la mitocondria y refleja el mantenimiento de  $\Delta\Psi_m$  (ex. 450-490 nm, em. 515 nm). Las células se analizaron en un citómetro LSRFortessa (BD Biosciences, San Jose, CA). Estos experimentos se realizaron tres veces por duplicado, adquiriendo 10000 eventos para el análisis. El programa FlowJo 7.6.2. se utilizó para obtener todos los datos cuantitativos.



### **7.1.3. Evaluación morfológica de la muerte celular empleando microscopía de fluorescencia**

Células en suspensión ( $1 \times 10^6$  células/pozo en 1 mL de volumen final) se expusieron a concentraciones incrementales de TPGS (10-80  $\mu\text{M}$ ) por 24 h a  $37^\circ\text{C}$ . Los núcleos fueron teñidos durante 20 minutos con el colorante Hoechst 33342 (1  $\mu\text{M}$ ) a  $37^\circ\text{C}$  en oscuridad. Los análisis de microscopía de fluorescencia y cuantificación de morfología apoptótica como condensación de la cromatina (morfología nuclear tipo I) y fragmentación (morfología nuclear tipo II) se realizó con un microscopio de fluorescencia Zeiss Axiostart 50 con una cámara Zeiss AxioCam Cm1 (Zeiss Wöhlk-Contact-Linsen, Gmb Schöckirchen, Alemania). El ajuste de imágenes obtenidas se realizó con el software del proveedor (ZEN 2 Core) acorde a Rojas-Valencia et al. (2017)

### **7.1.4. Determinación de la fragmentación del ADN y análisis del ciclo celular por citometría de flujo**

La fragmentación del ADN se determinó utilizando una solución hipotónica de yoduro de propidio (PI) BD Bioscience, San Jose, California, USA) como se describe en Rojas-Valencia et al. (2017). Brevemente, se usaron células en la fase sub-G0 del ciclo celular como marcadores de apoptosis y fragmentación nuclear. Después del tratamiento en presencia o ausencia de TPGS (10-80  $\mu\text{M}$ ), células ( $3 \times 10^5$ ) se lavaron dos veces con una solución de PBS (pH 7.2) y se almacenaron en etanol 95% durante toda la noche a  $-20^\circ\text{C}$ . Posteriormente, las células fueron lavadas y suspendidas en 500  $\mu\text{L}$  de una solución que contiene PI (50  $\mu\text{g/ml}$ ), RNasa A (100  $\mu\text{g/ml}$ ), EDTA (50 mM), and Triton X-100 (0.2%) por 30 minutos  $37^\circ\text{C}$ . Se analizó para determinar la fluorescencia del PI en la suspensión de células utilizando un citómetro de flujo LSRFortessa (BD Biosciences, San Jose, CA). Los datos cuantitativos de contenido de ADN y población subG1 se obtuvieron utilizando el software de análisis de datos FlowJo 7.6.2.

### **7.1.5. Evaluación de los niveles de peróxido de hidrógeno intracelular ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) utilizando citometría de flujo**

El  $\text{H}_2\text{O}_2$  se determinó con la sonda fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (1  $\mu\text{M}$ , DCFH2-DA). Brevemente, después del tratamiento en presencia o ausencia de TPGS (10-80  $\mu\text{M}$ ), células ( $3 \times 10^5$ ) se incuban durante 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$  en la oscuridad acorde a Mendivil-Pérez et al. (2012). Posteriormente, se realizaron dos lavados con PBS y se determinó la fluorescencia de DCF usando un citómetro de flujo LSRFortessa (BD Biosciences, San Jose,

CA). La evaluación se repitió dos veces en experimentos independientes. Los datos cuantitativos y las cifras se obtuvieron utilizando el software de análisis de datos FlowJo 7.6.2.

### **7.1.6 Evaluación de la actividad antioxidante y farmacológica en conjunto con TPGS en células K562.**

Células K562 en suspensión ( $1 \times 10^6$  células/pozo en 1 mL de volumen final) se trataron en presencia o ausencia de TPGS (10-80  $\mu$ M) solo o en combinación con el antioxidante N-acetil-L-cisteína (NAC, 1 mM) o los inhibidores de CASPASA 3 (1-(4-metoxibenzil)-5[2-(piridin-3-il-oximetil) pirrolidina-1-sulfonyl]-1H-indol-2,3-diona (NSCI, 10  $\mu$ M), inhibidor de JNK (1,9-pirazolantrona) (SP600125, 1  $\mu$ M) de acuerdo a Soto-Mercado et al. (2020) a 37°C durante 24 h. A estas células se le evaluó  $\Delta\Psi_m$  utilizando citometría de flujo. El ensayo se repitió dos veces en experimentos independientes.

### **7.1.7. Evaluación de la oxidación del sensor de estrés oxidativo (DJ1-OX) y el marcador de muerte (CASPASA-3) empleando citometría de flujo**

Los datos de citometría de flujo para determinar los porcentajes células doble positivas DJ-1 oxidado/CASPASA-3 se tomaron usando células K562 en suspensión ( $1 \times 10^6$  células/pozo en 1 mL de volumen final) tratadas en presencia o ausencia de TPGS (10-80  $\mu$ M), fijadas en 95% de etanol, lavadas e incubadas simultáneamente con el anticuerpo primario anti-DJ-1 oxidado (1:500) y anti-CASPASA-3 (Millipore, cat #AB3623) antibodies primary antibodies (1:500) a 4°C durante toda la noche acorde a Soto-Mercado et al. (2020). La suspensión fue lavada e incubada con anticuerpos secundarios *DyLight 594 donkey anti-rabbit* y *DyLight 488 donkey anti-mouse* (1:500). Finalmente, se lavaron las células y se resuspendieron en PBS para el análisis en el citómetro de flujo LSRFortessa (BD Biosciences, San Jose, CA), adquiriendo 10000 eventos para el análisis. El programa FlowJo 7.6.2. se utilizó para obtener todos los datos cuantitativos.

### **7.1.8. Evaluación de factores de transcripción y marcadores pro-apoptóticos utilizando Western blot**

Células K562 en suspensión en presencia o ausencia de TPGS (10-80  $\mu$ M) se lisaron en buffer Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, con cloruro de sodio 150 mM, Igepal CA- 630 (NP-40) al 1,0% y dodecil sulfato de sodio al 0,1% y un cóctel inhibidor de proteasa (1 nM PMSF) (Sigma-Aldrich). Todos los lisados se cuantificaron utilizando el ensayo de ácido bicinonínico (Thermo Scientific cat n° 23225) y se cargaron 30  $\mu$ g de proteínas en geles de poliacrilamida al 10% y 12%, y se

transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Hybond-ECL, Amersham Biosciences) a 270 mA durante 90 min usando sistema de transferencia electroforética (BIO-RAD). Las membranas se incubaron durante la noche a 4°C con anticuerpos primarios. Para las señales proapoptóticas se utilizaron anticuerpos p-c-JUN (S63/ 73) (cat # sc-16312) and CASPASA-3 (Millipore, cat #AB3623) (1:5000). Las señales de muerte mitocondriales se determinaron con los anticuerpos policlonales de conejo BAX (cat # sc-493) y PUMA (cat # ab-9643) y BCL-2 (cat#13-8800, Thermofisher) (1:5000). Se utilizó anticuerpo anti-actina (1:10.000, nº de cat. MAB1501, Millipore) como control de la expresión de acuerdo a Soto-Mercado et al. (2020). Anticuerpos infrarrojos secundarios (IRDye 680CW *donkey anti mouse* y IRDye800CW *donkey anti-rabbit*, y *donkey anti-goat*, LICORBIOSciences) 1:10,000 se utilizaron como sondas secundarias, los datos se adquirieron mediante el uso del software *Odyssey Infrared Imaging System*. Para el cálculo de las intensidades de fluorescencia se utilizó el programa ImageJ y los experimentos se realizaron dos veces en experimentos independientes.

#### **7.1.9. Análisis estadístico**

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el análisis Student-t o ANOVA de una vía, seguido de la comparación post-hoc de Tukey calculada con el software científico GraphPad Prism 6 (GraphPad, Software, Inc. La Jolla, CA, EE. UU.). La significancia estadística fue aceptada en \* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$  y \*\*\*  $p < 0.001$ .

## 7.2 RESULTADOS DE LA INVESTIGACION.

### 7.2.1. Efecto citotóxico del TPGS sobre la alteración del potencial de membrana mitocondrial e inducción de fragmentación de ADN.

Como se muestra en la Figura 1, TPGS induce significativamente la fragmentación del núcleo (Fig. 1A vs Fig. 1B y Fig. 2A), además genera una despolarización de la mitocondria de forma dependiente de la concentración (Fig. 1C-E) y arresto del ciclo celular (Fig. 2B), de forma dependiente de la concentración. A partir de la concentración de 40  $\mu\text{M}$ , se observa una inducción de ~40% de apoptosis en las células K562, llevándola hasta un ~56% cuando se duplica esta concentración (80  $\mu\text{M}$ ). Por lo tanto, se seleccionaron las concentraciones de 40 y 60  $\mu\text{M}$  para los siguientes experimentos.

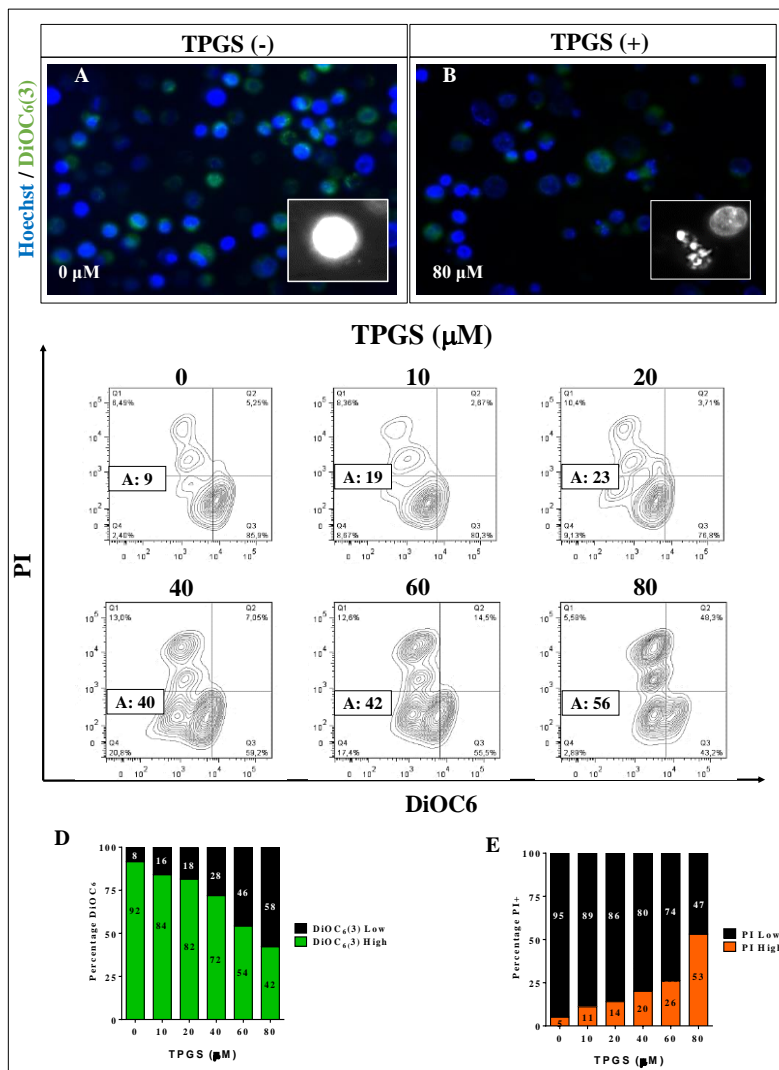
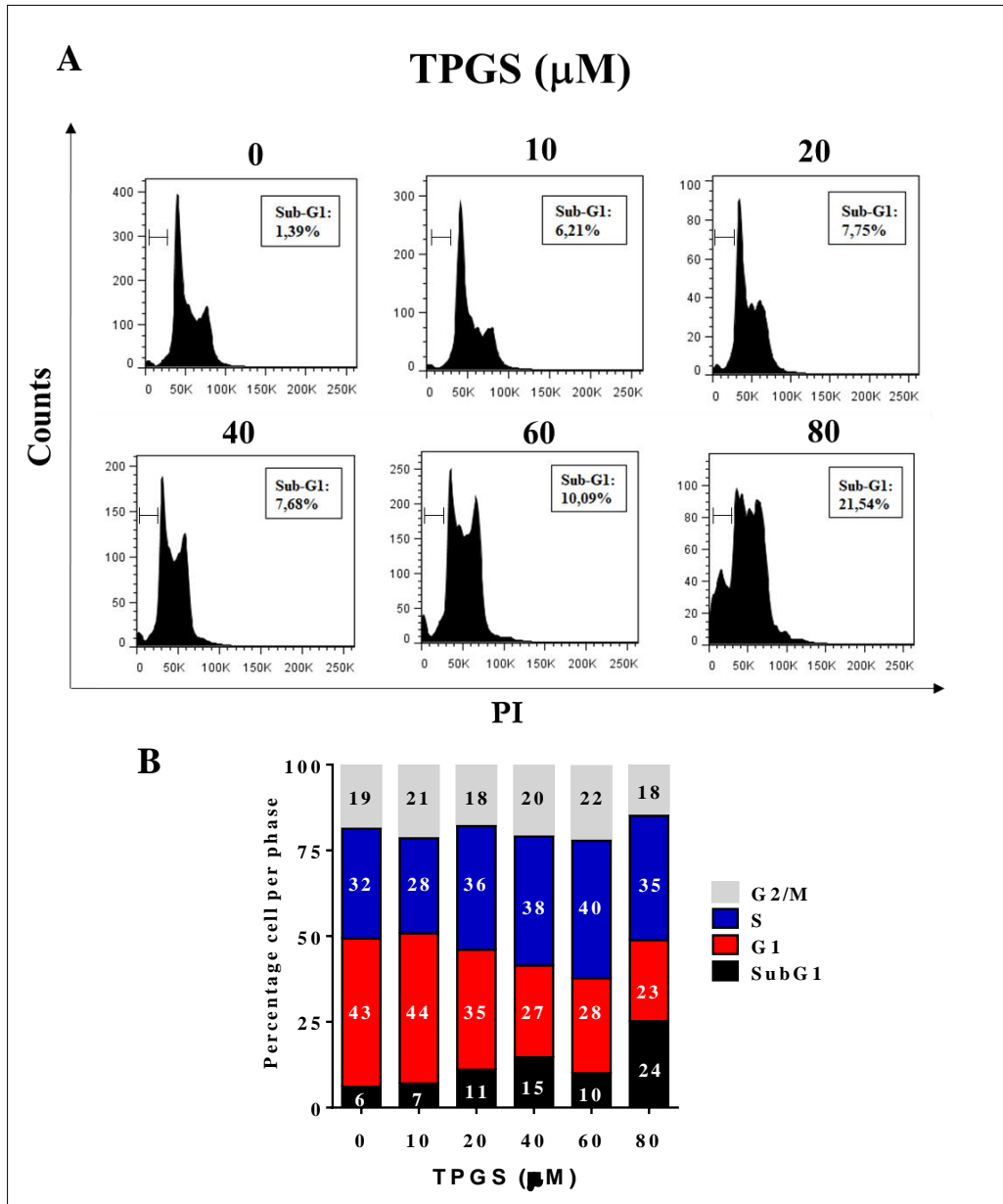


Figura 1. EL TPGS induce pérdida de  $\Delta\Psi\text{m}$  en células K562 y fragmentación nuclear en células K562 de forma dependiente de la concentración. Células K562 ( $1 \times 10^6$  células /pozo) se dejaron sin tratar (-) TPGS o fueron tratadas con concentraciones

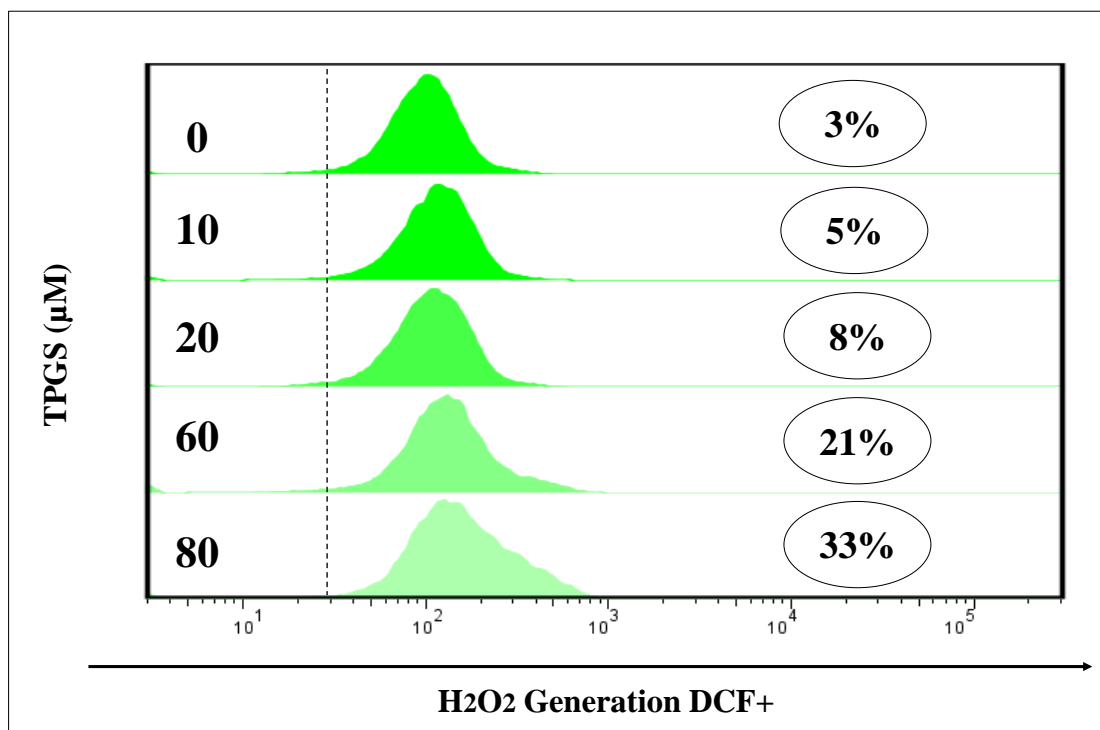
incrementales de (+) TPGS (10-80  $\mu\text{M}$ ) a 37°C por 24h. Después de este tiempo, las células se tiñeron con Hoechst (ex 354nm, em 442nm) y DiOC<sub>6</sub>(3) (ex 484, em 501) (A) Micrografía fluorescente representativa mostrando las células K562 sin tratamiento, con núcleos normales. (B) Micrografía fluorescente representativa mostrando células tratadas con TPGS (80  $\mu\text{M}$ ) mostrando fragmentación nuclear. (C) Gráfico de contornos representativo donde se muestra que TPGS induce pérdida de  $\Delta\Psi\text{m}$  de forma dependiente de la concentración evaluado por citometría de flujo de acuerdo con lo descrito en Materiales y métodos, (D) Histograma representativo de la disipación de  $\Delta\Psi\text{m}$  (barras negras). (E) Histograma representativo de la captación de yoduro de propidio (PI) (barras naranjas)



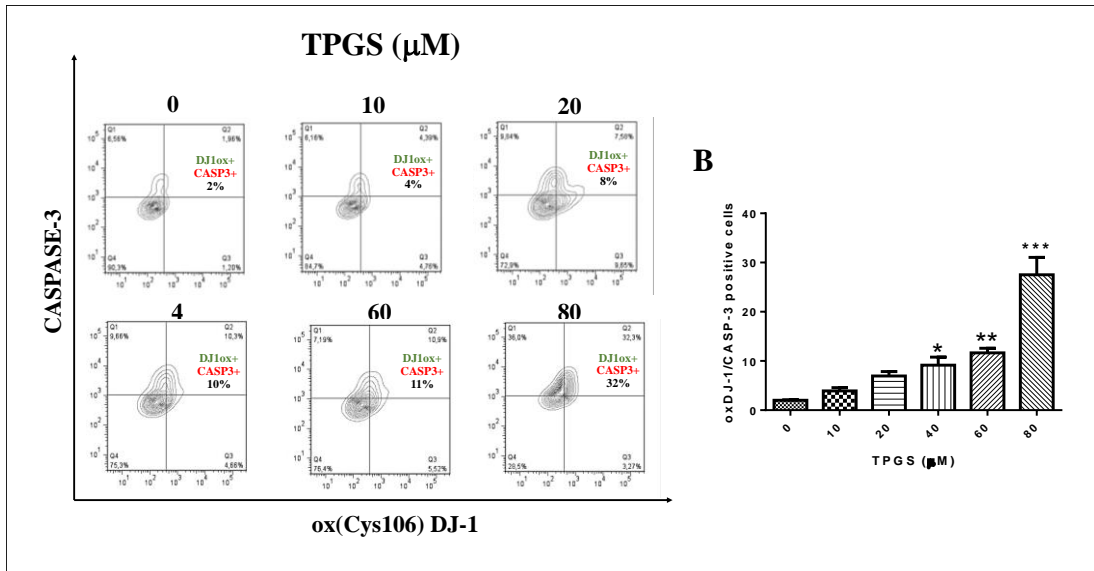
**Figura 2. El TPGS induce fragmentación nuclear y arresto del ciclo celular en fase S.** (A) Histograma representativo mostrando la población sub-G1 indicativo de la fragmentación del ADN. (porcentaje de la media  $\pm$  5% de la SD de tres experimentos independientes). (B) Histograma representativo del ensayo de ciclo celular mostrando que TPGS induce aumento de la población en fase S en concentraciones entre 40-60  $\mu\text{M}$  realizado acorde a Materiales y métodos.

### 7.2.2. Efecto prooxidante del TPGS sobre la proteína sensora DJ-1 y la formación de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

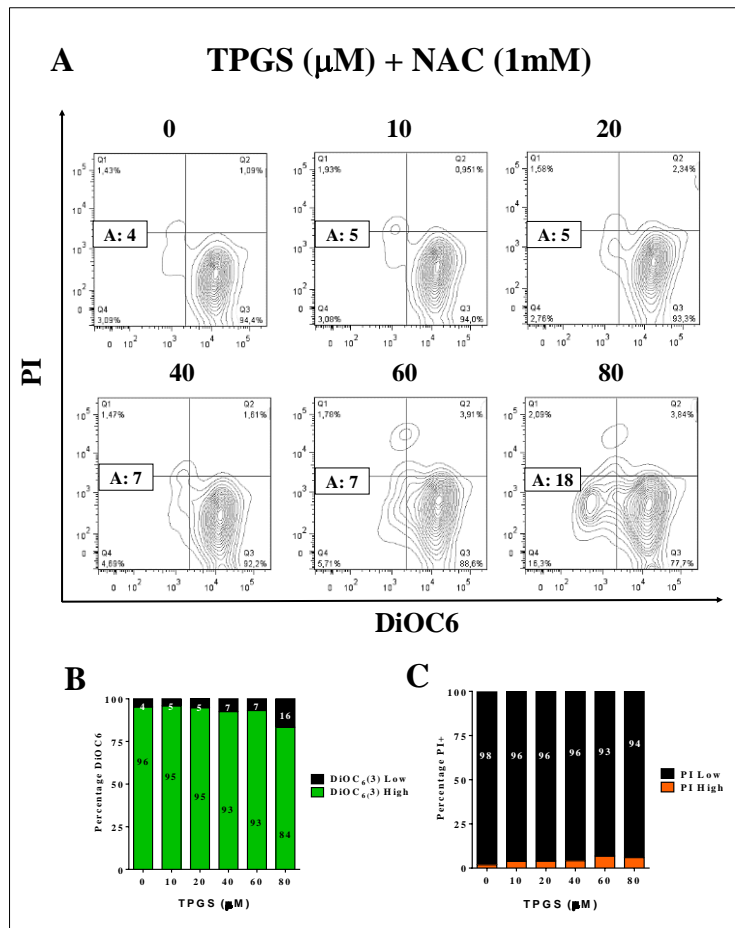
Como se muestra en la figura 3, el TPGS induce la generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) de forma dependiente de la concentración, aumentando la intensidad de fluorescencia en la células K562 (Fig. 3). Para confirmar que TPGS induce EROs, específicamente la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se examinaron los niveles del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y su actividad prooxidante sobre la proteína antioxidante, barredora y sensora de EO DJ1(Cys106) (Kinumi et al., 2004) (Fig. 3). Como se ilustra en la figura 4 el TPGS efectivamente, provoca oxidación de la proteína DJ-1(Cys-106) (Fig. 4) comparado con las células K562 en ausencia del TPGS y que esta oxidación se da como resultado de la generación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por el TPGS (Fig.3). Estas observaciones soportan que el EO, específicamente el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es producido por el TPGS (Fig.3), lo cual es confirmado con la utilización del NAC un compuesto antioxidante clásico, que reduce la oxidación de DJ-1(Cys-106) cuando las células K562 se encuentra expuesto a TPGS y de igual forma, con la dramática reducción de la pérdida del potencial de membrana mitocondrial que se observa en la Figura 5.



**Figura 3. El TPGS induce la generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) en células K562, de forma dependiente de la concentración.** Células K562 se incubaron en presencia o ausencia de TPGS (10-80μM) durante 24h. Histogramas representativos del porcentaje de células DCF+ tratadas con TPGS realizado de acuerdo a la sección de "Materiales y métodos", mostrando un aumento de los niveles de células K562 DCF+.



**Figura 4. EL TPGS induce oxidación de la proteína DJ-1 y activación de CASPASA-3 células K562 de forma dependiente de la concentración.** Células K562 ( $1 \times 10^6$  células /pozo) se dejaron sin tratar o fueron tratadas con concentraciones incrementales de TPGS (10-80  $\mu\text{M}$ ) a  $37^\circ\text{C}$  por 24h. (A). Gráfico de contornos representativo mostrando la población doble positiva DJ-1ox/CASPASA-3 (cuadrante B) (B). Cuantificación de los porcentajes de la población doble positiva mostrada en A.

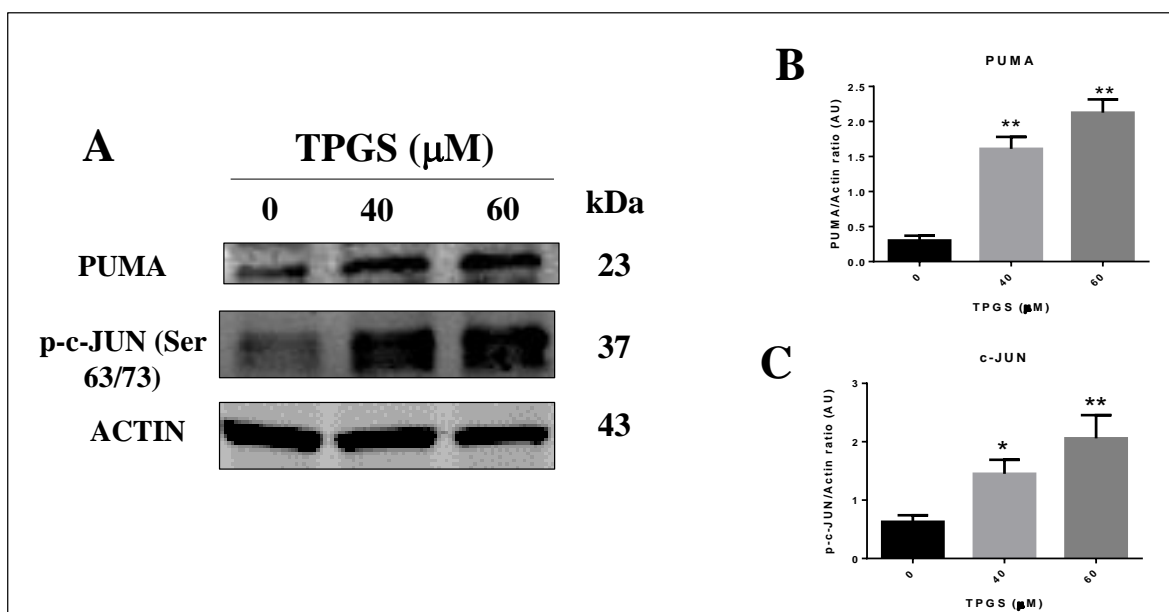


**Figura 5. El antioxidante NAC previene la pérdida del  $\Delta\Psi\text{m}$  inducido por TPGS en células K562.** Células K562 ( $1 \times 10^6$  células /pozo) se dejaron sin tratar o fueron tratadas con concentraciones incrementales de TPGS (10-80  $\mu\text{M}$ ) a  $37^\circ\text{C}$  por 24h en presencia

o ausencia del antioxidante NAC (1mM) (A) Gráfico de contornos representativo que muestra que TPGS en combinación con NAC previene la pérdida de  $\Delta\Psi_m$  de forma dependiente de la concentración empleando citometría de flujo de acuerdo a lo descrito en Materiales y métodos, (B) Histograma representativo de la disipación de  $\Delta\Psi_m$  (barras negras). (C) Histograma representativo de la captación de yoduro de propidio (PI) (barras naranjas).

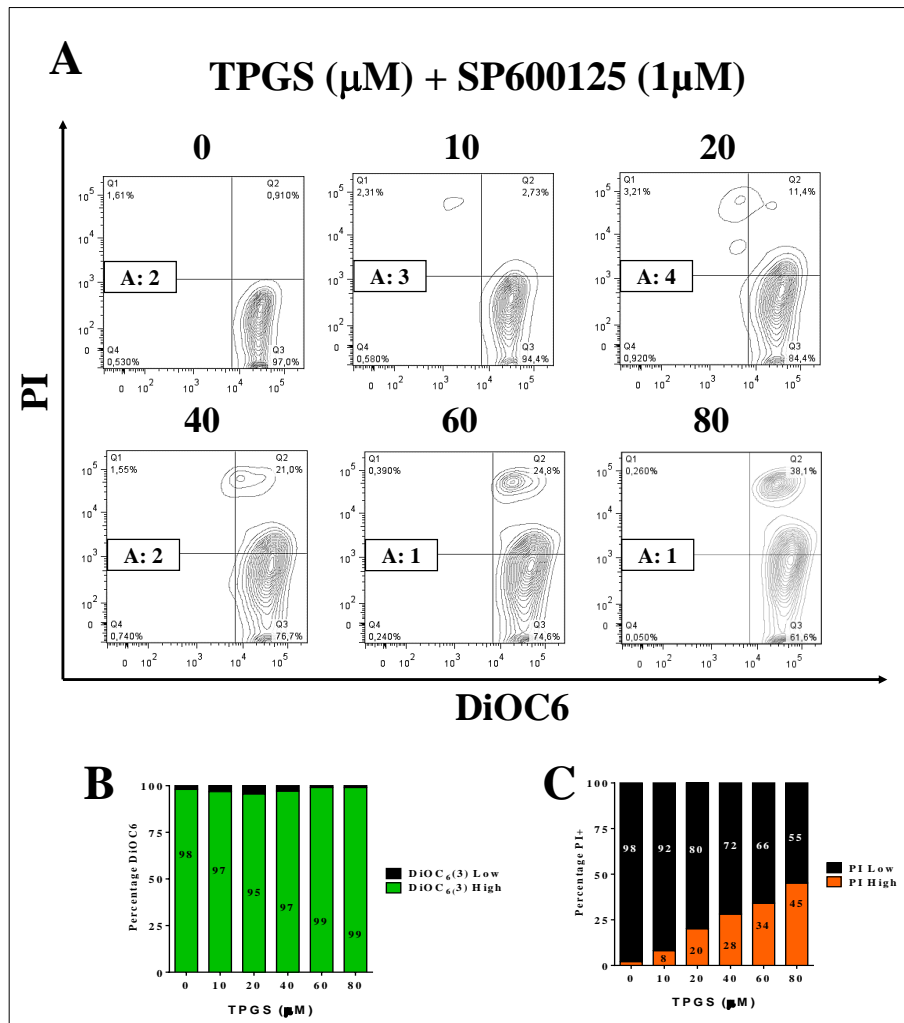
### 7.2.3 Efecto activador del TPGS en factores de transcripción, proteínas proapoptóticas y CASPASA-3 en K562

Posteriormente, se investigó si el TPGS era capaz de desencadenar la activación de un panel selecto de proteínas en respuesta a la apoptosis inducida por estrés oxidativo. Como se ilustra en la Fig. 6A, TPGS induce la expresión del factor de transcripción c-JUN, y de la proteína PUMA que se observa como un aumento significativo de la intensidad de fluorescencia en la proteína fosforilada en el residuo de serina 63/73 para este factor y en los niveles de expresión de la proteína pro-apoptótica PUMA (Fig. 6B, C) comparado con las células K562 en ausencia del TPGS (Fig. 6A-C). Interesantemente, la combinación del TPGS con el inhibidor selectivo de la quinasa JNK (SP600125) recupera el potencial de membrana mitocondrial, comparado con las células tratadas únicamente con TPGS (Fig. 7A-B); sin embargo, el colorante de exclusión yoduro de propidio (PI) continúa ingresando a la célula, lo que puede indicar que existe una restauración moderada de la membrana celular (Fig. 7).



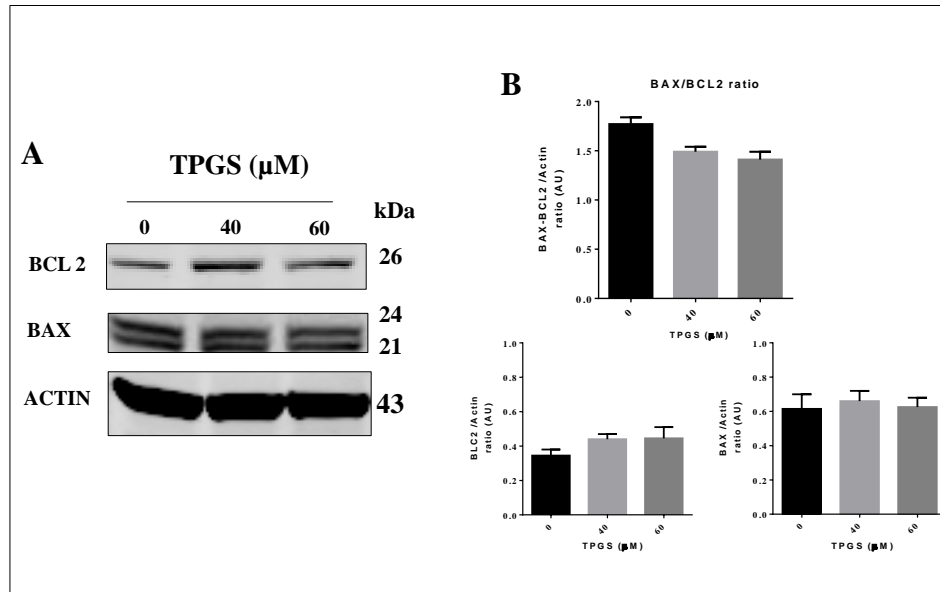
**Figura 6. EL TPGS aumenta la expresión de PUMA y c-JUN fosforilada en células K562.** Células K562 ( $1 \times 10^6$  células /pozo) se incubaron en ausencia o presencia del TPGS a 40 y 60  $\mu\text{M}$  a 37°C por 24h. (A) Niveles de expresión de PUMA y p-c-JUN por western blot en ausencia o presencia de TPGS en extractos proteicos de células K562. (B) Cuantificación de PUMA y (C) c-JUN normalizada con la proteína ACTINA. Los valores expresados como la media  $\pm$  SD de dos experimentos independientes. \*p <0.05, \*\* p <0.005 y \*\*\* p <0.001, comparado con las células sin tratamiento (0  $\mu\text{M}$ )





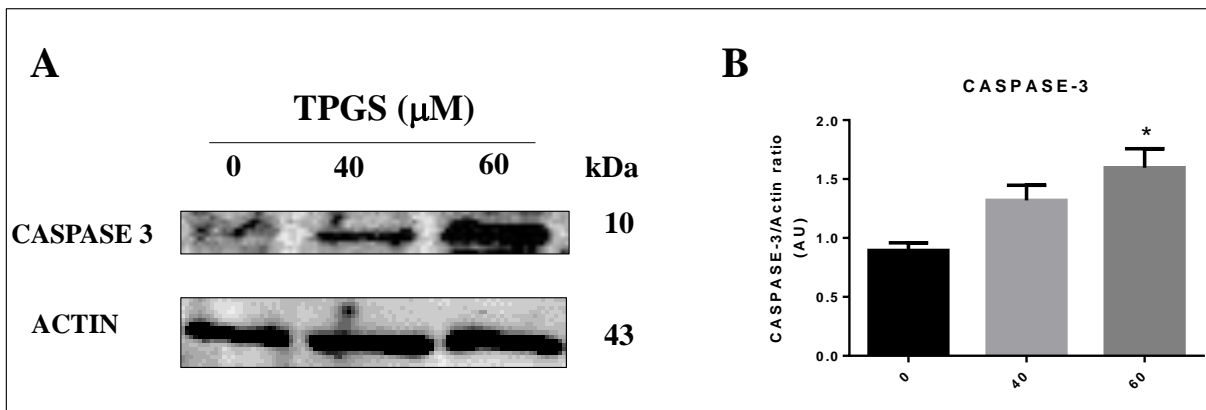
**Figura 7. El inhibidor selectivo de JNK (SP600125) restaura el  $\Delta\Psi\text{m}$  afectado por TPGS en células K562.** Células K562 ( $1 \times 10^6$  células /pozo) se incubaron en ausencia o presencia del TPGS con concentraciones incrementales de TPGS (10-80  $\mu\text{M}$ ) a  $37^\circ\text{C}$  por 24h en presencia o ausencia del inhibidor de JNK (SP600125, 1 $\mu\text{M}$ ) (A) Gráfico de contornos representativo que muestra que el TPGS en combinación con SP600125 previene la pérdida de  $\Delta\Psi\text{m}$  de forma dependiente de la concentración por citometría de flujo; de acuerdo a lo descrito en Materiales y métodos. (B) Histograma representativo de la disipación de  $\Delta\Psi\text{m}$  (barras negras). (C) Histograma representativo de la captación de yoduro de propidio (PI) (barras naranjas)

También se evaluaron otras proteínas asociadas a la mitocondria, como BAX y BCL2, pero no presentaron variaciones en su intensidad de fluorescencia en presencia de TPGS (Fig. 8).



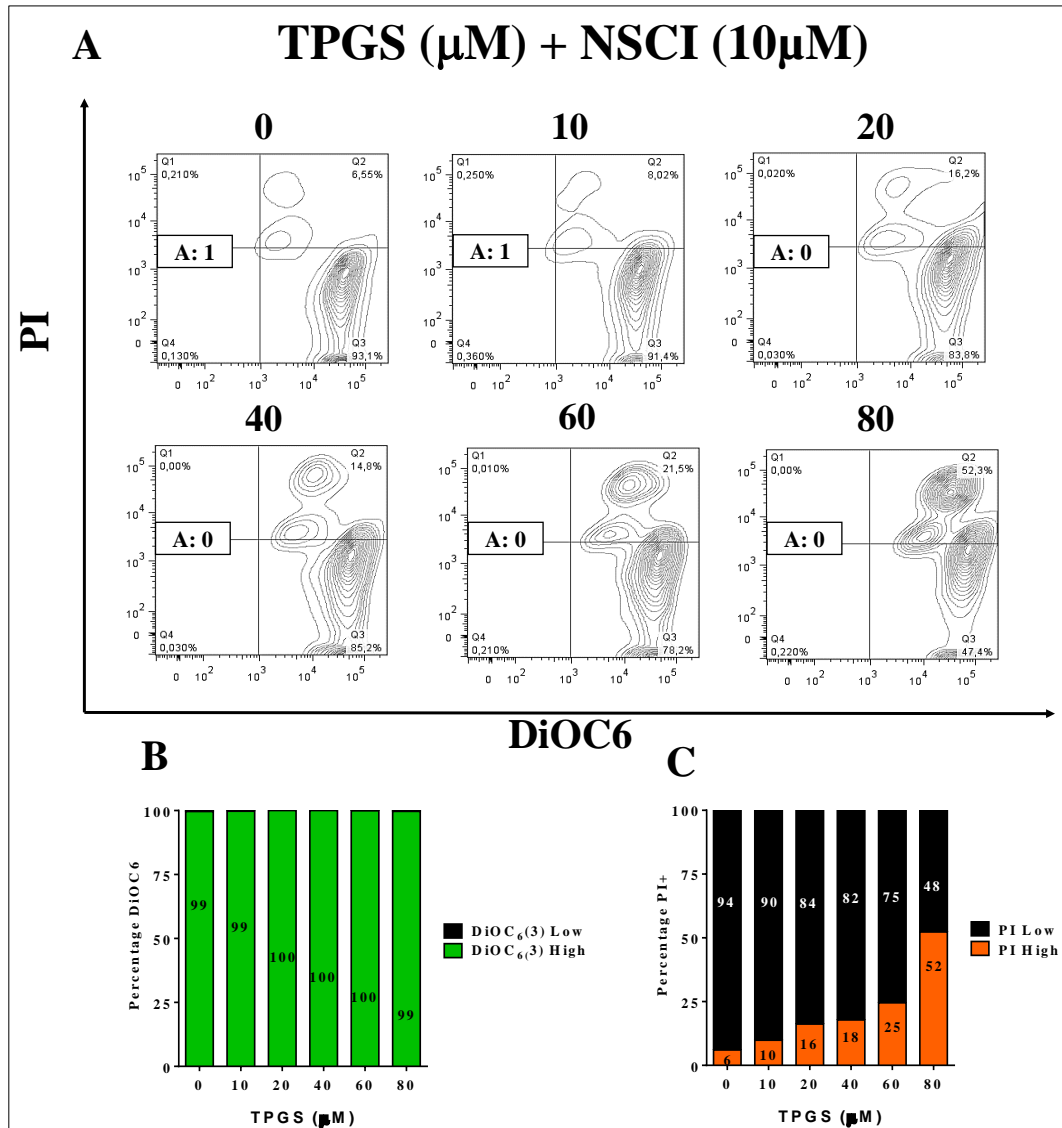
**Figura 8. EL TPGS no afecta la proporción de BAX/BCL-2 en células K562.** Células K562 ( $1 \times 10^6$  células /pozo) se incubaron en ausencia o presencia de concentraciones incrementales de TPGS (40 y 60  $\mu\text{M}$ ) a 37°C por 24h. (A). Figura ilustrativa que muestra los niveles de expresión BCL2 y BAX por western blot en ausencia o presencia de TPGS en extractos proteicos de células K562. (B) Cuantificación de la proporción BAX/BCL-2, (C) BCL-2 y (D) BAX normalizada con la proteína ACTINA. Los valores expresados como la media  $\pm$  SD de dos experimentos independientes. \*p <0.05, \*\* p <0.005 y \*\*\* p <0.001, comparado con las células sin tratamiento (0  $\mu\text{M}$ ).

Por otro lado, nos interesamos en evaluar si el TPGS podía activar la proteína ejecutora CASPASA-3, y efectivamente el TPGS como se muestra en la figura 9, ocasionó un aumento en la expresión de la CASPASA 3 es dependiente de la concentración en comparación a las células no tratadas (Fig. 9 A,B). Adicionalmente, al tratar las células en combinación con el TPGS y el inhibidor específico de la CASPASA-3 (NSCI), se observó la recuperación del potencial de membrana mitocondrial comparado con las células tratadas solamente con TPGS (Fig. 10 A-C), no obstante, el yoduro de propidio sigue entrando a la célula, lo que sugiere que la recuperación de la membrana celular es parcial (Fig. 10)



**Figura 9. EL TPGS aumenta la expresión de caspasa 3 clivada en células K562.** Células K562 ( $1 \times 10^6$  células /pozo) se incubaron en ausencia o presencia de TPGS con concentraciones de 40 y 60  $\mu\text{M}$  a 37°C por 24h. (A). Figura ilustrativa que

muestra los niveles de expresión de CASPASA-3 por western blot en ausencia o presencia de TPGS en extractos proteicos de células K562. (B) Cuantificación de los niveles de CASPASA-3 normalizada con la proteína ACTINA. Los valores expresados como la media  $\pm$  SD de dos experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$  y \*\*\*  $p < 0.001$ , comparado con las células sin tratamiento (0  $\mu\text{M}$ )



**Figura 10. El inhibidor selectivo de CASPASA-3 (NSCI) restaura el  $\Delta\Psi\text{m}$  inducido por TPGS en células K562.** Células K562 (1x10<sup>6</sup> células /pozo) se incubaron en ausencia o presencia del TPGS con concentraciones incrementales de TPGS (10-80  $\mu\text{M}$ ) a 37°C por 24h y en presencia o ausencia del inhibidor de CASPASA-3 (NSCI, 10 $\mu\text{M}$ ) (A) Gráfico de contornos representativo que muestra que TPGS en combinación con NSCI previene la pérdida del  $\Delta\Psi\text{m}$  de forma dependiente de la concentración por citometría de flujo de acuerdo a lo descrito en Materiales y métodos, (B) Histograma representativo de la dispersión de  $\Delta\Psi\text{m}$  (barras negras). (C) Histograma representativo de la captación de yoduro de propidio (PI) (barras naranjas)

### 7.3. Discusión.

Este estudio reporta por primera vez el uso del TPGS como molécula única capaz de inducir la muerte celular por apoptosis en células K562 mediada por estrés oxidativo, principalmente por generación de  $H_2O_2$ . Este mecanismo involucra la oxidación del sensor de estrés oxidativo, la proteína DJ-1, la activación de quinasas que responden a  $H_2O_2$ , como JNK y factores de transcripción que promueven muerte como c-JUN, pérdida del potencial de membrana mitocondria, activación de proteínas proapoptóticas como PUMA y de ejecutoras como CASPASA-3, llevando a la fragmentación del núcleo. Estudios previos de nuestra línea de investigación (Ruiz-Moreno et al., 2016; Ruiz-Moreno et al., 2018) y de otros autores (Neophytou et al., 2014; Neophytou et al., 2019; Chen et al., 2020), mostraron que TPGS induce apoptosis, presentando fragmentación nuclear, afectación de la mitocondria y activación de caspasas. Sin embargo, todavía no es conocido: ¿Cuál es el mecanismo por el cual TPGS entra a la célula? ¿Cómo se da el metabolismo de la molécula una vez ingresa a la célula? ¿Cuál es el mecanismo por el cual produce EROS y muerte celular por apoptosis?

De acuerdo a estudios previos, se ha demostrado que el TPGS usado en matrices de nanoencapsulamiento ingresa a la célula, vía endocitosis (Li et al., 2019; Dibaei 2019). Traber y colaboradores (1988) realizaron un estudio con la molécula de TPGS donde lograron la funcionalización del  $\alpha$ -tocoferol succinato con PEG, el cual le confirió propiedades nuevas a la molécula, permitiéndole la entrada a la célula sin necesidad de receptores, ni de proteínas de unión u otros modos de transporte; contrario a lo que se ha reportado previamente para moléculas con alta hidrofobicidad como lípidos y la vitamina E, que requieren su empaquetamiento en quilomicrones y proteínas de transporte (Lauridsen & Jensen, 2012). Es posible que, por su naturaleza hidrofílica, requiera de canales en la membrana que le permita su internalización; sin embargo, este mecanismo se desconoce actualmente.

Se sugiere que una vez la molécula entra a la célula, sufre un proceso de hidrólisis por medio de esterasas, separándose el PEG-succinato (polietilenglicol) del  $\alpha$ -tocoferol (Figura 11) (Yan et al., 2007). Otra posibilidad, es el corte en el enlace éster entre el PEG y el  $\alpha$ -tocoferol succinato, separando estos dos componentes (Grimaudo et al., 2018).

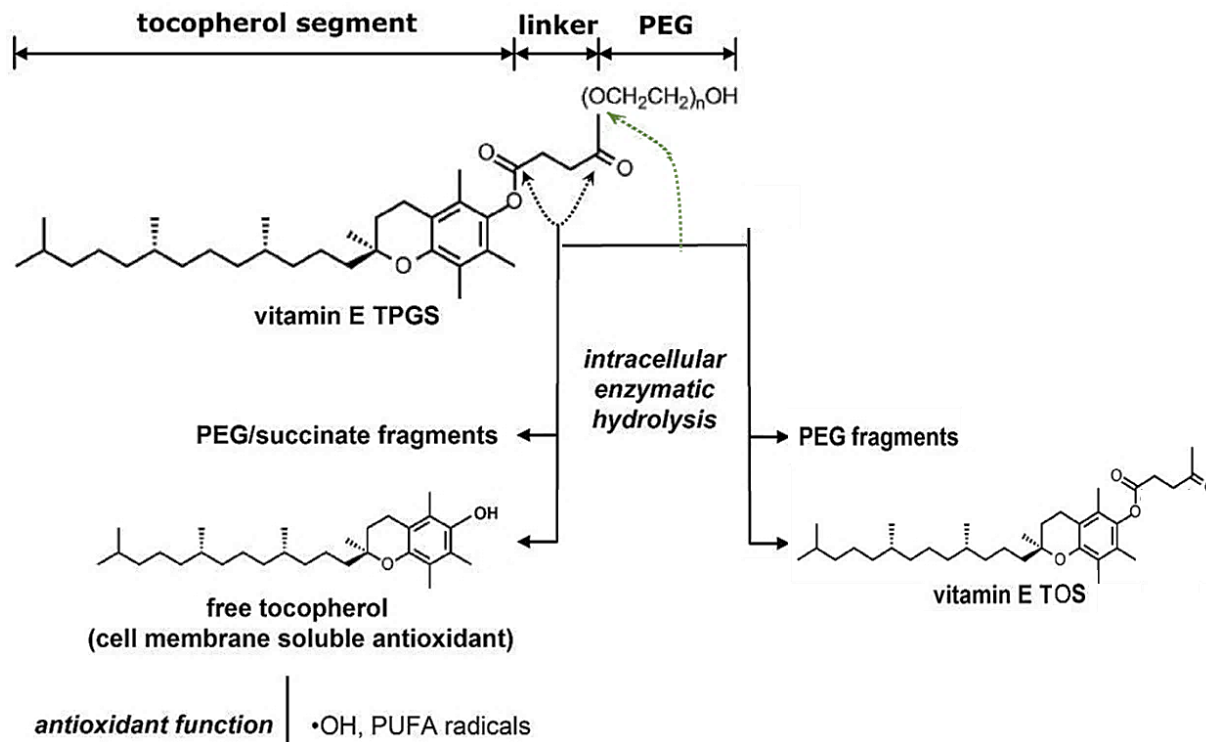


Figura 11. Esquema del procesamiento que sufre el TPGS al entrar a la célula. Tomado de Yan et al., (2007)

En este contexto, el PEG es uno de los biomateriales más ampliamente utilizados para la funcionalización de proteínas y partículas que aumenta la solubilidad y biodisponibilidad, e impide el aclaramiento al dificultar el acceso de los anticuerpos y de las enzimas catalíticas que pretendan degradar la proteína funcionalizada (Veronese & Pasut, 2005). Se reporta que el PEG es un material biodegradable y que se comporta como una molécula inerte, por lo que no presentaría blancos celulares importantes entre los cuales pueda cumplir alguna función (Wenande et al., 2016). No obstante, existe controversia respecto a los mecanismos por los cuales esta molécula puede ser degradada y a su vez, los procesos que puedan desencadenar los productos de esta degradación y su supuesta inmunogenicidad (Schellekens et al., 2013). Ulbricht y colaboradores (2014) plantean que, intracelularmente, el PEG puede sufrir degradación a través de su reacción con las EROs y el nitrógeno presentes en las células, principalmente en las células fagocíticas; refieren, además, que no se encuentra bien establecido el efecto biológico que pueda tener estas modificaciones estructurales del PEG producidas por EROs.

La vitamina E es conocida por sus múltiples papeles en la célula, resaltando su capacidad antioxidante (Niki, 2014). Se ha reportado que la vitamina E juega un papel fundamental para la

fluidez, estabilidad y resistencia al estrés oxidativo de las membranas celulares, incluyendo la membrana mitocondrial (Wang & Quinn, 1999; Wang & Quinn, 2000; Miyazawa et al., 2019); es importante resaltar que se ha descrito previamente que existe una cantidad considerable de vitamina E que se incorpora a las membranas mitocondriales, y que esto podría explicar la actividad como *mitocan* de sus derivados (Neuzil et al., 2007).

El corte de las esterasas puede liberar dos compuestos activos de importancia, dependiendo del sitio de corte: En dosis altas, la vitamina E exhibe actividad prooxidante (Pearson et al., 2006; Kondakçı et al., 2013) y el  $\alpha$ -tocoferol succinato, este se ha relacionado como Mitocan, inhibiendo la cadena transportadora de electrones, generando una disminución de la disponibilidad de ATP, fuga de protones y un aumento en la formación de EROs (Neuzil et al., 2001a; Weber et al., 2002; Stapelberg et al., 2005; Dong et al., 2011). Interesantemente, en estos últimos estudios se evidenció esta actividad de mitocan. A la fecha, no se encontraron estudios que indiquen cuál de los cortes se favorece, sin embargo, por los resultados presentados durante esta investigación sugerimos que el  $\alpha$ -tocoferol succinato tiene mayor relevancia como molécula terapéutica, producto derivado del TPGS. De hecho, el aumento en la formación de EROs y EO a partir del TPGS y el  $\alpha$ -tocoferol succinato es una consecuencia conocida y ampliamente documentada (Weber et al., 2003; Stapelberg et al., 2005; Swettenham et al., 2005; Wang et al., 2005; Dong et al., 2008). Estos hallazgos están en concordancia con los resultados obtenidos en el modelo celular de K562 expuestas al TPGS, en donde se presentó un aumento moderado y significativo de EROs. Este aumento está asociado generalmente a afectaciones mitocondriales, que es el principal organelo productor de estas especies reactivas (Zorova et al., 2018)

Como se ha descrito en la literatura científica el principal blanco celular del TPGS y sus productos metabólicos es la mitocondria. La mitocondria en células cancerosas se caracteriza por la sobreproducción de EROs, las cuales promueven el desarrollo del cáncer induciendo inestabilidad genómica, modificando la expresión de genes y participan en diferentes vías de señalización (Yang et al., 2016). La gran cantidad de funciones en las cuales se involucra la mitocondria han sido utilizados para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas (Prasad et al., 2016). Actualmente, se conoce y reconoce que la mitocondria, principal fuente de producción de energía y sitio clave regulador de los procesos de apoptosis se presenta como un blanco terapéutico efectivo que provee la selectividad necesaria para la aplicación de terapias anti-cáncer (Neuzil et al., 2001a). Se ha propuesto que el succinato presente en el  $\alpha$ -TOS es capaz de interactuar con el complejo II mitocondrial, específicamente en el sitio Qp, por su similitud

estructural con la ubiquinona (UbQ), actúa como un inhibidor competitivo del sitio de unión de UbQ al complejo II, impidiendo la transferencia de electrones a través de la cadena (Figura 12) (Dong et al., 2008). Dentro del contexto de este trabajo, el TPGS genera un alto estrés en la mitocondria, que se refleja en la pérdida del potencial de membrana mitocondrial (Fig 1) y la activación de mecanismos de muerte celular (Fig 6-10), posiblemente por la vía intrínseca, ya que hablamos de un estímulo intracelular que afecta específicamente a la mitocondria, organelo vinculado a este tipo de muerte principalmente.

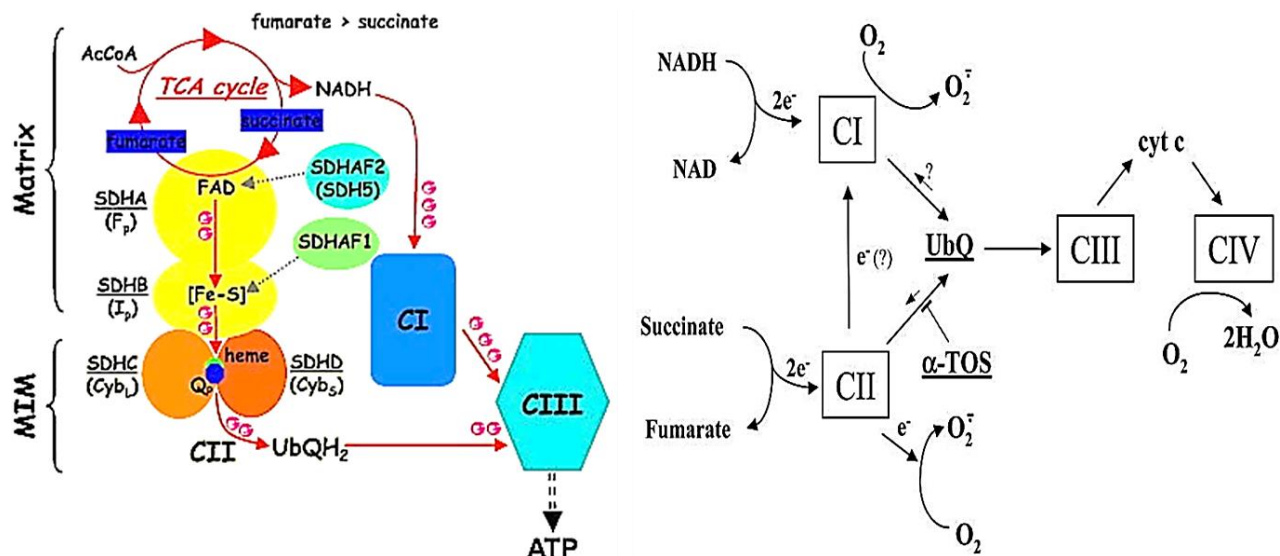


Figura 12. Esquema del mecanismo y sitio de inhibición en la cadena transportadora de electrones por el  $\alpha$ -TOS. Modificada de Dong et al., 2008 y Kluckova et al., 2013

En este estudio, el aumento de la formación de EROs se vio confirmada por la oxidación de la proteína DJ-1, la cual se ha considerado como biomarcador de EO, principalmente estudiado en la enfermedad de Parkinson (Antipova & Bandopadhyay, 2017; Hijioka et al., 2017). La proteína DJ-1 se encuentra en una región que ha mostrado ser un hot spot para alteraciones cromosómicas que se han relacionado con diversos tipos de tumor como la leucemia aguda, hepatocarcinoma celular, cáncer de mama, de ovario y pulmón, entre otros (Cao et al., 2015). Esta proteína tiene una gran cantidad de funciones, entre las más destacadas se encuentra la respuesta al estrés oxidativo (Wilson et al., 2011, Cao et al., 2017) con una actividad antioxidante, que ha permitido proponerla como una proteína sensora de EO (Drapalo et al., 2018; Vavougios et al., 2018). Esta actividad se debe principalmente a la función scavenger de EROs, barriendo principalmente  $H_2O_2$ , esto produce una oxidación en los residuos de cisteína de los dímeros de proteína (Kinumi et al., 2004). El papel de DJ-1 en líneas celulares de leucemia como K562, HL60 y muestras de pacientes con leucemia aguda fue evidenciado por

Liu y colaboradores (2008), mostrando que en estos modelos de cáncer puede promover la proliferación y supervivencia celular en la progresión y aparición de la leucemia (Liu et al., 2008), lo que muestra la gran importancia de evaluarla en el modelo celular *in vitro*, como proteína de interés durante la activación de una cascada de eventos moleculares que culmina en la muerte celular por apoptosis de las células leucémicas K562 a través de un mecanismo liderado por la afectación mitocondrial y la formación de EROs.

Además, DJ-1 es capaz de estabilizar la función mitocondrial, promoviendo la supervivencia celular, actuando como un agente citoprotector y reduciendo el estrés oxidativo (Canet-Avilés et al., 2004; Li et al., 2012; Tanti et al., 2015) este punto es importante cuando se trata de la respuesta de células cancerosas a tratamientos (Mo et al., 2008; Zeng et al., 2011; Chen et al., 2012; Ismail et al., 2015). Estos hallazgos resultan importantes para el presente trabajo de investigación, ya que muestra que la función de DJ-1 a través de su oxidación por parte de EROs, es sensibilizar las células al EO, y por lo tanto, permite inducir la muerte celular en células resistentes como las K562. Adicionalmente, revela la importancia de la formación de EROs dentro del modelo, ya que se observó un aumento significativo de la oxidación de DJ-1, acompañado con la activación de la proteína CASPASA-3 (Fig 4).

Con las observaciones realizadas, se sugiere que TPGS es una fuente importante de EROs, específicamente, se demostró que TPGS genera  $H_2O_2$  (Fig 3). Dos hallazgos apoyan esta conclusión, el primero es la detección de la proteína DJ-1 oxidada en el aminoácido Cys 106 (Fig 4). Se ha demostrado que la Cys 106 es el residuo aminoacídico más sensible a la oxidación por  $H_2O_2$  (Kinumi et al., 2004), se ha mostrado que esta reacción es específica y por lo tanto, la DJ-1 oxidada podría considerarse como un marcador sensible al estrés oxidativo intracelular. El segundo es la reducción significativa de la pérdida del potencial de membrana cuando las células fueron tratadas con TPGS y el antioxidante NAC.

Consecuentemente, se ha demostrado que la quinasa N-terminal de Jun (JNK) es una quinasa multifuncional que cumple roles en la modulación de señalización redox celular, y papeles duales entre la progresión y regresión de tumores, entre estas, la inducción de apoptosis (Wu et al., 2019), esta puede activarse cuando se presenta aumento de EROs celular, y una vez activa puede fosforilar múltiples sustratos además de c-JUN, entre estos, proteínas de la familia BCL-2 como BAX, BIM, BAD, promoviendo así la muerte celular por apoptosis mediada a través de la mitocondria (Bogoyevitch & Kobe, 2006). La fosforilación del factor de transcripción c-JUN en los residuos de serina 63 y 73 es una medida indirecta de la función de la quinasa JNK (Tournier, 2013), así, c-JUN activa la transcripción involucrada en regulación



del ciclo celular, proliferación y aparición de tumores, diferenciación y apoptosis (Leppä & Bohmann, 1999; Meng & Xia, 2011; Wu et al., 2019). Particularmente, JNK presenta un importante papel en la inducción de muerte celular por apoptosis en este modelo, demostrado por las observaciones experimentales utilizando el inhibidor selectivo de JNK (SP600125), donde las células no presentaron pérdida del  $\Delta\Psi_m$  posterior al tratamiento (Fig 7A-B), sin embargo, presentaron un aumento de la captación de PI (Fig 7C), que implica un compromiso de la membrana celular, sugiriendo que TPGS podría inducir daños en la membrana plasmática, este fenotipo se ha visto relacionado a muerte celular por necrosis, no obstante, este mecanismo no fue evaluado en esta investigación.

Es importante resaltar que el modelo de células K562 carece de la proteína TP53, la cual juega un papel central como señalizadora en los procesos de estrés celular, liderando proceso como arresto del ciclo celular, reparación del ADN y apoptosis (Canman & Kastan, 1995). Este gen se encuentra extensamente mutado en diferentes tipos de tumores sólidos, como cáncer de cuello uterino, colón, entre otros (Machado-Silva et al., 2010; Hall & Muller, 2019) y representa una mutación de mal pronóstico, asociándose también como una mutación iniciadora del cáncer y un punto clave para la progresión a fenotipos más invasivos (Aubrey et al., 2016). No obstante, a pesar de la ausencia de esta proteína, se logra inducir la apoptosis en células K562, refiriéndonos a mecanismos independientes de TP53, que han sido descritos previamente en otros modelos (Weber et al., 2002). Se evidencia el aumento de la proteína PUMA (Fig 6), perteneciente a la familia de proteínas BCL-2, más específicamente es una proteína *BH-3 only*, que cumple un papel pro-apoptótico y que fue descrita inicialmente con una vía de activación canónica dependiente de TP53. No obstante, posteriormente se dieron a conocer vías independientes de TP53, que han sido extensamente estudiadas en el modelo del sistema hematopoyético, mostrando que bajo estímulos como citoquinas, factores de crecimiento y acción de algunas quinasas, PUMA puede activarse y contribuir a la inducción de muerte (Yu & Zhang, 2008), una de estas vías de transactivación es a través del factor de transcripción c-JUN (Lu et al., 2014). Esta observación sugiere que TPGS puede ser capaz de promover una vía alternativa que involucran  $H_2O_2 \gg JNK/c-JUN \gg PUMA$  (Fig. 6). Se ha descrito que en LMC se presenta una disminución en la expresión de estas proteínas pro-apoptóticas mencionadas previamente, entre ellas PUMA, lo que favorece la supervivencia, crecimiento y progresión del tumor (Raimondo et al., 2015), se sugiere entonces, que TPGS es capaz de recuperar y aumentar significativamente esta expresión de PUMA para que se dé apoptosis en las células K562.

De otro lado, BCL-2 y BAX son miembros de la familia de proteínas que son ampliamente estudiadas por su papel durante el proceso de muerte celular por apoptosis, experimentalmente en este trabajo se evaluó principalmente la diferencia de la proporción entre estas dos proteínas, entre las células control y los tratamientos con TPGS (Fig 8). BAX es una proteína pro-apoptótica que generalmente se encuentra de forma soluble en el citoplasma (Delbridge et al., 2016; Kalkavan et al., 2018), a través de los estímulos, sufre un cambio conformacional que le permite anclarse a la membrana celular, acoplándose en homo o heterodímeros con otras proteínas como BAK, permitiendo su participación en la formación del poro mitocondrial, principalmente en de la membrana externa de la mitocondria (Naghdi & Hajnóczky, 2016).

Su contraparte BCL-2 es una proteína anti-apoptótica que se encuentra anclada a la membrana de la mitocondria y evita que BAX se ubique en mitocondria y cumpla su función (Delbridge & Strasser, 2015). La formación de este poro mitocondrial conlleva a la pérdida del potencial de membrana, tal y como lo evidenciamos en este trabajo, como paso clave para la inducción de apoptosis a través del tratamiento con TPGS. Sin embargo, la proporción de estas proteínas (BAX/BCL2) no se vio afectado en este estudio de forma significativa (Fig 8). Estas observaciones están de acuerdo con reportes previos en donde el uso de diferentes moléculas derivadas de la vitamina E no exhibieron un cambio significativo en niveles de BAX y BCL-2 como en líneas celulares de cáncer de próstata y leucemia mieloide (Constantinou et al., 2012). Se ha descrito que las células cancerosas, específicamente células de leucemia mieloide crónica de pacientes, especialmente cuando se encuentran en fases agresivas de la enfermedad (fase acelerada o crisis de blastos) sobreexpresan BCL-2 (Jaiswal et al., 2003; Zhou et al., 2019; Chandran et al., 2019). BCL-2 juega un papel pivotal en la adquisición de la resistencia a los medicamentos sea primaria o adquirida (Valdez et al., 2008). Respecto a esto último, se debe enfatizar en el tipo de modelo celular utilizado, como se describió previamente, K562 son células tomadas de una crisis de blastos que sufrió una paciente de 53 años; la fase de la enfermedad y las características de agresividad y malignidad en estas células la ubican en el tipo de células de pacientes que se han reportado resistencia y sobreexpresión de BCL-2; sin embargo, en nuestro trabajo pudimos demostrar la inducción de muerte por apoptosis en estas células resistentes utilizando TPGS.

Este aspecto de la molécula es importante y ha sido extensamente utilizado en los modelos de nanoencapsulamiento y otras formulaciones, la capacidad del TPGS para inhibir la P-glicoproteína (P-gp) que se ha visto involucrada como mecanismo de resistencia al tratamiento (Dintaman & Silverman, 1999; Su et al., 2014; Assanhou et al., 2015). P-gp es un transportador

de membrana dependiente de ATP que se ha reportado como una de las causas primarias de la multiresistencia a fármacos; esta puede bombear al espacio extracelular los medicamentos, disminuyendo la acumulación intracelular, además de reducir los efectos citotóxicos de los medicamentos (Yang C. et al., 2018). En este sentido, el TPGS puede actuar inhibiendo indirectamente a P-gp a través del bloqueo de la utilización del ATP por parte de este transportador, puesto que TPGS ataca selectivamente el complejo II mitocondrial, disminuyendo la producción de ATP y por ende la concentración intracelular del mismo (Collnot et al., 2007). También se sugiere un posible efecto alostérico por parte de TPGS que afecte directamente a P-gp, sin embargo, este mecanismo no ha sido descrito con claridad hasta el momento (Collnot et al., 2010). Una observación interesante realizada por Collnot y colaboradores (2007) que corroboran los mismos autores en el año 2010, es la concentración en la cual se observa el efecto respecto a la depleción del ATP, que corresponde a concentraciones mayores a 33  $\mu\text{M}$ . Esta observación concuerda con las concentraciones evaluadas en este trabajo, donde el mayor efecto terapéutico se observa a partir de los 40  $\mu\text{M}$ . Se sugiere que es a partir de esta concentración donde se puede dar una afectación de un mayor número de mitocondrias en la célula, esto también puede relacionarse a que es a partir de esta concentración donde se da un aumento significativo de la oxidación de DJ-1 y de la producción de EROs (Fig 4). Con el daño de mayor número de mitocondrias, se induce a la célula a la activación de proteínas relacionadas a muerte, como CASPASA-3, ya que resulta inviable el mantenimiento de células con altos índices de daño mitocondrial.

Por otra parte, el hecho que la proporción BAX/BCL2 no se vio afectada, puede ser debido a que existen varias proteínas pertenecientes a la familia BCL-2 que pueden estar jugando un papel importante en la inducción de muerte celular, que no fueron evaluadas en este trabajo, y que podrían explicar los cambios en características bioquímicas de la mitocondria en este modelo de inducción de apoptosis por TPGS, por ejemplo, BCL-xL y BAK. Además, altos niveles de la proteína de fusión BCR/ABL pueden prevenir que se dé una traslocación temprana de las proteínas pro-apoptóticas BAD y BAX desde el citoplasma a la mitocondria, lo que explicaría en parte la resistencia de las células a los estímulos tóxicos (Keeshan et al., 2002). Otras proteínas de la familia BCL-2, como BIM se consideran igualmente importantes en LMC, ya que su regulación negativa se asocia a supervivencia de las células leucémicas (Shinjyo et al., 2001). MCL-1, por su parte, también se afecta por BCR-ABL, aumentando su expresión, promoviendo la supervivencia celular (Aichberger et al., 2005), recordando que este cambio de expresión de proteínas se está dando en el contexto de la mitocondria, jugando un

papel central durante el desarrollo de este trabajo, además, es en esta donde las moléculas de la familia BCL-2 cumplen su función principal.

La mitocondria es una organela crucial para la toma de decisiones de vida o muerte celular. En concordancia, encontramos una relación entre la despolarización de la membrana mitocondrial y la fragmentación nuclear, como indicativo de muerte celular por apoptosis. Este fenómeno concurre en la activación de la proteasa CASPASA-3 (Fig 9) Este hallazgo sugiere que la apoptosis inducida por TPGS en células K562 requiere de la activación de esta proteasa; dos observaciones soportan esta perspectiva: en primer lugar, encontramos que TPGS induce fragmentación nuclear caracterizada por masas pequeñas, brillantes y redondeadas de cromatina condensada, detectada a través de microscopia de fluorescencia (Fig 2A) o citometría de flujo como la población SubG1. En segundo lugar, el inhibidor específico de la CASPASA-3, NSCI reduce significativamente la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, aunque no afecta la captación de yoduro de propidio (PI) lo que puede dar indicios que se está presentando otro tipo de muerte, que puede ser independiente de CASPASAS-3 (Fig 10).

Con todo lo anterior, se sugiere un mecanismo de inducción de muerte por apoptosis que recapitula las moléculas y proteínas que se evaluaron en este trabajo, donde se presentan evidencias en diferentes niveles celulares, que soportan la afirmación de que el TPGS está induciendo apoptosis en las células K562; en esta cascada de eventos que se propone por primera vez para el modelo de K562 tratadas con TPGS, se presenta la afectación mitocondrial, la cual produce un aumento de EROs y por lo tanto, estrés oxidativo, que oxida la proteína DJ-1 y activa la quinasa JNK, la cuál fosforila el factor de transcripción c-JUN, permite la activación por vías no canónicas de PUMA, la activación de CASPASA-3 y finalmente la fragmentación nuclear como último paso de este mecanismo de muerte (Fig 13). Esta cascada de eventos moleculares que se ha descrito en trabajos previos realizados en la línea de investigación en el modelo de leucemia y neuroblastoma con otras moléculas promisorias, como se muestra en la figura 13 (Bonilla-Porras et al., 2013; Mendivil-Perez et al., 2012; Ruiz-Moreno et al., 2016; Rojas et al., 2017; Ruiz-Moreno et al., 2018) ratificando de esta forma que el modelo proporciona una propuesta robusta que explica el mecanismo por el cual se da muerte celular por apoptosis a través de diversos estímulos en modelos de estudio diferentes.

Respecto a la selectividad del compuesto (TPGS), que no fue evaluada en este trabajo por falta de tiempo (debido al aislamiento preventivo por la pandemia de COVID-19) para la realización de los experimentos respectivos, se tienen una gran cantidad de reportes que demuestran por ejemplo que el TPGS es selectivo para células cancerosas en modelos *in vitro* e *in vivo* (Ruiz-

Moreno et al., 2016; Li et al., 2019; Chen et al., 2020), no obstante, no se conoce la razón por la cual TPGS o sus productos metabólicos asociados ( $\alpha$ -TOS) son efectivamente seguros para las células normales y presentan selectividad hacia células cancerosas (Neuzil et al., 2001b). Una ventaja de usar TPGS sobre el  $\alpha$ -tocoferol succinato, siendo este último el compuesto más estudiado a través de los últimos 30 años, es que el  $\alpha$ -tocoferol succinato es muy susceptible a las esterasas celulares, por lo que tiende a degradarse con facilidad (Zielonka et al., 2017), dificultado la absorción, biodisponibilidad y por lo tanto, su efecto terapéutico.

Finalmente, a la luz de los resultados, el TPGS se muestra como un compuesto promisorio para futuros estudios, y para proponerlo en próximos ensayos clínicos como una molécula con capacidad de nanoencapsular de forma segura otros medicamentos o principios activos, sean o no quimioterapéuticos, que puede presentar un efecto sinérgico y mejorar, entre otros aspectos: La absorción intestinal en caso de que se proponga un tratamiento vía oral, garantizando una buena biodisponibilidad y transporte a través del sistema linfático (Chen et al., 2011; Fan et al., 2013), con un perfil de liberación lento (Li et al., 2019) y una matriz que es a su vez biodegradada a través de las esterasas (Yan et al., 2007), además, los productos del metabolismo de la matriz de encapsulación de TPGS presentan un efecto pro-apoptótico, mejorando además la biodisponibilidad celular, inhibiendo el eflujo del medicamento al espacio extracelular. Por todo lo anterior, el TPGS se sugiere como una estrategia terapéutica alternativa para el tratamiento de leucemia mieloide crónica que tienen resistencia o mala respuesta a los tratamientos convencionales.

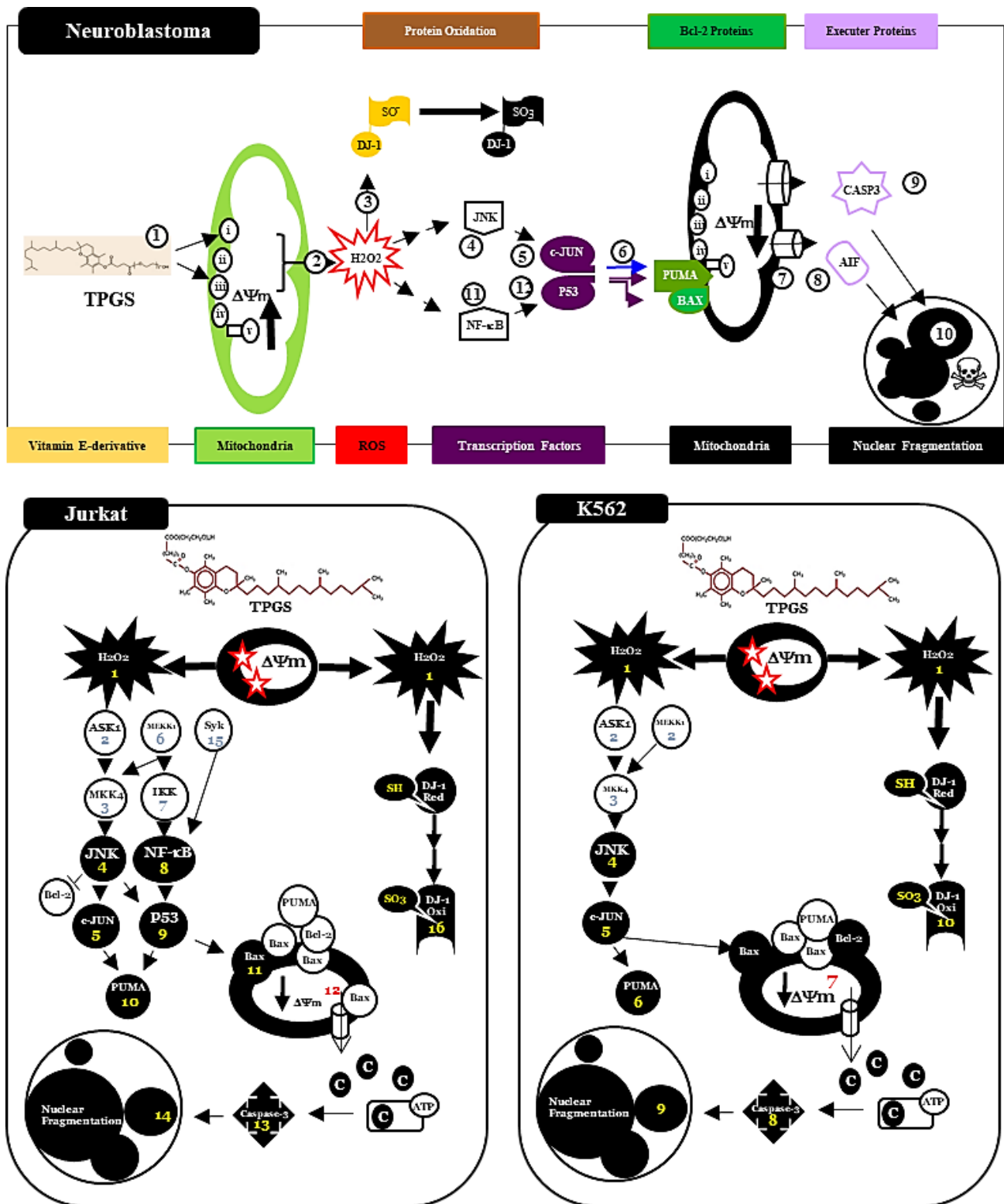


Figura 13. Modelo esquemático de la apoptosis inducida por TPGS en K562.

## CAPÍTULO 8: CONTRIBUCIONES O APORTES CIENTÍFICOS

En esta investigación mostramos por primera vez como el TPGS induce apoptosis en las células K562, que cuentan con la fusión BCR-ABL.

En este estudio confirmamos la inducción de EO, principalmente,  $H_2O_2$  (oxidación de DJ-1) por parte del TPGS en células cancerosas y se proponen diferentes estrategias moleculares de cómo podría estar mediando la producción de EO. La cual puede estar relacionada con su actividad mitocondrial, atacando con mayor especificidad a la mitocondria de las células tumorales.

El mecanismo inductor de apoptosis del TPGS se relaciona con la activación de moléculas de respuesta al EO y apoptosis. En este estudio debemos resaltar que el TPGS induce muerte celular en K562 pese a que esta línea carece de expresión de p53 funcional. Por lo que existen mecanismos independientes de esta proteína que permiten la activación de PUMA y otras proteínas cascada abajo, induciendo la fragmentación nuclear y pérdida del potencial de membrana mitocondrial.

Este trabajo fue presentado en modalidad de póster en la primera versión digital del congreso International Student Congress Of (bio)Medical Sciences (DISCOMS) realizado el 4 de junio del 2020.

## CAPÍTULO 9: CONCLUSIONES GENERALES

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación podemos concluir que el TPGS induce apoptosis **de manera dependiente de la concentración** en un modelo *in vitro* de leucemia mieloide crónica humana (**K562**), la cual presenta características moleculares de mal pronóstico y pobre respuesta al tratamiento. **De igual forma, podemos concluir que el mecanismo de inducción de apoptosis del TPGS** una vez se internaliza, genera un aumento de la producción de EROs, específicamente **peróxido de hidrogeno, generando la oxidación de una proteína sensora de los cambios de óxido-reducción, denominada DJ-1**. Las EROs activan a su vez la vía de quinasas que involucra la fosforilación de JNK y la subsecuente activación del factor de transcripción c-JUN por medio de la fosforilación en sus serinas 63-73. El factor c-JUN activa PUMA, que puede interactuar con proteínas pro-apoptóticas de la familia BCL-2, conllevando a la apertura del poro mitocondrial y posterior pérdida del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ), arresto del número de células en la fase S del ciclo celular y fragmentación del núcleo y la activación de la CASPASA 3 que se encarga de la fragmentación del ADN y desencadenar un tipo de muerte celular que cumple con las características morfológicas, bioquímicas y moleculares de la apoptosis. El TPGS, induce apoptosis en células de leucemia independiente de la expresión de BCR-ABL (Ruiz-Moreno et al., 2016), ya que también induce apoptosis en células de LLA. El uso del antioxidante (v.gr. N-acetil-cisteína) es capaz de revertir varios de los cambios inducidos por el TPGS en las células de LMC (v.gr. reducción de la producción de EROs - específicamente  $H_2O_2$  y prevención de la pérdida del potencial de membrana mitocondrial) demostrando el papel directo de esta molécula en la inducción de EO como mecanismo anti-tumoral en células de LMC.

Finalmente, reuniendo estos hallazgos, se logró proponer el TPGS como un medicamento promisorio con un potencial para el tratamiento de la leucemia mieloide crónica.



## CAPÍTULO 10: PERSPECTIVAS

El TPGS es un fármaco promisorio para tratar la LMC, por lo que una de las principales perspectivas de este trabajo, podría ser la realización de ensayos complementarios que le den robustez al mecanismo propuesto de señalización celular mediada por EO por el cual se está dando la muerte por apoptosis. Propongo varios ensayos como son; la evaluación de la quinasa ASK1 para demostrar su posible participación en la cascada de quinasas que producen la activación de la quinasa JNK; asimismo evaluar la activación del factor inductor de apoptosis (AIF), el cual se ha visto involucrado como proteína efectora, generando fragmentación del ADN en fragmentos más grandes y que inducen también un importante papel en este modelo *in vitro*. Además, se puede explorar la posible participación de otras proteínas de la familia de BCL-2 que complementen el mecanismo de alteración mitocondrial y de sus complejos mitocondriales (v.gr. complejo II). Igualmente, se pueden realizar estudios en células normales para confirmar la seguridad e inocuidad del TPGS, por ejemplo linfocitos.

Adicionalmente, se podrían realizar ensayos preclínicos con células extraídas de la sangre o médula ósea de pacientes de LMC en crisis blástica o multirresistentes (modelo *ex vivo*), y de esta manera determinar el efecto del TPGS sobre los blastos de los pacientes y también sobre las otras poblaciones celulares en sangre de linaje mieloide y linfoide no cancerosas.

Otra de las perspectivas interesantes, sería el establecimiento de la farmacocinética y farmacodinámica del TPGS en un modelo *in vivo* de Leucemia mieloide para poder proponer lo como un fármaco anti-leucémico.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abelson, H. T., & Rabstein, L. S. (1970). Lymphosarcoma: virus-induced thymic-independent disease in mice. *Cancer research*, 30(8), 2213–2222.
- Abraham, A., Kattoor, A. J., Saldeen, T., & Mehta, J. L. (2019). Vitamin E and its anticancer effects. *Critical reviews in food science and nutrition*, 59(17), 2831–2838. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1474169>
- Ahmed, W., & Van Etten, R. A. (2013). Signal transduction in the chronic leukemias: implications for targeted therapies. *Current hematologic malignancy reports*, 8(1), 71–80. <https://doi.org/10.1007/s11899-012-0150-1>
- Aichberger, K. J., Mayerhofer, M., Krauth, M. T., Skvara, H., Florian, S., Sonneck, K., Akgul, C., Derdak, S., Pickl, W. F., Wacheck, V., Selzer, E., Monia, B. P., Moriggl, R., Valent, P., & Sillaber, C. (2005). Identification of mcl-1 as a BCR/ABL-dependent target in chronic myeloid leukemia (CML): evidence for cooperative antileukemic effects of imatinib and mcl-1 antisense oligonucleotides. *Blood*, 105(8), 3303–3311. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-02-0749>
- Al Baghdadi, T., Abonour, R., & Boswell, H. S. (2012). Novel combination treatments targeting chronic myeloid leukemia stem cells. *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia*, 12(2), 94–105. <https://doi.org/10.1016/j.clml.2011.10.003>
- Alvarez, A. R., Sandoval, P. C., Leal, N. R., Castro, P. U., & Kosik, K. S. (2004). Activation of the neuronal c-Abl tyrosine kinase by amyloid-beta-peptide and reactive oxygen species. *Neurobiology of disease*, 17(2), 326–336. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2004.06.007>
- Álvarez, R. H., Kantarjian, H., & Cortes, J. E. (2007). The biology of chronic myelogenous leukemia: implications for imatinib therapy. *Seminars in hematology*, 44(1 Suppl 1), S4–S14. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2006.12.007>
- American Cancer Society (2018) Estadísticas importantes acerca de la leucemia mieloide crónica. <https://www.cancer.org/es/cancer/leucemia-mieloide-cronica/acerca/estadisticas.html>
- American Cancer Society. What is Chronic Myeloid Leukemia? <https://www.cancer.org/cancer/chronic-myeloid-leukemia/about/what-is-cml.html>
- American Heritage Dictionary of the English Language, Fifth Edition. 2011. <https://www.thefreedictionary.com/myeloid>
- Ammar, M., Ben Mahmoud, L., Medhaffar, M., Ghazzi, H., Sahnoun, Z., Hakim, A., Mseddi, M., Elloumi, M., & Zeghal, K. (2020). Relationship of oxidative stress in the resistance to imatinib in Tunisian patients with chronic myeloid leukemia: A retrospective study. *Journal of clinical laboratory analysis*, 34(2), e23050. <https://doi.org/10.1002/jcla.23050>
- Andreadou, I., Iliodromitis, E. K., Tsovolas, K., Aggeli, I. K., Zoga, A., Gaitanaki, C., Paraskevaïdis, I. A., Markantonis, S. L., Beis, I., & Kremastinos, D. T. (2006). Acute administration of vitamin E triggers preconditioning via K(ATP) channels and cyclic-GMP without inhibiting lipid peroxidation. *Free radical biology & medicine*, 41(7), 1092–1099. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.06.021>

- Andrzejewski, S., Gravel, S. P., Pollak, M., & St-Pierre, J. (2014). Metformin directly acts on mitochondria to alter cellular bioenergetics. *Cancer & metabolism*, 2, 12. <https://doi.org/10.1186/2049-3002-2-12>
- Angulo-Molina, A., Reyes-Leyva, J., López-Malo, A., & Hernández, J. (2014). The role of alpha tocopheryl succinate ( $\alpha$ -TOS) as a potential anticancer agent. *Nutrition and cancer*, 66(2), 167–176. <https://doi.org/10.1080/01635581.2014.863367>
- Antipova, D., & Bandopadhyay, R. (2017). Expression of DJ-1 in Neurodegenerative Disorders. *Advances in experimental medicine and biology*, 1037, 25–43. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-6583-5\\_3](https://doi.org/10.1007/978-981-10-6583-5_3)
- Arber, D. A., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M. J., Le Beau, M. M., Bloomfield, C. D., Cazzola, M., & Vardiman, J. W. (2016). The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, 127(20), 2391–2405. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-03-643544>
- Ashburn, T. T., & Thor, K.B. (2004). Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nature Reviews. Drug Discovery*. 3(8): 673–683. <https://doi.org/10.1038/nrd1468>
- Asociación Española de Afectados por Linfoma, Mieloma y Leucemia (AEAL). s.f. ¿Qué pruebas se realizan al paciente con LMC? <http://www.aeal.es/leucemia-mieloide-cronica-espana/2-la-leucemia/#2-3LMC>
- Assanhou, A. G., Li, W., Zhang, L., Xue, L., Kong, L., Sun, H., Mo, R., & Zhang, C. (2015). Reversal of multidrug resistance by co-delivery of paclitaxel and lonidamine using a TPGS and hyaluronic acid dual-functionalized liposome for cancer treatment. *Biomaterials*, 73, 284–295. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.09.022>
- ATCC. (s.f.) K562 (atcc © ccl243 TM ). <https://www.atcc.org/products/all/CCL-243.aspx>
- Aubrey, B. J., Strasser, A., & Kelly, G. L. (2016). Tumor-Suppressor Functions of the TP53 Pathway. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6(5), a026062. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026062>
- Aya Bonilla, C. A., Torres, J. D., Muskus, C. E., Ramírez Gaviria, G., Cuervo Sierra, J., Sierra Sánchez, M., Cuéllar-Ambrosi, F., Botero Garcés, J. H., Artigas A, C. G., Muñetón, C. M., & Vásquez Palacio, G. (2014). Frecuencia de los transcriptos p190BCR-ABL y p210BCR-ABL en una población colombiana con leucemia mieloide crónica (LMC) usando RT-PCR cualitativa. *Iatreia*, 27(4), 398-409. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0121-07932014000400003](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0121-07932014000400003)
- Azad, M. B., Chen, Y., & Gibson, S. B. (2009). Regulation of autophagy by reactive oxygen species (ROS): implications for cancer progression and treatment. *Antioxidants & redox signaling*, 11(4), 777–790. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2270>
- Bain, B. (2017). WHO Classification of Leukemia. Reference Module In Life Sciences. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809633-8.07356-8>
- Bazi, A., Keramati, M. R., & Gholamin, M. (2016). Role of Oxidative Stress in Modulating Unfolded Protein Response Activity in Chronic Myeloid Leukemia Cell Line. *Iranian biomedical journal*, 20(1), 63–67. <https://doi.org/10.7508/ibj.2016.01.009>

- Beckner, M. E., Gobbel, G. T., Abounader, R., Burovic, F., Agostino, N. R., Laterra, J., & Pollack, I. F. (2005). Glycolytic glioma cells with active glycogen synthase are sensitive to PTEN and inhibitors of PI3K and gluconeogenesis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 85(12), 1457–1470. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700355>
- Beran, M., Cao, X., Estrov, Z., Jeha, S., Jin, G., O'Brien, S., Talpaz, M., Arlinghaus, R. B., Lydon, N. B., & Kantarjian, H. (1998). Selective inhibition of cell proliferation and BCR-ABL phosphorylation in acute lymphoblastic leukemia cells expressing Mr 190,000 BCR-ABL protein by a tyrosine kinase inhibitor (CGP-57148). *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 4(7), 1661–1672
- Bernard, M. P., Bancos, S., Sime, P. J., & Phipps, R. P. (2008). Targeting cyclooxygenase-2 in hematological malignancies: rationale and promise. *Current pharmaceutical design*, 14(21), 2051–2060. <https://doi.org/10.2174/138161208785294654>
- Bertolini, F., Sukhatme, V. P., & Bouche, G. (2015). Drug repurposing in oncology--patient and health systems opportunities. *Nature reviews. Clinical oncology*, 12(12), 732–742. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2015.169>
- Bhatia R. (2017). Novel approaches to therapy in CML. *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 2017(1), 115–120. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2017.1.115>
- Biondani, G., & Peyron, J. F. (2018). Metformin, an Anti-diabetic Drug to Target Leukemia. *Frontiers in endocrinology*, 9, 446. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00446>
- Bjelakovic, G., Nikolova, D., Gluud, L. L., Simonetti, R. G., & Gluud, C. (2007). Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. *JAMA*, 297(8), 842–857. <https://doi.org/10.1001/jama.297.8.842>
- Boddu, P. C., & Zeidan, A. M. (2019). Myeloid disorders after autoimmune disease. *Best practice & research. Clinical haematology*, 32(1), 74–88. <https://doi.org/10.1016/j.beha.2019.02.002>
- Bogoyevitch, M. A., & Kobe, B. (2006). Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 70(4), 1061–1095. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00025-06>
- Bonilla-Porras, A. R., Jimenez-Del-Rio, M., & Vélez-Pardo, C. (2011). Vitamin K3 and vitamin C alone or in combination induced apoptosis in leukemia cells by a similar oxidative stress signalling mechanism. *Cancer cell international*, 11, 19. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-11-19>
- Bonilla-Porras, A. R., Salazar-Ospina, A., Jimenez-Del-Rio, M., Pereañez-Jimenez, A., & Velez-Pardo, C. (2013). Pro-apoptotic effect of Persea americana var. Hass (avocado) on Jurkat lymphoblastic leukemia cells. *Pharmaceutical biology*, Advance online publication. <https://doi.org/10.3109/13880209.2013.842599>
- Bourgeais, J., Ishac, N., Medrzycki, M., Brachet-Botineau, M., Desbourdes, L., Gouilleux-Gruart, V., Pecnard, E., Rouleux-Bonnin, F., Gyan, E., Domenech, J., Mazurier, F., Moriggi, R., Bunting, K. D., Herault, O., & Gouilleux, F. (2017). Oncogenic STAT5 signaling promotes oxidative stress in chronic myeloid leukemia cells by repressing antioxidant defenses. *Oncotarget*, 8(26), 41876–41889. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11480>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in

- 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Burton, G. W., & Ingold, K. U. (1986). Vitamin E – application of the principles of physical organic-chemistry to the exploration of its structure and function. *Accounts of Chemical Research*, 19(7): 194–201. <https://doi.org/10.1021/ar00127a001>.
- Canet-Avilés, R. M., Wilson, M. A., Miller, D. W., Ahmad, R., McLendon, C., Bandyopadhyay, S., Baptista, M. J., Ringe, D., Petsko, G. A., & Cookson, M. R. (2004). The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(24), 9103–9108. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402959101>
- Canman, C. E., & Kastan, M. B. (1995). Induction of apoptosis by tumor suppressor genes and oncogenes. *Seminars in cancer biology*, 6(1), 17–25. <https://doi.org/10.1006/scbi.1995.0003>
- Cao, J., Chen, X., Ying, M., He, Q., & Yang, B. (2017). DJ-1 as a Therapeutic Target Against Cancer. *Advances in experimental medicine and biology*, 1037, 203–222. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-6583-5\\_13](https://doi.org/10.1007/978-981-10-6583-5_13)
- Cao, J., Lou, S., Ying, M., & Yang, B. (2015). DJ-1 as a human oncogene and potential therapeutic target. *Biochemical pharmacology*, 93(3), 241–250. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.11.012>
- Castañeda-Rodríguez CN. (2016) Asociación de la carga de enfermedad por Leucemia pediátrica aguda y las desigualdades en salud por régimen de afiliación y departamento de procedencia en Colombia durante el periodo 2011-2012.; Tesis de Maestría para optar al título de Magister en Salud Pública. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. <http://bdigital.unal.edu.co/57039/1/1010185971-2017.pdf>
- Cervantes, F., Hernández-Boluda, J. C., Steegmann, J. L., Conde, E., Alvarez-Larrán, A., López-Jiménez, J., Osorio, S., Villalón, L., Camós, M., García-Conde, J., & Odriozola, J. (2003). Imatinib mesylate therapy of chronic phase chronic myeloid leukemia resistant or intolerant to interferon: results and prognostic factors for response and progression-free survival in 150 patients. *Haematologica*, 88(10), 1117–1122.
- Chandran, R. K., Geetha, N., Sakthivel, K. M., Kumar, R. S., Krishna, K., & Sreedharan, H. (2019). Differential gene expression changes and their implication on the disease progression in patients with Chronic Myeloid Leukemia. *Blood cells, molecules & diseases*, 77, 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2019.03.004>
- Chen, W., Miao, Y. Q., Fan, D. J., Yang, S. S., Lin, X., Meng, L. K., & Tang, X. (2011). Bioavailability study of berberine and the enhancing effects of TPGS on intestinal absorption in rats. *AAPS PharmSciTech*, 12(2), 705–711. <https://doi.org/10.1208/s12249-011-9632-z>
- Chen, Y., Kang, M., Lu, W., Guo, Q., Zhang, B., Xie, Q., & Wu, Y. (2012). DJ-1, a novel biomarker and a selected target gene for overcoming chemoresistance in pancreatic cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 138(9), 1463–1474. <https://doi.org/10.1007/s00432-012-1205-3>
- Chen, Y., Mo, L., Wang, X., Chen, B., Hua, Y., Gong, L., Yang, F., Li, Y., Chen, F., Zhu, G., Ni, W., Zhang, C., Cheng, Y., Luo, Y., Shi, J., Qiu, M., Wu, S., Tan, Z., & Wang, K. (2020). TPGS-1000 exhibits potent anticancer activity for hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *Aging*, 12(2), 1624–1642. <https://doi.org/10.18632/aging.102704>
- Cheng, H., Sun, G., & Cheng, T. (2018). Hematopoiesis and microenvironment in hematological malignancies. *Cell regeneration (London, England)*, 7(1), 22–26. <https://doi.org/10.1016/j.cr.2018.08.002>

- Chiaradonna, F., Sacco, E., Manzoni, R., Giorgio, M., Vanoni, M., & Alberghina, L. (2006). Ras-dependent carbon metabolism and transformation in mouse fibroblasts. *Oncogene*, 25(39), 5391–5404. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209528>
- Chinery, R., Brockman, J. A., Peeler, M. O., Shyr, Y., Beauchamp, R. D., & Coffey, R. J. (1997). Antioxidants enhance the cytotoxicity of chemotherapeutic agents in colorectal cancer: a p53-independent induction of p21WAF1/CIP1 via C/EBPbeta. *Nature medicine*, 3(11), 1233–1241. <https://doi.org/10.1038/nm1197-1233>
- Chowdhury, A. A., Chaudhuri, J., Biswas, N., Manna, A., Chatterjee, S., Mahato, S. K., Chaudhuri, U., Jaisankar, P., & Bandyopadhyay, S. (2013). Synergistic apoptosis of CML cells by buthionine sulfoximine and hydroxychavicol correlates with activation of AIF and GSH-ROS-JNK-ERK-iNOS pathway. *PLoS one*, 8(9), e73672. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073672>
- Collnot, E. M., Baldes, C., Schaefer, U. F., Edgar, K. J., Wempe, M. F., & Lehr, C. M. (2010). Vitamin E TPGS P-glycoprotein inhibition mechanism: influence on conformational flexibility, intracellular ATP levels, and role of time and site of access. *Molecular pharmaceutics*, 7(3), 642–651. <https://doi.org/10.1021/mp900191s>
- Collnot, E. M., Baldes, C., Wempe, M. F., Kappl, R., Hüttermann, J., Hyatt, J. A., Edgar, K. J., Schaefer, U. F., & Lehr, C. M. (2007). Mechanism of inhibition of P-glycoprotein mediated efflux by vitamin E TPGS: influence on ATPase activity and membrane fluidity. *Molecular pharmaceutics*, 4(3), 465–474. <https://doi.org/10.1021/mp060121r>
- Colombia., I. N. de C. E., & Salud, M. de. (2014). Anuario estadístico: Programa control de cancer. Ministerio de Salud todos por un nuevo país.
- Colombo, M. L. (2010). An update on vitamin E, tocopherol and tocotrienol-perspectives. *Molecules*, 15(4): 2103–2113. <https://doi.org/10.3390/molecules15042103>.
- Constantinou, C., Neophytou, C. M., Vraika, P., Hyatt, J. A., Papas, K. A., & Constantinou, A. I. (2012). Induction of DNA damage and caspase-independent programmed cell death by vitamin E. *Nutrition and cancer*, 64(1), 136–152. <https://doi.org/10.1080/01635581.2012.630167>
- Constantinou, C., Papas, A., & Constantinou, A. I. (2008). Vitamin E and cancer: An insight into the anticancer activities of vitamin E isomers and analogs. *International journal of cancer*, 123(4), 739–752. <https://doi.org/10.1002/ijc.23689>
- Cui, Q., Wang, J. Q., Assaraf, Y. G., Ren, L., Gupta, P., Wei, L., Ashby, C. R., Jr, Yang, D. H., & Chen, Z. S. (2018). Modulating ROS to overcome multidrug resistance in cancer. *Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 41, 1–25. <https://doi.org/10.1016/j.drup.2018.11.001>
- Damiano, S., Montagnaro, S., Puzio, M. V., Severino, L., Pagnini, U., Barbarino, M., Cesari, D., Giordano, A., Florio, S., & Ciarcia, R. (2018). Effects of antioxidants on apoptosis induced by dasatinib and nilotinib in K562 cells. *Journal of cellular biochemistry*, 119(6), 4845–4854. <https://doi.org/10.1002/jcb.26686>
- Deftereos, S. N., Andronis, C., Friedla, E. J., Persidis, A., & Persidis, A. (2011). Drug repurposing and adverse event prediction using high-throughput literature analysis. *Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine*, 3(3), 323–334. <https://doi.org/10.1002/wsbm.147>

- Deininger M. W. (2008). Chronic myeloid leukemia: an historical perspective. *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 418. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2008.1.418>
- Deininger, M. W., Goldman, J. M., & Melo, J. V. (2000). The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*, 96(10), 3343–3356.
- Deininger, M. W., Hodgson, J. G., Shah, N. P., Cortes, J. E., Kim, D. W., Nicolini, F. E., Talpaz, M., Baccarani, M., Müller, M. C., Li, J., Parker, W. T., Lustgarten, S., Clackson, T., Haluska, F. G., Guilhot, F., Kantarjian, H. M., Soverini, S., Hochhaus, A., Hughes, T. P., Rivera, V. M., ... Branford, S. (2016). Compound mutations in BCR-ABL1 are not major drivers of primary or secondary resistance to ponatinib in CP-CML patients. *Blood*, 127(6), 703–712. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-08-660977>
- Delbridge, A. R., & Strasser, A. (2015). The BCL-2 protein family, BH3-mimetics and cancer therapy. *Cell death and differentiation*, 22(7), 1071–1080. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.50>
- Delbridge, A. R., Grabow, S., Strasser, A., & Vaux, D. L. (2016). Thirty years of BCL-2: translating cell death discoveries into novel cancer therapies. *Nature reviews. Cancer*, 16(2), 99–109. <https://doi.org/10.1038/nrc.2015.17>
- Deming, P. B., Schafer, Z. T., Tashker, J. S., Potts, M. B., Deshmukh, M., & Kornbluth, S. (2004). Bcr-Abl-mediated protection from apoptosis downstream of mitochondrial cytochrome c release. *Molecular and cellular biology*, 24(23), 10289–10299. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.23.10289-10299.2004>
- Deng, C. H., & Zhang, Q. P. (2010). Leukemia stem cells in drug resistance and metastasis. *Chinese medical journal*, 123(7), 954–960.
- Dibaei, M., Rouini, M. R., Sheikholeslami, B., Gholami, M., & Dinarvand, R. (2019). The effect of surface treatment on the brain delivery of curcumin nanosuspension: in vitro and in vivo studies. *International journal of nanomedicine*, 14, 5477–5490. <https://doi.org/10.2147/IJN.S199624>
- Dielschneider, R. F., Henson, E. S., & Gibson, S. B. (2017). Lysosomes as Oxidative Targets for Cancer Therapy. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017, 3749157. <https://doi.org/10.1155/2017/3749157>
- Dintaman, J. M., & Silverman, J. A. (1999) Inhibition of P-glycoprotein by D-α-tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate (TPGS). *Pharmaceutical Research*. 16(10): 1550–1556. <https://doi.org/10.1023/a:1015000503629>.
- Dixon, A. S., Kakar, M., Schneider, K. M., Constance, J. E., Paullin, B. C., & Lim, C. S. (2009). Controlling subcellular localization to alter function: Sending oncogenic Bcr-Abl to the nucleus causes apoptosis. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 140(3), 245–249. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.06.026>
- Dong, L. F., Jameson, V. J., Tilly, D., Cerny, J., Mahdavian, E., Marín-Hernández, A., Hernández-Esquível, L., Rodríguez-Enríquez, S., Stursa, J., Witting, P. K., Stantic, B., Rohlena, J., Truksa, J., Kluckova, K., Dyason, J. C., Ledvina, M., Salvatore, B. A., Moreno-Sánchez, R., Coster, M. J., Ralph, S. J., ... Neuzil, J. (2011). Mitochondrial targeting of vitamin E succinate enhances its pro-apoptotic and anti-cancer activity via mitochondrial complex II. *The Journal of biological chemistry*, 286(5), 3717–3728. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.186643>

- Dong, L. F., Low, P., Dyason, J. C., Wang, X. F., Prochazka, L., Witting, P. K., Freeman, R., Swettenham, E., Valis, K., Liu, J., Zobalova, R., Turanek, J., Spitz, D. R., Domann, F. E., Scheffler, I. E., Ralph, S. J., & Neuzil, J. (2008). Alpha-tocopheryl succinate induces apoptosis by targeting ubiquinone-binding sites in mitochondrial respiratory complex II. *Oncogene*, 27(31), 4324–4335. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.69>
- Drapalo, K., & Jozwiak, J. (2018). Parkin, PINK1 and DJ1 as possible modulators of mTOR pathway in ganglioglioma. *The International journal of neuroscience*, 128(2), 167–174. <https://doi.org/10.1080/00207454.2017.1366906>
- Druker B. J. (2008). Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML. *Blood*, 112(13), 4808–4817. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-077958>
- Druker, B. J., & Lydon, N. B. (2000). Lessons learned from the development of an abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. *The Journal of clinical investigation*, 105(1), 3–7. <https://doi.org/10.1172/JCI9083>
- Druker, B. J., Guilhot, F., O'Brien, S. G., Gathmann, I., Kantarjian, H., Gattermann, N., Deininger, M. W., Silver, R. T., Goldman, J. M., Stone, R. M., Cervantes, F., Hochhaus, A., Powell, B. L., Gabrilove, J. L., Rousselot, P., Reiffers, J., Cornelissen, J. J., Hughes, T., Agis, H., Fischer, T., ... IRIS Investigators (2006). Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *The New England journal of medicine*, 355(23), 2408–2417. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa062867>
- Druker, B. J., Talpaz, M., Resta, D. J., Peng, B., Buchdunger, E., Ford, J. M., Lydon, N. B., Kantarjian, H., Capdeville, R., Ohno-Jones, S., & Sawyers, C. L. (2001). Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *The New England journal of medicine*, 344(14), 1031–1037. <https://doi.org/10.1056/NEJM200104053441401>
- Druker, B. J., Tamura, S., Buchdunger, E., Ohno, S., Segal, G. M., Fanning, S., Zimmermann, J., & Lydon, N. B. (1996). Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nature medicine*, 2(5), 561–566. <https://doi.org/10.1038/nm0596-561>
- Du, Y., Xia, Y., Pan, X., Chen, Z., Wang, A., Wang, K., Li, J., & Zhang, J. (2014). Fenretinide targets chronic myeloid leukemia stem/progenitor cells by regulation of redox signaling. *Antioxidants & redox signaling*, 20(12), 1866–1880. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4935>
- Duhem, N., Danhier, F., & Préat, V. (2014). Vitamin E-based nanomedicines for anti-cancer drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 182, 33–44. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.03.009>.
- Eidelman, R. S., Hollar, D., Hebert, P. R., Lamas, G. A., & Hennekens, C. H. (2004). Randomized trials of vitamin E in the treatment and prevention of cardiovascular disease. *Archives of internal medicine*, 164(14), 1552–1556. <https://doi.org/10.1001/archinte.164.14.1552>
- Engin K. N. (2009). Alpha-tocopherol: looking beyond an antioxidant. *Molecular vision*, 15, 855–860.
- European Medicines Agency (2019) Glivec: EPAR- Product Information. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/glivec-epar-product-information\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/glivec-epar-product-information_en.pdf)



- Evans, H. M, & Bishop, K. S. (1922) On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction. *Science*. 56(1458): 650–651. <https://doi.org/10.1126/science.56.1458.650>.
- Faderl, S., Talpaz, M., Estrov, Z., & Kantarjian, H. M. (1999a). Chronic myelogenous leukemia: biology and therapy. *Annals of internal medicine*, 131(3), 207–219. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-131-3-199908030-00008>
- Faderl, S., Talpaz, M., Estrov, Z., O'Brien, S., Kurzrock, R., & Kantarjian, H. M. (1999b). The biology of chronic myeloid leukemia. *The New England journal of medicine*, 341(3), 164–172. <https://doi.org/10.1056/NEJM199907153410306>
- Fan, Z., Wu, J., Fang, X., & Sha, X. (2013). A new function of Vitamin E-TPGS in the intestinal lymphatic transport of lipophilic drugs: enhancing the secretion of chylomicrons. *International journal of pharmaceutics*, 445(1-2), 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.01.070>
- Fowler, A. J., Hebron, M., Missner, A. A., Wang, R., Gao, X., Kurd-Misto, B. T., Liu, X., & Moussa, C. E. (2019). Multikinase Abl/DDR/Src Inhibition Produces Optimal Effects for Tyrosine Kinase Inhibition in Neurodegeneration. *Drugs in R&D*, 19(2), 149–166. <https://doi.org/10.1007/s40268-019-0266-z>
- Fulda, S., & Debatin, K. M. (2006). Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*, 25(34), 4798–4811. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209608>
- Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J. M., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., Dawson, T. M., Dawson, V. L., El-Deiry, W. S., Fulda, S., Gottlieb, E., Green, D. R., Hengartner, M. O., Kepp, O., Knight, R. A., Kumar, S., Lipton, S. A., Lu, X., Madeo, F., Malorni, W., ... Kroemer, G. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell death and differentiation*, 19(1), 107–120. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.96>
- Gao, L., Chen, L., Fei, X. H., Qiu, H. Y., Zhou, H., & Wang, J. M. (2006). STI571 combined with vincristine greatly suppressed the tumor formation of multidrug-resistant K562 cells in a human-nude mice xenograft model. *Chinese medical journal*, 119(11), 911–918.
- Geng, X., Zhang, M., Wang, X., Sun, J., Zhao, X., Zhang, L., Wang, X., & Shen, Z. (2020). Selective and sensitive detection of chronic myeloid leukemia using fluorogenic DNAzyme probes. *Analytica chimica acta*, 1123, 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.04.069>
- Goldman J. (2003). Chronic myeloid leukemia--past, present, and future. *Seminars in hematology*, 40(1), 1–3. <https://doi.org/10.1053/shem.2003.50010>
- Goldman J. M. (2010). Chronic myeloid leukemia: a historical perspective. *Seminars in hematology*, 47(4), 302–311. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2010.07.001>
- Goldman, J. M., & Melo, J. V. (2003). Chronic myeloid leukemia--advances in biology and new approaches to treatment. *The New England journal of medicine*, 349(15), 1451–1464. <https://doi.org/10.1056/NEJMra020777>

- González, E., Grille, S., Vales, V., Boada, M., Clínica Lorela M. Zanella, Leal, D., Gasparini, N.P., Guillermo, C., Agriello, E.E., Stevenazzi, M., Lens, D. (2016) Estudio del ratio de FLT3-ITD como factor pronóstico en leucemias agudas mieloides: primeros casos estudiados en Uruguay. *Rev Med Urug*; 32(3). [http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1688-03902016000300003](http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1688-03902016000300003)
- Gray, N. S., & Fabbro, D. (2014). Discovery of allosteric BCR-ABL inhibitors from phenotypic screen to clinical candidate. *Methods in enzymology*, 548, 173–188. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397918-6.00007-0>
- Grimaudo, M. A., Pescina, S., Padula, C., Santi, P., Concheiro, A., Alvarez-Lorenzo, C., & Nicoli, S. (2018). Poloxamer 407/TPGS Mixed Micelles as Promising Carriers for Cyclosporine Ocular Delivery. *Molecular pharmaceuticals*, 15(2), 571–584. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.7b00939>
- Groarke, E. M., & Young, N. S. (2019). Aging and Hematopoiesis. *Clinics in geriatric medicine*, 35(3), 285–293. <https://doi.org/10.1016/j.cger.2019.03.001>
- Guo, J., Zhao, W., Hao, W., Ren, G., Lu, J., & Chen, X. (2014). Cucurbitacin B induces DNA damage, G2/M phase arrest, and apoptosis mediated by reactive oxygen species (ROS) in leukemia K562 cells. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, 14(8), 1146–1153. <https://doi.org/10.2174/1871520614666140601220915>
- Guo, Y., Luo, J., Tan, S., Otieno, B. O., & Zhang, Z. (2013). The applications of Vitamin E TPGS in drug delivery. *European journal of pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 49(2), 175–186. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2013.02.006>
- Gupta, S. C., Sung, B., Prasad, S., Webb, L. J., & Aggarwal, B. B. (2013). Cancer drug discovery by repurposing: teaching new tricks to old dogs. *Trends in pharmacological sciences*, 34(9), 508–517. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.06.005>
- Gupta-Elera, G., Garrett, A. R., Robison, R. A., & O'Neill, K. L. (2012). The role of oxidative stress in prostate cancer. *European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, 21(2), 155–162. <https://doi.org/10.1097/CEJ.0b013e32834a8002>
- Gurer-Orhan, H., Ince, E., Konyar, D., Saso, L., & Suzen, S. (2018). The Role of Oxidative Stress Modulators in Breast Cancer. *Current medicinal chemistry*, 25(33), 4084–4101. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170711114336>
- Habets, R. A., de Bock, C. E., Serneels, L., Lodewijckx, I., Verbeke, D., Nittner, D., Narlawar, R., Demeyer, S., Dooley, J., Liston, A., Taghon, T., Cools, J., & de Strooper, B. (2019). Safe targeting of T cell acute lymphoblastic leukemia by pathology-specific NOTCH inhibition. *Science translational medicine*, 11(494), eaau6246. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aau6246>
- Hall, C., & Muller, P. (2019). The Diverse Functions of Mutant 53, Its Family Members and Isoforms in Cancer. *International journal of molecular sciences*, 20(24), 6188. <https://doi.org/10.3390/ijms20246188>

- Halliwell B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society transactions*, 35(Pt 5), 1147–1150. <https://doi.org/10.1042/BST0351147>
- Hanahan, D. & Weinberg, R. A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144(5): 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hecht, F., Pessoa, C. F., Gentile, L. B., Rosenthal, D., Carvalho, D. P., & Fortunato, R. S. (2016). The role of oxidative stress on breast cancer development and therapy. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 37(4), 4281–4291. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-4873-9>
- Heckl, D., Kowalczyk, M. S., Yudovich, D., Belizaire, R., Puram, R. V., McConkey, M. E., Thielke, A., Aster, J. C., Regev, A., & Ebert, B. L. (2014). Generation of mouse models of myeloid malignancy with combinatorial genetic lesions using CRISPR-Cas9 genome editing. *Nature biotechnology*, 32(9), 941–946. <https://doi.org/10.1038/nbt.2951>
- Hehlmann, R., Hochhaus, A., Baccarani, M., & European LeukemiaNet (2007). Chronic myeloid leukaemia. *Lancet (London, England)*, 370(9584), 342–350. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61165-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61165-9)
- Heisterkamp, N., & Groffen, J. (2002). Philadelphia-positive leukemia: a personal perspective. *Oncogene*, 21(56), 8536–8540. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206080>
- Heisterkamp, N., Groffen, J., Stephenson, J. R., Spurr, N. K., Goodfellow, P. N., Solomon, E., Carritt, B., & Bodmer, W. F. (1982). Chromosomal localization of human cellular homologues of two viral oncogenes. *Nature*, 299(5885), 747–749. <https://doi.org/10.1038/299747a0>
- Hernández Ramirez P. (2001) Nueva opción terapéutica en la leucemia mieloide crónica. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 17(3) 205-10. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-02892001000300009](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892001000300009)
- Hijioka, M., Inden, M., Yanagisawa, D., & Kitamura, Y. (2017). DJ-1/PARK7: A New Therapeutic Target for Neurodegenerative Disorders. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 40(5), 548–552. <https://doi.org/10.1248/bpb.b16-01006>
- Hochhaus, A., Larson, R. A., Guilhot, F., Radich, J. P., Branford, S., Hughes, T. P., Baccarani, M., Deininger, M. W., Cervantes, F., Fujihara, S., Ortmann, C. E., Menssen, H. D., Kantarjian, H., O'Brien, S. G., Druker, B. J., & IRIS Investigators (2017). Long-Term Outcomes of Imatinib Treatment for Chronic Myeloid Leukemia. *The New England journal of medicine*, 376(10), 917–927. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1609324>
- Hole, P. S., Darley, R. L., & Tonks, A. (2011). Do reactive oxygen species play a role in myeloid leukemias?. *Blood*, 117(22), 5816–5826. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-326025>
- Houshmand, M., Simonetti, G., Circosta, P., Gaidano, V., Cignetti, A., Martinelli, G., Saglio, G., & Gale, R. P. (2019). Chronic myeloid leukemia stem cells. *Leukemia*, 33(7), 1543–1556. <https://doi.org/10.1038/s41375-019-0490-0>
- Hu, L., Zhang, Y., Miao, W., & Cheng, T. (2019). Reactive Oxygen Species and Nrf2: Functional and Transcriptional Regulators of Hematopoiesis. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019, 5153268. <https://doi.org/10.1155/2019/5153268>

- Hughes, T. P., Hochhaus, A., Branford, S., Müller, M. C., Kaeda, J. S., Foroni, L., Druker, B. J., Guilhot, F., Larson, R. A., O'Brien, S. G., Rudoltz, M. S., Mone, M., Wehrle, E., Modur, V., Goldman, J. M., Radich, J. P., & IRIS investigators (2010). Long-term prognostic significance of early molecular response to imatinib in newly diagnosed chronic myeloid leukemia: an analysis from the International Randomized Study of Interferon and STI571 (IRIS). *Blood*, 116(19), 3758–3765. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-03-273979>
- Hunter T. (2007). Treatment for chronic myelogenous leukemia: the long road to imatinib. *The Journal of clinical investigation*, 117(8), 2036–2043. <https://doi.org/10.1172/JCI31691>
- Instituto nacional de cancerología-ESE Colombia. (2017) Análisis de Situación del Cáncer en Colombia 2015. Strategy Ltda. Primera edición. [http://www.cancer.gov.co/Situacion\\_del\\_Cancer\\_en\\_Colombia\\_2015.pdf](http://www.cancer.gov.co/Situacion_del_Cancer_en_Colombia_2015.pdf)
- Irwin, M. E., Rivera-Del Valle, N., & Chandra, J. (2013). Redox control of leukemia: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants & redox signaling*, 18(11), 1349–1383. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4258>
- Ismail, I. A., Abdel Shakor, A. B., & Hong, S. H. (2015). DJ-1 Protects Breast Cancer Cells Against 2'-Benzoyloxycinnamaldehyde-induced Oxidative Stress Independent of Nrf2. *Journal of cellular physiology*, 230(9), 2262–2269. <https://doi.org/10.1002/jcp.24957>
- Issa, N. T., Kruger, J., Byers, S. W., & Dakshanamurthy, S. (2013). Drug repurposing a reality: from computers to the clinic. *Expert review of clinical pharmacology*, 6(2), 95–97. <https://doi.org/10.1586/ecp.12.79>
- Jaiswal, S., Traver, D., Miyamoto, T., Akashi, K., Lagasse, E., & Weissman, I. L. (2003). Expression of BCR/ABL and BCL-2 in myeloid progenitors leads to myeloid leukemias. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(17), 10002–10007. <https://doi.org/10.1073/pnas.1633833100>
- Jan, M., Ebert, B. L., & Jaiswal, S. (2017). Clonal hematopoiesis. *Seminars in hematology*, 54(1), 43–50. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2016.10.002>
- Jendrossek V. (2013). Targeting apoptosis pathways by Celecoxib in cancer. *Cancer letters*, 332(2), 313–324. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.01.012>
- Jiang, Q. (2014). Natural forms of vitamin E: Metabolism, antioxidant, and anti-inflammatory activities and their role in disease prevention and therapy. *Free Radical Biology & Medicine* 72: 76-90. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.03.035>.
- Jimenez-Del-Rio, M., & Velez-Pardo, C. (2015). Alzheimer's Disease, Drosophila melanogaster and Polyphenols. *Advances in experimental medicine and biology*, 863, 21–53. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-18365-7\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-18365-7_2)
- Ju, J., Picinich, S. C., Yang, Z., Zhao, Y., Suh, N., Kong, A. N., & Yang, C. S. (2010). Cancer-preventive activities of tocopherols and tocotrienols. *Carcinogenesis*, 31(4), 533–542. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp205>
- Kaatsch P. (2010). Epidemiology of childhood cancer. *Cancer treatment reviews*, 36(4), 277–285. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2010.02.003>

- Kale, V. P., Habib, H., Chitren, R., Patel, M., Pramanik, K. C., Jonnalagadda, S. C., Challagundla, K., & Pandey, M. K. (2020). Old drugs, new uses: Drug repurposing in hematological malignancies. *Seminars in cancer biology*, S1044-579X(20)30063-8. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.semcan.2020.03.005>
- Kalkavan, H., & Green, D. R. (2018). MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business. *Cell death and differentiation*, 25(1), 46–55. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.179>
- Kalyanaraman, B., Cheng, G., Hardy, M., Ouari, O., Lopez, M., Joseph, J., Zielonka, J., & Dwinell, M. B. (2018). A review of the basics of mitochondrial bioenergetics, metabolism, and related signaling pathways in cancer cells: Therapeutic targeting of tumor mitochondria with lipophilic cationic compounds. *Redox biology*, 14, 316–327. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.09.020>
- Kang, C. D., Lee, B. K., Kim, K. W., Kim, C. M., Kim, S. H., & Chung, B. S. (1996). Signaling mechanism of PMA-induced differentiation of K562 cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 221(1), 95–100. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.0551>
- Keeshan, K., Cotter, T. G., & McKenna, S. L. (2002). High Bcr-Abl expression prevents the translocation of Bax and Bad to the mitochondrion. *Leukemia*, 16(9), 1725–1734. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402576>
- Kerr J. F. (2002). History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology*, 181-182, 471–474. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(02\)00457-2](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(02)00457-2)
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, 26(4), 239–257. <https://doi.org/10.1038/bjc.1972.33>
- Khoshtabiat, L., Mahdavi, M., Dehghan, G., & Rashidi, M. R. (2016). Oxidative Stress-Induced Apoptosis in Chronic Myelogenous Leukemia K562 Cells by an Active Compound from the Dithio- Carbamate Family. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 17(9), 4267–4273.
- Kim, J. H., Chu, S. C., Gramlich, J. L., Pride, Y. B., Babendreier, E., Chauhan, D., Salgia, R., Podar, K., Griffin, J. D., & Sattler, M. (2005). Activation of the PI3K/mTOR pathway by BCR-ABL contributes to increased production of reactive oxygen species. *Blood*, 105(4), 1717–1723. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-03-0849>
- Kinumi, T., Kimata, J., Taira, T., Ariga, H., & Niki, E. (2004). Cysteine-106 of DJ-1 is the most sensitive cysteine residue to hydrogen peroxide-mediated oxidation in vivo in human umbilical vein endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 317(3), 722–728. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.03.110>
- Kluckova, K., Bezawork-Geleta, A., Rohlena, J., Dong, L., & Neuzil, J. (2013). Mitochondrial complex II, a novel target for anti-cancer agents. *Biochimica et biophysica acta*, 1827(5), 552–564. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.10.015>
- Koeffler, H. P., & Golde, D. W. (1980). Human myeloid leukemia cell lines: a review. *Blood*, 56(3), 344–350.
- Kondakçı, E., Özyürek, M., Güçlü, K., & Apak, R. (2013). Novel pro-oxidant activity assay for polyphenols, vitamins C and E using a modified CUPRAC method. *Talanta*, 115, 583–589. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.06.006>

- Koptyra, M., Falinski, R., Nowicki, M. O., Stoklosa, T., Majsterek, I., Nieborowska-Skorska, M., Blasiak, J., & Skorski, T. (2006). BCR/ABL kinase induces self-mutagenesis via reactive oxygen species to encode imatinib resistance. *Blood*, 108(1), 319–327. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-07-2815>
- Koudelka, S., Turanek Knotigova, P., Masek, J., Prochazka, L., Lukac, R., Miller, A. D., Neuzil, J., & Turanek, J. (2015). Liposomal delivery systems for anti-cancer analogues of vitamin E. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 207, 59–69. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.04.003>
- Koufaki M. (2016). Vitamin E derivatives: a patent review (2010 - 2015). Expert opinion on therapeutic patents, 26(1), 35–47. <https://doi.org/10.1517/13543776.2016.1106476>
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Green, D. R., Hengartner, M., Knight, R. A., Kumar, S., Lipton, S. A., Malorni, W., Nuñez, G., Peter, M. E., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., ... Nomenclature Committee on Cell Death 2009 (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell death and differentiation*, 16(1), 3–11. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.150>
- Kudryavtseva, A. V., Krasnov, G. S., Dmitriev, A. A., Alekseev, B. Y., Kardymon, O. L., Sadritdinova, A. F., Fedorova, M. S., Pokrovsky, A. V., Melnikova, N. V., Kaprin, A. D., Moskalev, A. A., & Snezhkina, A. V. (2016). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and cancer. *Oncotarget*, 7(29), 44879–44905. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9821>
- Kurokawa, M., Zhao, C., Reya, T., & Kornbluth, S. (2008). Inhibition of apoptosome formation by suppression of Hsp90beta phosphorylation in tyrosine kinase-induced leukemias. *Molecular and cellular biology*, 28(17), 5494–5506. <https://doi.org/10.1128/MCB.00265-08>
- Langedijk, J., Mantel-Teeuwisse, A. K., Slijkerman, D. S., & Schutjens, M. H. (2015). Drug repositioning and repurposing: terminology and definitions in literature. *Drug discovery today*, 20(8), 1027–1034. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.05.001>
- Laurent, E., Talpaz, M., Kantarjian, H., & Kurzrock, R. (2001). The BCR gene and philadelphia chromosome-positive leukemogenesis. *Cancer research*, 61(6), 2343–2355.
- Lauridsen, C., & Jensen, S. K. (2012).  $\alpha$ -Tocopherol incorporation in mitochondria and microsomes upon supranutritional vitamin E supplementation. *Genes & nutrition*, 7(4), 475–482. <https://doi.org/10.1007/s12263-012-0286-6>
- Law, J. C., Ritke, M. K., Yalowich, J. C., Leder, G. H., & Ferrell, R. E. (1993). Mutational inactivation of the p53 gene in the human erythroid leukemic K562 cell line. *Leukemia research*, 17(12), 1045–1050. [https://doi.org/10.1016/0145-2126\(93\)90161-d](https://doi.org/10.1016/0145-2126(93)90161-d)
- Leber, B., Lin, J., & Andrews, D. W. (2010). Still embedded together binding to membranes regulates Bcl-2 protein interactions. *Oncogene*, 29(38), 5221–5230. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.283>
- Leppä, S., & Bohmann, D. (1999). Diverse functions of JNK signaling and c-Jun in stress response and apoptosis. *Oncogene*, 18(45), 6158–6162. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203173>
- Leyto-Cruz F. (2018). Leucemia mieloide aguda. *Revista de Hematología Mexicana*. 19(1): 24-40
- Li, H., Yan, L., Tang, E., Zhang, Z., Chen, W., Liu, G., & Mo, J. (2019). Synthesis of TPGS/Curcumin Nanoparticles by Thin-Film Hydration and Evaluation of Their Anti-Colon Cancer Efficacy In Vitro and In Vivo. *Frontiers in pharmacology*, 10, 769. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00769>

- Li, Q., Tang, Y., Qin, J., Yi, L., Yang, Y., Wang, J., He, J., Su, Q., & Tan, H. (2016). Subcellular localization of DJ-1 in human HL-60 leukemia cells in response to diallyl disulfide treatment. *Molecular medicine reports*, 14(5), 4666–4672. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5831>
- Li, Y., Shao, J., Shen, K., Xu, Y., Liu, J., & Qian, X. (2012). E2F1-dependent pathways are involved in amonafide analogue 7-d-induced DNA damage, G2/M arrest, and apoptosis in p53-deficient K562 cells. *Journal of cellular biochemistry*, 113(10), 3165–3177. <https://doi.org/10.1002/jcb.24194>
- Lindholm, D., Pham, D. D., Cascone, A., Eriksson, O., Wennerberg, K., & Saarma, M. (2016). c-Abl Inhibitors Enable Insights into the Pathophysiology and Neuroprotection in Parkinson's Disease. *Frontiers in aging neuroscience*, 8, 254. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2016.00254>
- Ling, M. T., Luk, S. U., Al-Ejeh, F., & Khanna, K. K. (2012). Tocotrienol as a potential anticancer agent. *Carcinogenesis*, 33(2), 233–239. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgr261>
- Liu, H., Wang, M., Li, M., Wang, D., Rao, Q., Wang, Y., Xu, Z., & Wang, J. (2008). Expression and role of DJ-1 in leukemia. *Biochemical and biophysical research communications*, 375(3), 477–483. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.08.046>
- Lonskaya, I., Hebron, M. L., Desforgues, N. M., Schachter, J. B., & Moussa, C. E. (2014). Nilotinib-induced autophagic changes increase endogenous parkin level and ubiquitination, leading to amyloid clearance. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 92(4), 373–386. <https://doi.org/10.1007/s00109-013-1112-3>
- Lopez, J., & Tait, S. W. (2015). Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. *British journal of cancer*, 112(6), 957–962. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.85>
- Lozzio, C. B., & Lozzio, B. B. (1975). Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood*, 45(3), 321–334.
- Lu, H., Hou, G., Zhang, Y., Dai, Y., & Zhao, H. (2014). c-Jun transactivates Puma gene expression to promote osteoarthritis. *Molecular medicine reports*, 9(5), 1606–1612. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.1981>
- Lushchak V. I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-biological interactions*, 224, 164–175. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.10.016>
- Machado-Alba, J.E., & Machado-Duque M.E. (2017). Use patterns of first-line inhibitors of tyrosine kinase and time to change to second-line therapy in chronic myeloid leukemia. *International journal of clinical pharmacy*, 39(4), 851-859. <https://doi:10.1007/s11096-017-0484-6>
- Machado-Silva, A., Perrier, S., & Bourdon, J. C. (2010). p53 family members in cancer diagnosis and treatment. *Seminars in cancer biology*, 20(1), 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2010.02.005>
- Mahon F. X. (2017). Treatment-free remission in CML: who, how, and why?. *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 2017(1), 102–109. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2017.1.102>
- Mahon, F. X., Fabères, C., Pueyo, S., Cony-Makhoul, P., Salmi, R., Boiron, J. M., Marit, G., Bilhou-Nabera, C., Carrère, A., Montastruc, M., Pigneux, A., Bernard, P., & Reiffers, J. (1998).

Response at three months is a good predictive factor for newly diagnosed chronic myeloid leukemia patients treated by recombinant interferon-alpha. *Blood*, 92(11), 4059–4065.

Manor, D., & Morley, S. (2007). The alpha-tocopherol transfer protein. *Vitamins and Hormones*, 76: 45-65. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(07\)76003-X](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(07)76003-X).

Martinez-Castillo, M., Bonilla-Moreno, R., Aleman-Lazarini, L., Meraz-Rios, M. A., Orozco, L., Cedillo-Barron, L., Cordova, E. J., & Villegas-Sepulveda, N. (2016). A Subpopulation of the K562 Cells Are Killed by Curcumin Treatment after G2/M Arrest and Mitotic Catastrophe. *PLoS one*, 11(11), e0165971. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165971>

Martinez-Perez, D. A., Jimenez-Del-Rio, M., & Velez-Pardo, C. (2018). Epigallocatechin-3-Gallate Protects and Prevents Paraquat-Induced Oxidative Stress and Neurodegeneration in Knockdown dj-1- $\beta$  *Drosophila melanogaster*. *Neurotoxicity research*, 34(3), 401–416. <https://doi.org/10.1007/s12640-018-9899-x>

Melo, J. V., Hughes, T. P., & Apperley, J. F. (2003). Chronic myeloid leukemia. *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 132–152. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2003.1.132>

Mendivil-Pérez, M., Jimenez-Del-Rio, M., & Vélez-Pardo, C. (2014). Response to rotenone is glucose-sensitive in a model of human acute lymphoblastic leukemia: involvement of oxidative stress mechanism, DJ-1, Parkin, and PINK-1 proteins. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2014, 457154. <https://doi.org/10.1155/2014/457154>

Mendivil-Perez, M., Velez-Pardo, C., & Jimenez-Del-Rio, M. (2012). TPEN induces apoptosis independently of zinc chelator activity in a model of acute lymphoblastic leukemia and ex vivo acute leukemia cells through oxidative stress and mitochondria caspase-3- and AIF-dependent pathways. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2012, 313275. <https://doi.org/10.1155/2012/313275>

Mendivil-Perez, M., Jimenez-Del-Rio, M., & Velez-Pardo, C. (2014). Response to rotenone is glucose-sensitive in a model of human acute lymphoblastic leukemia: involvement of oxidative stress mechanism, DJ-1, Parkin, and PINK-1 proteins. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2014, 457154. <https://doi.org/10.1155/2014/457154>

Mendivil-Perez, M., Velez-Pardo, C., & Jimenez-Del-Rio, M. (2015). Doxorubicin induces apoptosis in Jurkat cells by mitochondria-dependent and mitochondria-independent mechanisms under normoxic and hypoxic conditions. *Anti-cancer drugs*, 26(6), 583–598. <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000223>

Meganathan, P., & Fu, J. Y. (2016). Biological Properties of Tocotrienols: Evidence in Human Studies. *International journal of molecular sciences*, 17(11), 1682. <https://doi.org/10.3390/ijms17111682>

Meng, Q., & Xia, Y. (2011). c-Jun, at the crossroad of the signaling network. *Protein & cell*, 2(11), 889–898. <https://doi.org/10.1007/s13238-011-1113-3>

Meshkini, A., & Yazdanparast, R. (2012). Involvement of oxidative stress in taxol-induced apoptosis in chronic myelogenous leukemia K562 cells. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie*, 64(4), 357–365. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2010.09.010>



- Mi, Y., Liu, Y., & Feng, S. S. (2011). Formulation of Docetaxel by folic acid-conjugated d- $\alpha$ -tocopheryl polyethylene glycol succinate 2000 (Vitamin E TPGS(2k)) micelles for targeted and synergistic chemotherapy. *Biomaterials*, 32(16), 4058–4066. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.02.022>
- Miller, G. D., Bruno, B. J., & Lim, C. S. (2014). Resistant mutations in CML and Ph(+)-ALL - role of ponatinib. *Biologics : targets & therapy*, 8, 243–254. <https://doi.org/10.2147/BTT.S50734>
- Ministerio de protección social, instituto nacional de cancerología. (2013) Guía de práctica clínica para el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de Leucemias Linfocíticas, Mieloides y linfoma No Hodgkin en población mayor de 18 años (Leucemia Mielocítica Crónica). <http://www.cancer.gov.co//images/pdf/GUIAS-EN-DESARROLLO/LEUCEMIAS/Alcancer%20y%20Objetivos%20LMC.pdf>
- Miyazawa, T., Burdeos, G. C., Itaya, M., Nakagawa, K., & Miyazawa, T. (2019). Vitamin E: Regulatory Redox Interactions. *IUBMB life*, 71(4), 430–441. <https://doi.org/10.1002/iub.2008>
- Miyazawa, T., Shibata, A., Sookwong, P., Kawakami, Y., Eitsuka, T., Asai, A., Oikawa, S., & Nakagawa, K. (2009). Antiangiogenic and anticancer potential of unsaturated vitamin E (tocotrienol). *The Journal of nutritional biochemistry*, 20(2), 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2008.09.003>
- Mizuta, R., Araki, S., Furukawa, M., Furukawa, Y., Ebara, S., Shiokawa, D., Hayashi, K., Tanuma, S., & Kitamura, D. (2013). DNase  $\gamma$  is the effector endonuclease for internucleosomal DNA fragmentation in necrosis. *PLoS one*, 8(12), e80223. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080223>
- Mo, J. S., Kim, M. Y., Ann, E. J., Hong, J. A., & Park, H. S. (2008). DJ-1 modulates UV-induced oxidative stress signaling through the suppression of MEKK1 and cell death. *Cell death and differentiation*, 15(6), 1030–1041. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.26>
- Moloney, J. N., & Cotter, T. G. (2018). ROS signalling in the biology of cancer. *Seminars in cell & developmental biology*, 80, 50–64. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.05.023>
- Morales C, Torres V, Valencia JE, Ribón G, Manrique RD. (2010) Leucemia mielocítica crónica: diagnóstico y tratamiento. *Rev CES Med*; 24(1):97-108. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-87052010000100010](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-87052010000100010)
- Moreno AL. (2009) Respuesta de los pacientes con Leucemia Mielocítica Crónica al tratamiento con Imatinib. Trabajo de grado para optar al título de bacterióloga. Pontificia Universidad Javeriana. <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis316.pdf>
- Mortezaee, K., Salehi, E., Mirtavoos-Mahyari, H., Motevaseli, E., Najafi, M., Farhood, B., Rosengren, R. J., & Sahebkar, A. (2019). Mechanisms of apoptosis modulation by curcumin: Implications for cancer therapy. *Journal of cellular physiology*, 234(8), 12537–12550. <https://doi.org/10.1002/jcp.28122>
- Mudduluru, G., Walther, W., Kobelt, D., Dahlmann, M., Treese, C., Assaraf, Y. G., & Stein, U. (2016). Repositioning of drugs for intervention in tumor progression and metastasis: Old drugs for new targets. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 26, 10–27. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2016.03.002>

- Musselman, J. R., Blair, C. K., Cerhan, J. R., Nguyen, P., Hirsch, B., & Ross, J. A. (2013). Risk of adult acute and chronic myeloid leukemia with cigarette smoking and cessation. *Cancer epidemiology*, 37(4), 410–416. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2013.03.012>
- Naghdi, S., & Hajnóczky, G. (2016). VDAC2-specific cellular functions and the underlying structure. *Biochimica et biophysica acta*, 1863(10), 2503–2514. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.04.020>
- National Cancer Institute (NCI). (2014). Definition of leukemia. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/leukemia>
- National cancer institute (NCI). (2008). Blood cell development. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMHT0022061/?figure=1>
- Naughton, R., Quiney, C., Turner, S. D., & Cotter, T. G. (2009). Bcr-Abl-mediated redox regulation of the PI3K/AKT pathway. *Leukemia*, 23(8), 1432–1440. <https://doi.org/10.1038/leu.2009.49>
- Neophytou, C. M., & Constantinou, A. I. (2015). Drug Delivery Innovations for Enhancing the Anticancer Potential of Vitamin E Isoforms and Their Derivatives. *BioMed research international*, 2015, 584862. <https://doi.org/10.1155/2015/584862>
- Neophytou, C. M., Constantinou, C., Papageorgis, P., & Constantinou, A. I. (2014). D-alpha-tocopheryl polyethylene glycol succinate (TPGS) induces cell cycle arrest and apoptosis selectively in Survivin-overexpressing breast cancer cells. *Biochemical pharmacology*, 89(1), 31–42. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.02.003>
- Neophytou, C. M., Mesaritis, A., Gregoriou, G., & Constantinou, A. I. (2019). d-a-Tocopheryl Polyethylene Glycol 1000 Succinate and a small-molecule Survivin suppressant synergistically induce apoptosis in SKBR3 breast cancer cells. *Scientific reports*, 9(1), 14375. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50884-9>
- Neuzil, J., Weber, T., Schröder, A., Lu, M., Ostermann, G., Gellert, N., Mayne, G. C., Olejnicka, B., Nègre-Salvayre, A., Stícha, M., Coffey, R. J., & Weber, C. (2001a). Induction of cancer cell apoptosis by alpha-tocopheryl succinate: molecular pathways and structural requirements. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 15(2), 403–415. <https://doi.org/10.1096/fj.00-0251.com>
- Neuzil, J., Weber, T., Gellert, N., & Weber, C. (2001b). Selective cancer cell killing by alpha-tocopheryl succinate. *British journal of cancer*, 84(1), 87–89. <https://doi.org/10.1054/bjoc.2000.1559>
- Neuzil, J., Tomasetti, M., Mellick, A. S., Alleva, R., Salvatore, B. A., Birringer, M., & Fariss, M. W. (2004). Vitamin E analogues: a new class of inducers of apoptosis with selective anti-cancer effects. *Current cancer drug targets*, 4(4), 355–372. <https://doi.org/10.2174/1568009043332943>
- Neuzil, J., Wang, X. F., Dong, L. F., Low, P., & Ralph, S. J. (2006). Molecular mechanism of 'mitocan'-induced apoptosis in cancer cells epitomizes the multiple roles of reactive oxygen species and Bcl-2 family proteins. *FEBS letters*, 580(22), 5125–5129. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.05.072>
- Neuzil, J., Tomasetti, M., Zhao, Y., Dong, L. F., Birringer, M., Wang, X. F., Low, P., Wu, K., Salvatore, B. A., & Ralph, S. J. (2007). Vitamin E analogs, a novel group of "mitocans," as anticancer agents: the importance of being redox-silent. *Molecular pharmacology*, 71(5), 1185–1199. <https://doi.org/10.1124/mol.106.030122>

- Neuzil, J., Dong, L. F., Rohlena, J., Truksa, J., & Ralph, S. J. (2013). Classification of mitocans, anti-cancer drugs acting on mitochondria. *Mitochondrion*, 13(3), 199–208. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2012.07.112>
- Neviani, P., Santhanam, R., Oaks, J. J., Eiring, A. M., Notari, M., Blaser, B. W., Liu, S., Trotta, R., Muthusamy, N., Gambacorti-Passerini, C., Druker, B. J., Cortes, J., Marcucci, G., Chen, C. S., Verrills, N. M., Roy, D. C., Caligiuri, M. A., Bloomfield, C. D., Byrd, J. C., & Perrotti, D. (2007). FTY720, a new alternative for treating blast crisis chronic myelogenous leukemia and Philadelphia chromosome-positive acute lymphocytic leukemia. *The Journal of clinical investigation*, 117(9), 2408–2421. <https://doi.org/10.1172/JCI31095>
- Nicolini, F. E., Ibrahim, A. R., Soverini, S., Martinelli, G., Müller, M. C., Hochhaus, A., Dufva, I. H., Kim, D. W., Cortes, J., Mauro, M. J., Chuah, C., Labussière, H., Morisset, S., Roche-Lestienne, C., Lippert, E., Hayette, S., Peter, S., Zhou, W., Maguer-Satta, V., Michallet, M., ... Etienne, G. (2013). The BCR-ABL315I mutation compromises survival in chronic phase chronic myelogenous leukemia patients resistant to tyrosine kinase inhibitors, in a matched pair analysis. *Haematologica*, 98(10), 1510–1516. <https://doi.org/10.3324/haematol.2012.080234>
- Niki, E. (2014). Role of vitamin E as a lipid-soluble peroxy radical scavenger: in vitro and in vivo evidence. *Free Radical Biology and Medicine*. 66: 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.03.022>.
- Nowell P. C. (2007). Discovery of the Philadelphia chromosome: a personal perspective. *The Journal of clinical investigation*, 117(8), 2033–2035. <https://doi.org/10.1172/JCI31771>
- Nurhayati, R. W., Ojima, Y., Nomura, N., & Taya, M. (2014). Promoted megakaryocytic differentiation of K562 cells through oxidative stress caused by near ultraviolet irradiation. *Cellular & molecular biology letters*, 19(4), 590–600. <https://doi.org/10.2478/s11658-014-0215-3>
- O'Brien, S. G., Guilhot, F., Larson, R. A., Gathmann, I., Baccarani, M., Cervantes, F., Cornelissen, J. J., Fischer, T., Hochhaus, A., Hughes, T., Lechner, K., Nielsen, J. L., Rousselot, P., Reiffers, J., Saglio, G., Shepherd, J., Simonsson, B., Gratwohl, A., Goldman, J. M., Kantarjian, H., ... IRIS Investigators (2003). Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *The New England journal of medicine*, 348(11), 994–1004. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa022457>
- Okuhashi, Y., Itoh, M., Arai, A., Nara, N., & Tohda, S. (2010). Gamma-secretase inhibitors induce erythroid differentiation in erythroid leukemia cell lines. *Anticancer research*, 30(10), 4071–4074.
- Oprea, T. I., Bauman, J. E., Bologna, C. G., Buranda, T., Chigae, A., Edwards, B. S., Jarvik, J. W., Gresham, H. D., Haynes, M. K., Hjelle, B., Hromas, R., Hudson, L., Mackenzie, D. A., Muller, C. Y., Reed, J. C., Simons, P. C., Smagley, Y., Strouse, J., Surviladze, Z., Thompson, T., ... Sklar, L. A. (2011). Drug Repurposing from an Academic Perspective. *Drug discovery today. Therapeutic strategies*, 8(3-4), 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.ddstr.2011.10.002>
- Oprea, T. I., & Mestres, J. (2012). Drug repurposing: far beyond new targets for old drugs. *The AAPS Journal*. 14(4): 759–763. <https://doi.org/10.1208/s12248-012-9390-1>.
- Ortega-Arellano, H. F., Jimenez-Del-Rio, M., & Velez-Pardo, C. (2019). Neuroprotective Effects of Methanolic Extract of Avocado Persea americana (var. Colinred) Peel on Paraquat-Induced

- Locomotor Impairment, Lipid Peroxidation and Shortage of Life Span in Transgenic knockdown Parkin *Drosophila melanogaster*. *Neurochemical research*, 44(8), 1986–1998. <https://doi.org/10.1007/s11064-019-02835-z>
- Palao-Suay, R., Aguilar, M. R., Parra-Ruiz, F. J., Fernández-Gutiérrez, M., Parra, J., Sánchez-Rodríguez, C., Sanz-Fernández, R., Rodrigáñez, L., & Román, J. S. (2015). Anticancer and antiangiogenic activity of surfactant-free nanoparticles based on self-assembled polymeric derivatives of vitamin E: structure-activity relationship. *Biomacromolecules*, 16(5), 1566–1581. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5b00130>
- Pandolfi, A., Barreyro, L., & Steidl, U. (2013). Concise review: preleukemic stem cells: molecular biology and clinical implications of the precursors to leukemia stem cells. *Stem cells translational medicine*, 2(2), 143–150. <https://doi.org/10.5966/sctm.2012-0109>
- Pantziarka, P., Bouche, G., Meheus, L., Sukhatme, V., Sukhatme, V. P., & Vikas, P. (2014). The Repurposing Drugs in Oncology (ReDO) Project. *Ecancermedicalscience*, 8, 442. <https://doi.org/10.3332/ecancer.2014.442>
- Pantziarka, P., Verbaanderd, C., Huys, I., Bouche, G., & Meheus, L. (2020). Repurposing drugs in oncology: From candidate selection to clinical adoption. *Seminars in cancer biology*, S1044-579X(20)30011-0. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.semcan.2020.01.008>
- Patarroyo JH. & Vargas MI. (2013) Apoptosis and Activation-Induced Cell Death. Intech. *Apoptosis*. pp 73-94. ISBN: 978-953-51-1133-7. DOI: 10.5772/3191. Recuperado de <https://www.intechopen.com/books/apoptosis>
- Pavlu, J., Szydlo, R. M., Goldman, J. M., & Apperley, J. F. (2011). Three decades of transplantation for chronic myeloid leukemia: what have we learned?. *Blood*, 117(3), 755–763. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-08-301341>
- Pearson, P., Lewis, S. A., Britton, J., Young, I. S., & Fogarty, A. (2006). The pro-oxidant activity of high-dose vitamin E supplements in vivo. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy*, 20(5), 271–273. <https://doi.org/10.2165/00063030-200620050-00002>
- Postovit, L., Widmann, C., Huang, P., & Gibson, S. B. (2018). Harnessing Oxidative Stress as an Innovative Target for Cancer Therapy. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018, 6135739. <https://doi.org/10.1155/2018/6135739>
- Prasad, S., Gupta, S. C., Pandey, M. K., Tyagi, A. K., & Deb, L. (2016). Oxidative Stress and Cancer: Advances and Challenges. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016, 5010423. <https://doi.org/10.1155/2016/5010423>
- Qian, M., Kralova, J., Yu, W., Bose, H. R., Jr, Dvorak, M., Sanders, B. G., & Kline, K. (1997). c-Jun involvement in vitamin E succinate induced apoptosis of reticuloendotheliosis virus transformed avian lymphoid cells. *Oncogene*, 15(2), 223–230. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201181>
- Qureshi A.K., & Hall G.W. (2013) Leukaemias: a review. *Paediatrics and Child Health*, 23 (11), 461-466. <https://doi.org/10.1016/j.paed.2013.02.009>
- Raimondo, S., Saieva, L., Corrado, C., Fontana, S., Flugy, A., Rizzo, A., De Leo, G., & Alessandro, R. (2015). Chronic myeloid leukemia-derived exosomes promote tumor growth through an

- autocrine mechanism. *Cell communication and signaling: CCS*, 13, 8. <https://doi.org/10.1186/s12964-015-0086-x>
- Reaume, A. G. (2012). Drug repurposing through non hypothesis driven phenotypic screening. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*, 8(3–4), 85–88. <https://doi.org/10.1016/j.ddstr.2011.09.007>
- Ren, R. (2005). Mechanisms of BCR–ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nature Reviews Cancer*, 5(3), 172–183. <https://doi.org/10.1038/nrc1567>
- Rojas-Valencia, L., Velez-Pardo, C., & Jimenez-Del-Rio, M. (2017). Metal chelator TPEN selectively induces apoptosis in K562 cells through reactive oxygen species signaling mechanism: implications for chronic myeloid leukemia. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, 30(3), 405–421. <https://doi.org/10.1007/s10534-017-0015-0>
- Rowley J. D. (1998). The critical role of chromosome translocations in human leukemias. *Annual review of genetics*, 32, 495–519. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.32.1.495>
- Roy Chowdhury, S., & Banerji, V. (2018). Targeting Mitochondrial Bioenergetics as a Therapeutic Strategy for Chronic Lymphocytic Leukemia. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018, 2426712. <https://doi.org/10.1155/2018/2426712>
- Ruiz-Moreno, C., Jimenez-Del-Rio, M., Sierra-García, L., López-Osorio, B., & Vélez-Pardo, C. (2016). Vitamin E synthetic derivate-TPGS-selectively induces apoptosis in jurkat t cells via oxidative stress signaling pathways: implications for acute lymphoblastic leukemia. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death*, 21(9), 1019–1032. <https://doi.org/10.1007/s10495-016-1266-x>
- Ruiz-Moreno, C., Velez-Pardo, C., & Jimenez-Del-Rio, M. (2018). Vitamin E d- $\alpha$ -Tocopheryl Polyethylene Glycol Succinate (TPGS) Provokes Cell Death in Human Neuroblastoma SK-N-SH Cells via a Pro-Oxidant Signaling Mechanism. *Chemical research in toxicology*, 31(9), 945–953. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.8b00138>
- Saldívar-González, F., Prieto-Martínez F. D., & Medina-Franco, J. L. (2017) Descubrimiento y desarrollo de fármacos: un enfoque computacional. *Educación Química*, 28(1), 51-58. <https://doi.org/10.1016/j.eq.2016.06.002>
- Salimi, A., Roudkenar, M. H., Sadeghi, L., Mohseni, A., Seydi, E., Pirahmadi, N., & Pourahmad, J. (2015). Ellagic acid, a polyphenolic compound, selectively induces ROS-mediated apoptosis in cancerous B-lymphocytes of CLL patients by directly targeting mitochondria. *Redox biology*, 6, 461–471. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.08.021>
- Salimi, A., Roudkenar, M. H., Sadeghi, L., Mohseni, A., Seydi, E., Pirahmadi, N., & Pourahmad, J. (2016). Selective Anticancer Activity of Acacetin Against Chronic Lymphocytic Leukemia Using Both In Vivo and In Vitro Methods: Key Role of Oxidative Stress and Cancerous Mitochondria. *Nutrition and cancer*, 68(8), 1404–1416. <https://doi.org/10.1080/01635581.2016.1235717>
- Sallmyr, A., Fan, J., Datta, K., Kim, K. T., Grosu, D., Shapiro, P., Small, D., & Rassool, F. (2008). Internal tandem duplication of FLT3 (FLT3/ITD) induces increased ROS production, DNA damage, and misrepair: implications for poor prognosis in AML. *Blood*, 111(6), 3173–3182. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-05-092510>

- Sarosiek, K. A., Chi, X., Bachman, J. A., Sims, J. J., Montero, J., Patel, L., Flanagan, A., Andrews, D. W., Sorger, P., & Letai, A. (2013). BID preferentially activates BAK while BIM preferentially activates BAX, affecting chemotherapy response. *Molecular cell*, 51(6), 751–765. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.08.048>.
- Sattler, M., Verma, S., Shrikhande, G., Byrne, C. H., Pride, Y. B., Winkler, T., Greenfield, E. A., Salgia, R., & Griffin, J. D. (2000). The BCR/ABL tyrosine kinase induces production of reactive oxygen species in hematopoietic cells. *The Journal of biological chemistry*, 275(32), 24273–24278. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002094200>
- Schlatterer, S. D., Acker, C. M., & Davies, P. (2011). c-Abl in neurodegenerative disease. *Journal of molecular neuroscience* : MN, 45(3), 445–452. <https://doi.org/10.1007/s12031-011-9588-1>
- Schellekens, H., Hennink, W. E., & Brinks, V. (2013). The immunogenicity of polyethylene glycol: facts and fiction. *Pharmaceutical research*, 30(7), 1729–1734. <https://doi.org/10.1007/s11095-013-1067-7>
- SEER, N. C. institute. (2017). Cancer Stat Facts: Chronic Myeloid Leukemia (CML). <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/cmyle.html>
- Sertkaya A, Birkenbach A, Berlind A, Eyraud J. (2014). Examination of clinical trial costs and barriers for drug development. US Department of health and human services, office of the assistant secretary for planning and evaluation report. 1:1-92. <https://aspe.hhs.gov/report/examination-clinical-trial-costs-and-barriers-drug-development>
- Shallis, R. M., Ahmad, R., & Zeidan, A. M. (2018). The genetic and molecular pathogenesis of myelodysplastic syndromes. *European journal of haematology*, 101(3), 260–271. <https://doi.org/10.1111/ejh.13092>
- Shallis, R. M., Wang, R., Davidoff, A., Ma, X., Podoltsev, N. A., & Zeidan, A. M. (2020). Epidemiology of the classical myeloproliferative neoplasms: The four corners of an expansive and complex map. *Blood reviews*, 100706. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2020.100706>
- Shen, L., & Ji, H. F. (2012). Vitamin E: supplement versus diet in neurodegenerative diseases. *Trends in molecular medicine*, 18(8), 443–445. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.04.010>
- Shepherd, P. C., Ganesan, T. S., & Galton, D. A. (1987). Haematological classification of the chronic myeloid leukaemias. *Bailliere's clinical haematology*, 1(4), 887–906. [https://doi.org/10.1016/s0950-3536\(87\)80031-8](https://doi.org/10.1016/s0950-3536(87)80031-8)
- Shibata, N., Ohoka, N., Hattori, T., & Naito, M. (2019). Development of a Potent Protein Degradar against Oncogenic BCR-ABL Protein. *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 67(3), 165–172. <https://doi.org/10.1248/cpb.c18-00703>
- Shim, J. S., & Liu, J. O. (2014). Recent advances in drug repositioning for the discovery of new anticancer drugs. *International journal of biological sciences*, 10(7), 654–663. <https://doi.org/10.7150/ijbs.9224>
- Shinjo, T., Kuribara, R., Inukai, T., Hosoi, H., Kinoshita, T., Miyajima, A., Houghton, P. J., Look, A. T., Ozawa, K., & Inaba, T. (2001). Downregulation of Bim, a proapoptotic relative of Bcl-2, is a pivotal step in cytokine-initiated survival signaling in murine hematopoietic progenitors. *Molecular and cellular biology*, 21(3), 854–864. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.3.854-864.2001>

- Shoshan-Barmatz, V., Maldonado, E. N., & Krelin, Y. (2017). VDAC1 at the crossroads of cell metabolism, apoptosis and cell stress. *Cell stress*, 1(1), 11–36. <https://doi.org/10.15698/cst2017.10.104>
- Shvachko, L. P., Zavelevich, M. P., Gluzman, D. F., Kravchuk, I. V., & Telegeev, G. D. (2018). Vitamin E activates expression of C/EBP alpha transcription factor and G-CSF receptor in leukemic K562 cells. *Experimental oncology*, 40(4), 328–331. [https://doi.org/10.31768/2312-8852.2018.40\(4\):328-331](https://doi.org/10.31768/2312-8852.2018.40(4):328-331)
- Sies H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental physiology*, 82(2), 291–295. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1997.sp004024>
- Sies H. (2015). Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox biology*, 4, 180–183. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002>
- Sies H. (2017). Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox biology*, 11, 613–619. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.035>
- Soto-Mercado, V., Mendivil-Perez, M., Jimenez-Del-Rio, M., Fox, J. E., & Velez-Pardo, C. (2020). Cannabinoid CP55940 selectively induces apoptosis in Jurkat cells and in ex vivo T-cell acute lymphoblastic leukemia through H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signaling mechanism. *Leukemia research*, 95, 106389. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2020.106389>
- Soto-Mercado, V., Mendivil-Perez, M., Urueña-Pinzon, C., Fiorentino, S., Velez-Pardo, C., & Jimenez-Del-Rio, M. (2018). TPEN Exerts Antitumor Efficacy in Murine Mammary Adenocarcinoma Through an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Signaling Mechanism Dependent on Caspase-3. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, 18(11), 1617–1628. <https://doi.org/10.2174/1871520618666180426111520>
- Spivak J.L. (2017) Leucemia mieloide crónica (LMC). *Hematología y oncología - Manual MSD Versión para profesionales*. <https://www.msdmanuals.com/es/professional/hematolog%C3%ADa-y-oncolog%C3%ADa/leucemias/leucemia-mieloide-cr%C3%B3nica-lmc>
- Stapelberg, M., Gellert, N., Swettenham, E., Tomasetti, M., Witting, P. K., Procopio, A., & Neuzil, J. (2005). Alpha-tocopheryl succinate inhibits malignant mesothelioma by disrupting the fibroblast growth factor autocrine loop: mechanism and the role of oxidative stress. *The Journal of biological chemistry*, 280(27), 25369–25376. <https://doi.org/10.1074/jbc.M414498200>
- Strasser, A., Harris, A. W., Bath, M. L., & Cory, S. (1990). Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2. *Nature*, 348(6299), 331–333. <https://doi.org/10.1038/348331a0>
- Su, Z. Y., Shu, L., Khor, T. O., Lee, J. H., Fuentes, F., & Kong, A. N. (2013). A perspective on dietary phytochemicals and cancer chemoprevention: oxidative stress, nrf2, and epigenomics. *Topics in current chemistry*, 329, 133–162. [https://doi.org/10.1007/128\\_2012\\_340](https://doi.org/10.1007/128_2012_340)
- Su, Z., Chen, M., Xiao, Y., Sun, M., Zong, L., Asghar, S., Dong, M., Li, H., Ping, Q., & Zhang, C. (2014). ROS-triggered and regenerating anticancer nanosystem: an effective strategy to subdue tumor's multidrug resistance. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 196, 370–383. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.09.020>

- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues, Fourth edition. ISBN 978-92-832-4494-3 France: IARC; 2017
- Swettenham, E., Witting, P. K., Salvatore, B. A., & Neuzil, J. (2005). Alpha-tocopheryl succinate selectively induces apoptosis in neuroblastoma cells: potential therapy of malignancies of the nervous system?. *Journal of neurochemistry*, 94(5), 1448–1456. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03298.x>
- Takam Kamga, P., Dal Collo, G., Midolo, M., Adamo, A., Delfino, P., Mercuri, A., Cesaro, S., Mimiola, E., Bonifacio, M., Andreini, A., Chilosi, M., & Krampera, M. (2019). Inhibition of Notch Signaling Enhances Chemosensitivity in B-cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer research*, 79(3), 639–649. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-1617>
- Takasaki, T., Hagihara, K., Satoh, R., & Sugiura, R. (2018). More than Just an Immunosuppressant: The Emerging Role of FTY720 as a Novel Inducer of ROS and Apoptosis. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018, 4397159. <https://doi.org/10.1155/2018/4397159>
- Tang, D., Kang, R., Berghe, T. V., Vandenabeele, P., & Kroemer, G. (2019). The molecular machinery of regulated cell death. *Cell research*, 29(5), 347–364. <https://doi.org/10.1038/s41422-019-0164-5>
- Tanti, G. K., Pandey, S., & Goswami, S. K. (2015). SG2NA enhances cancer cell survival by stabilizing DJ-1 and thus activating Akt. *Biochemical and biophysical research communications*, 463(4), 524–531. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.05.069>
- Testa, U., Labbaye, C., Castelli, G., & Pelosi, E. (2016). Oxidative stress and hypoxia in normal and leukemic stem cells. *Experimental hematology*, 44(7), 540–560. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2016.04.012>
- Thannickal, V. J., & Fanburg, B. L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 279(6), L1005–L1028. <https://doi.org/10.1152/ajplung.2000.279.6.L1005>
- The Lancet (2018). GLOBOCAN 2018: counting the toll of cancer. *Lancet (London, England)*, 392(10152), 985. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32252-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32252-9)
- Tołoczko-Iwaniuk, N., Dziemiańczyk-Pakiela, D., Nowaszewska, B. K., Celińska-Janowicz, K., & Miltky, W. (2019). Celecoxib in Cancer Therapy and Prevention - Review. *Current drug targets*, 20(3), 302–315. <https://doi.org/10.2174/1389450119666180803121737>
- Tournier C. (2013). The 2 Faces of JNK Signaling in Cancer. *Genes & cancer*, 4(9-10), 397–400. <https://doi.org/10.1177/1947601913486349>
- Traber, M. G., Thellman, C. A., Rindler, M. J., & Kayden, H. J. (1988). Uptake of intact TPGS (d-alpha-tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate) a water-miscible form of vitamin E by human cells in vitro. *The American journal of clinical nutrition*, 48(3), 605–611. <https://doi.org/10.1093/ajcn/48.3.605>
- Tzifi, F., Economopoulou, C., Gourgiotis, D., Ardavanis, A., Papageorgiou, S., & Scorilas, A. (2012). The Role of BCL2 Family of Apoptosis Regulator Proteins in Acute and Chronic Leukemias. *Advances in hematology*, 2012, 524308. <https://doi.org/10.1155/2012/524308>
- Uchihara, Y., Tago, K., Taguchi, H., Narukawa, Y., Kiuchi, F., Tamura, H., & Funakoshi-Tago, M. (2018). Taxodione induces apoptosis in BCR-ABL-positive cells through ROS generation. *Biochemical pharmacology*, 154, 357–372. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.05.018>



- Ulbricht, J., Jordan, R., & Luxenhofer, R. (2014). On the biodegradability of polyethylene glycol, polypeptoids and poly(2-oxazoline)s. *Biomaterials*, 35(17), 4848–4861. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.02.029>
- Ulukaya, E., Acilan, C., & Yilmaz, Y. (2011). Apoptosis: why and how does it occur in biology?. *Cell biochemistry and function*, 29(6), 468–480. <https://doi.org/10.1002/cbf.1774>
- Valdez, B. C., Murray, D., Ramdas, L., de Lima, M., Jones, R., Kornblau, S., Betancourt, D., Li, Y., Champlin, R. E., & Andersson, B. S. (2008). Altered gene expression in busulfan-resistant human myeloid leukemia. *Leukemia research*, 32(11), 1684–1697. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2008.01.016>
- Valentin, R., Grabow, S., & Davids, M. S. (2018). The rise of apoptosis: targeting apoptosis in hematologic malignancies. *Blood*, 132(12), 1248–1264. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-02-791350>
- van Acker, S. A., Koymans, L. M., & Bast, A. (1993). Molecular pharmacology of vitamin E: structural aspects of antioxidant activity. *Free Radical Biology and Medicine*. 15(3): 311-328. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(93\)90078-9](https://doi.org/10.1016/0891-5849(93)90078-9).
- van Gorp, M., Festjens, N., van Loo, G., Saelens, X., & Vandenabeele, P. (2003). Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochemical and biophysical research communications*, 304(3), 487–497. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(03\)00621-1](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(03)00621-1)
- van Rhee, F., Szydlo, R. M., Hermans, J., Devergie, A., Frassoni, F., Arcese, W., de Witte, T., Kolb, H. J., Niederwiser, D., Jacobsen, N., Gahrton, G., Bandini, G., Carreras, E., Bacigalupo, A., Michallet, M., Ruutu, T., Reiffers, J., Goldman, J. M., Apperley, J., & Gratwohl, A. (1997). Long-term results after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia in chronic phase: a report from the Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone marrow transplantation*, 20(7), 553–560. <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1700933>
- Vavougiou, G., Zarogiannis, S. G., & Doskas, T. (2018). The putative interplay between DJ-1/NRF2 and Dimethyl Fumarate: A potentially important pharmacological target. *Multiple sclerosis and related disorders*, 21, 88–91. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2018.02.027>
- Vener, C., Banzi, R., Ambroggi, F., Ferrero, A., Saglio, G., Pravettoni, G., & Sant, M. (2020). First-line imatinib vs second- and third-generation TKIs for chronic-phase CML: a systematic review and meta-analysis. *Blood advances*, 4(12), 2723–2735. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019001329>
- Veronese, F. M., & Pasut, G. (2005). PEGylation, successful approach to drug delivery. *Drug discovery today*, 10(21), 1451–1458. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(05\)03575-0](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(05)03575-0)
- Wajant H. (2002). The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science (New York, N.Y.)*, 296(5573), 1635–1636. <https://doi.org/10.1126/science.1071553>
- Wallington-Beddoe, C. T., Hewson, J., Bradstock, K. F., & Bendall, L. J. (2011). FTY720 produces caspase-independent cell death of acute lymphoblastic leukemia cells. *Autophagy*, 7(7), 707–715. <https://doi.org/10.4161/auto.7.7.15154>
- Wang J. Y. (2014). The capable ABL: what is its biological function? *Molecular and cellular biology*, 34(7), 1188–1197. <https://doi.org/10.1128/MCB.01454-13>

- Wang, C., & Youle, R. J. (2012). Predominant requirement of Bax for apoptosis in HCT116 cells is determined by Mcl-1's inhibitory effect on Bak. *Oncogene*, 31(26): 3177–3189. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.497>
- Wang, J., Xu, Y., Wan, H., & Hu, J. (2018). Antibiotic ivermectin selectively induces apoptosis in chronic myeloid leukemia through inducing mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Biochemical and biophysical research communications*, 497(1), 241–247. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.02.063>
- Wang, W., Niu, S., Qiao, L., Wei, F., Yin, J., Wang, S., Ouyang, Y., & Chen, D. (2019). Usnea Acid as Multidrug Resistance (MDR) Reversing Agent against Human Chronic Myelogenous Leukemia K562/ADR Cells via an ROS Dependent Apoptosis. *BioMed research international*, 2019, 8727935. <https://doi.org/10.1155/2019/8727935>
- Wang, X. F., Witting, P. K., Salvatore, B. A., & Neuzil, J. (2005). Vitamin E analogs trigger apoptosis in HER2/erbB2-overexpressing breast cancer cells by signaling via the mitochondrial pathway. *Biochemical and biophysical research communications*, 326(2), 282–289. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.11.028>
- Wang, X., & Quinn, P. J. (1999). Vitamin E and its function in membranes. *Progress in lipid research*, 38(4), 309–336. [https://doi.org/10.1016/s0163-7827\(99\)00008-9](https://doi.org/10.1016/s0163-7827(99)00008-9)
- Wang, X., & Quinn, P. J. (2000). The location and function of vitamin E in membranes (review). *Molecular membrane biology*, 17(3), 143–156. <https://doi.org/10.1080/09687680010000311>
- Wang, Y., Wei, S., Wang, J., Fang, Q., & Chai, Q. (2014). Phenethyl isothiocyanate inhibits growth of human chronic myeloid leukemia K562 cells via reactive oxygen species generation and caspases. *Molecular medicine reports*, 10(1), 543–549. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2167>
- Weber, T., Dalen, H., Andera, L., Nègre-Salvayre, A., Augé, N., Sticha, M., Lloret, A., Terman, A., Witting, P. K., Higuchi, M., Plasilova, M., Zivny, J., Gellert, N., Weber, C., & Neuzil, J. (2003). Mitochondria play a central role in apoptosis induced by alpha-tocopheryl succinate, an agent with antineoplastic activity: comparison with receptor-mediated pro-apoptotic signaling. *Biochemistry*, 42(14), 4277–4291. <https://doi.org/10.1021/bi020527j>
- Weber, T., Lu, M., Andera, L., Lahm, H., Gellert, N., Fariss, M. W., Korinek, V., Sattler, W., Ucker, D. S., Terman, A., Schröder, A., Erl, W., Brunk, U. T., Coffey, R. J., Weber, C., & Neuzil, J. (2002). Vitamin E succinate is a potent novel antineoplastic agent with high selectivity and cooperativity with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (Apo2 ligand) in vivo. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 8(3), 863–869.
- Wenande, E., & Garvey, L. H. (2016). Immediate-type hypersensitivity to polyethylene glycols: a review. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 46(7), 907–922. <https://doi.org/10.1111/cea.12760>
- Westphal, D., Kluck, R. M., & Dewson, G. (2014). Building blocks of the apoptotic pore: how Bax and Bak are activated and oligomerize during apoptosis. *Cell death and differentiation*, 21(2), 196–205. <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.139>
- Wilson M. A. (2011). The role of cysteine oxidation in DJ-1 function and dysfunction. *Antioxidants & redox signaling*, 15(1), 111–122. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3481>

- Wong R. S. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of experimental & clinical cancer research* : CR, 30(1), 87. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-30-87>
- Wu S.H., & Hopkins W.K. (1999) Characteristics of d- $\alpha$ -tocopheryl PEG 1000 succinate for applications as an absorption enhancer in drug delivery systems. *Pharm. Tech.* 23:52–68.
- Wu, Q., Wu, W., Fu, B., Shi, L., Wang, X., & Kuca, K. (2019). JNK signaling in cancer cell survival. *Medicinal research reviews*, 39(6), 2082–2104. <https://doi.org/10.1002/med.21574>
- Würth, R., Thellung, S., Bajetto, A., Mazzanti, M., Florio, T., & Barbieri, F. (2016). Drug-repositioning opportunities for cancer therapy: novel molecular targets for known compounds. *Drug discovery today*, 21(1), 190–199. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.09.017>
- Xie, H., & Simon, M. C. (2017). Oxygen availability and metabolic reprogramming in cancer. *The Journal of biological chemistry*, 292(41), 16825–16832. <https://doi.org/10.1074/jbc.R117.799973>
- Xue, H., Li, J., Xie, H., & Wang, Y. (2018) Review of Drug Repositioning Approaches and Resources. *International Journal of Biological Sciences*. 14(10): 1232-1244. <https://doi.org/10.7150/ijbs.24612>.
- Yaghmaie, M., & Yeung, C. C. (2019). Molecular Mechanisms of Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitors. *Current hematologic malignancy reports*, 14(5), 395–404. <https://doi.org/10.1007/s11899-019-00543-7>
- Yan, A., Von Dem Bussche, A., Kane, A. B., & Hurt, R. H. (2007). Tocopheryl Polyethylene Glycol Succinate as a Safe, Antioxidant Surfactant for Processing Carbon Nanotubes and Fullerenes. *Carbon*, 45(13), 2463–2470. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2007.08.035>
- Yang, C., Wu, T., Qi, Y., & Zhang, Z. (2018). Recent Advances in the Application of Vitamin E TPGS for Drug Delivery. *Theranostics*, 8(2), 464–485. <https://doi.org/10.7150/thno.22711>
- Yang, K., & Fu, L. W. (2015). Mechanisms of resistance to BCR-ABL TKIs and the therapeutic strategies: A review. *Critical reviews in oncology/hematology*, 93(3), 277–292. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2014.11.001>
- Yang, Y., Karakhanova, S., Hartwig, W., D'Haese, J. G., Philippov, P. P., Werner, J., & Bazhin, A. V. (2016). Mitochondria and Mitochondrial ROS in Cancer: Novel Targets for Anticancer Therapy. *Journal of cellular physiology*, 231(12), 2570–2581. <https://doi.org/10.1002/jcp.25349>
- Yang, Y., Wang, G., Wu, W., Yao, S., Han, X., He, D., He, J., Zheng, G., Zhao, Y., Cai, Z., & Yu, R. (2018). Camalexin Induces Apoptosis via the ROS-ER Stress-Mitochondrial Apoptosis Pathway in AML Cells. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018, 7426950. <https://doi.org/10.1155/2018/7426950>
- Yeu, Y., Yoon, Y., & Park, S. (2015). Protein localization vector propagation: a method for improving the accuracy of drug repositioning. *Molecular bioSystems*. 11(7): 2096-2102. <https://doi.org/10.1039/c5mb00306g>.
- Youk, H. J., Lee, E., Choi, M. K., Lee, Y. J., Chung, J. H., Kim, S. H., Lee, C. H., & Lim, S. J. (2005). Enhanced anticancer efficacy of alpha-tocopheryl succinate by conjugation with polyethylene glycol. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 107(1), 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.05.014>

- Yu, C. H., Suriguga, Li, Y., Li, Y. R., Tang, K. Y., Jiang, L., & Yi, Z. C. (2014). The role of ROS in hydroquinone-induced inhibition of K562 cell erythroid differentiation. *Biomedical and environmental sciences : BES*, 27(3), 212–214. <https://doi.org/10.3967/bes2014.043>
- Yu, J., & Zhang, L. (2008). PUMA, a potent killer with or without p53. *Oncogene*, 27 Suppl 1(Suppl 1), S71–S83. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.45>
- Zeng, H. Z., Qu, Y. Q., Zhang, W. J., Xiu, B., Deng, A. M., & Liang, A. B. (2011). Proteomic analysis identified DJ-1 as a cisplatin resistant marker in non-small cell lung cancer. *International journal of molecular sciences*, 12(6), 3489–3499. <https://doi.org/10.3390/ijms12063489>
- Zhang, B., Ho, Y. W., Huang, Q., Maeda, T., Lin, A., Lee, S. U., Hair, A., Holyoake, T. L., Huettner, C., & Bhatia, R. (2012). Altered microenvironmental regulation of leukemic and normal stem cells in chronic myelogenous leukemia. *Cancer cell*, 21(4), 577–592. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.02.018>
- Zhang, H., Trachootham, D., Lu, W., Carew, J., Giles, F. J., Keating, M. J., Arlinghaus, R. B., & Huang, P. (2008). Effective killing of Gleevec-resistant CML cells with T315I mutation by a natural compound PEITC through redox-mediated mechanism. *Leukemia*, 22(6), 1191–1199. <https://doi.org/10.1038/leu.2008.74>
- Zhang, H., Tan, S., Wang, J., Chen, S., Quan, J., Xian, J., Zhang, S. s., He, J., & Zhang, L. (2014). Musashi2 modulates K562 leukemic cell proliferation and apoptosis involving the MAPK pathway. *Experimental cell research*, 320(1), 119–127. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.09.009>
- Zhao, W. H., Huang, B. T., Zhang, J. Y., & Zeng, Q. C. (2017). Distinct EphB4-mediated mechanisms of apoptotic and resistance to dasatinib in human chronic myeloid leukemia and K562 cell lines. *Leukemia research*, 63, 28–33. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2017.10.014>
- Zhao, Y., Zhao, X., Yang, B., Neuzil, J., & Wu, K. (2007). alpha-Tocopheryl succinate-induced apoptosis in human gastric cancer cells is modulated by ERK1/2 and c-Jun N-terminal kinase in a biphasic manner. *Cancer letters*, 247(2), 345–352. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2006.05.015>
- Zhou, J. D., Zhang, T. J., Xu, Z. J., Gu, Y., Ma, J. C., Li, X. X., Guo, H., Wen, X. M., Zhang, W., Yang, L., Liu, X. H., Lin, J., & Qian, J. (2019). BCL2 overexpression: clinical implication and biological insights in acute myeloid leukemia. *Diagnostic pathology*, 14(1), 68. <https://doi.org/10.1186/s13000-019-0841-1>
- Zhou, T., Medeiros, L. J., & Hu, S. (2018). Chronic Myeloid Leukemia: Beyond BCR-ABL1. *Current hematologic malignancy reports*, 13(6), 435–445. <https://doi.org/10.1007/s11899-018-0474-6>
- Zhou, Z. H., Wu, Y. F., Wang, X. M., & Han, Y. Z. (2017). The c-Abl inhibitor in Parkinson disease. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*, 38(4), 547–552. <https://doi.org/10.1007/s10072-016-2808-2>
- Zhou, Y., Hileman, E. O., Plunkett, W., Keating, M. J., & Huang, P. (2003). Free radical stress in chronic lymphocytic leukemia cells and its role in cellular sensitivity to ROS-generating anticancer agents. *Blood*, 101(10), 4098–4104. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-08-2512>

- Zielonka, J., Joseph, J., Sikora, A., Hardy, M., Ouari, O., Vasquez-Vivar, J., Cheng, G., Lopez, M., & Kalyanaraman, B. (2017). Mitochondria-Targeted Triphenylphosphonium-Based Compounds: Syntheses, Mechanisms of Action, and Therapeutic and Diagnostic Applications. *Chemical reviews*, 117(15), 10043–10120. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00042>
- Zingg J. M. (2007). Molecular and cellular activities of vitamin E analogues. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 7(5), 543–558. <https://doi.org/10.2174/138955707780619608>
- Zingg, J. M., & Azzi, A. (2004). Non-antioxidant activities of vitamin E. *Current medicinal chemistry*, 11(9), 1113–1133. <https://doi.org/10.2174/0929867043365332>
- Zorova, L. D., Popkov, V. A., Plotnikov, E. Y., Silachev, D. N., Pevzner, I. B., Jankauskas, S. S., Babenko, V. A., Zorov, S. D., Balakireva, A. V., Juhaszova, M., Sollott, S. J., & Zorov, D. B. (2018). Mitochondrial membrane potential. *Analytical biochemistry*, 552, 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.07.009>