



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

Programa de Doctorado en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina

El Receptor de Prolactina como nueva diana terapéutica en la Leucemia Mieloide Aguda

**Memoria presentada por Laia Cuesta Casanovas para optar al título de doctor
por la Universidad Autónoma de Barcelona**

Ruth Muñoz Risueño
la directora

Laia Cuesta Casanovas
la doctoranda

Anna Maria Bassols Teixidó
la tutora

Laia Cuesta Casanovas

Barcelona, 2022

Este estudio ha sido financiado por la Fundación Alemana contra la Leucemia José Carreras (Deutsche José Carreras Leukämie-Stiftung, DJCLS) y se ha llevado a cabo en el Instituto de Investigación contra la Leucemia Josep Carreras.

Agradecimientos

“Cuando una persona quiere alcanzar algo piensa de manera espontánea en tres cosas: ¿qué he conseguido hasta el momento? ¿En qué posición me encuentro ahora? ¿Qué debo hacer de aquí en adelante? Si uno no puede contestar esas tres cosas, sólo le queda el miedo, la falta de confianza en sí mismo y el cansancio.”

El fin del mundo y un despiadado país de las maravillas – Haruki Murakami

Finalmente, con doble mudanza y pandemia incluida, aquí está La Tesis. Ha costado mucho, horas de organización y de experimentos, de aclarar resultados inesperados y de encontrar el punto positivo en todo momento. Y si algo saco en claro de este proyecto es que yo sola habría sido completamente incapaz, tan siquiera, de empezarlo. Así que mi más sincera gratitud a aquellos que han estado ahí en todo momento y, aunque sé que todo lo que pueda decir se quedará corto, al menos tengo el derecho de intentarlo.

Sin lugar a dudas, mi mayor agradecimiento va dirigido a **Ruth**, no sólo por guiarme en todo momento y por confiar en mí más que nadie, sino por darme la oportunidad de formar parte de este proyecto, por estar al pie del cañón y pelearlo conmigo, por ver siempre la parte positiva y por convencerme de ella.

También agradecer a todos los estudiantes que han pasado por el laboratorio a lo largo de estos años, a **Noa, Lydia, Laia Guti, Gemma y Cristina**, por la paciencia y las ganas de aprender; a **Júlia y Anna Navarro** por el entusiasmo y las ganas de dejar huella en el laboratorio; y a **Ana Núñez**, por haber compartido escasas horas, pero con más ganas que nadie. Y como olvidarme de **Xisca**, una parte de la gratitud va hacia ti, no sólo por pensar siempre en nosotros, sino por la alegría que desprendes y que trajiste al laboratorio. También un agradecimiento especial a todos esos pacientes que, en su peor momento, piensan en la ciencia y, sin saberlo, son la ayuda más grande que se puede tener.

A los **Buschbecks**, por empezar compartiendo planta y acabar compartiendo pared de laboratorio, hicisteis la llegada al IJC post-mudanza mucho más amena.

Agradecer a la **Universidad Autónoma de Barcelona** y al **programa de Doctorado en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina** la gestión durante todos estos años, sobre todo los últimos meses, con las dificultades que están suponiendo los problemas informáticos. En especial a **Anna Maria Bassols**, como tutora de esta tesis y por la ayuda brindada en los últimos momentos de caos.

A todas esas personas que han estado conmigo acompañándome estos años. A mis amigos de toda la vida, **Ana, Laura y Adri**, aunque no nos vemos todo lo que nos gustaría por la distancia impuesta y los horarios, gracias por los ánimos, por las cervezas que acompañan esos momentos de olvidarse de todo y por la paciencia que tenéis. A mis niñas, **Candi, Susana y Alba**, que el tiempo y la distancia no nos haga olvidar los veranos Monfortinos, las partidas de vóley y las noches de fiesta. Y como no, a **Judith**, porque fuiste la primera que se interesó por mi vena científica años ha, porque te confesé cual amor secreto que quería estudiar Biología y me hiciste prometer que te explicaría cómo funciona la genética. ¡Si me hubiese dado un poco de prisa, **Manuela** hubiese nacido con esta Tesis debajo del brazo! A los biólogos que compartieron conmigo los años de universidad, en especial a l'**Andrea** pels cafès entre classes (o en lloc de les classes), per les cerveses infinites que fèiem acompanyats d'unes patates braves horribles, les hores compartides en el cotxe, pel teu paper crucial com a Celestina i perquè m'ha quedat clar que la distancia no és un problema i que tot el que s'ha viscut no s'oblida. Barcelona et troba a faltar! A l'**Uri** i la **Sofia**, gràcies per la vostra preocupació constant, els ànims i les ganes que tot surti bé.

Uno de los agradecimientos más especiales es para el Risueño Lab, porque habéis estado a mi lado desde el principio, espalda con espalda durante toda esta tesis, y por la acogida recibida cuando llegué al laboratorio. Al **Pepe Cornet**, el finalizador, per la paciència, els mil cops que m'has arribat a explicar les coses, sobretot citometria, encara que no sé si les hores destinades a aprendre a fer servir l'InkScape les superen. Al **Pepe Carbó** per les baralles amb l'IVIS a l'animalari, l'*espertice* culinari, la confiança i les ganes de treure alguna cosa en clar d'aquest projecte. To **Lise** for the experience and wisdom, for the serenity you transmit and for bringing a bit of French Glamour to the lab. A **Jennifer**, gracias por estar siempre dispuesta a todo, te quedas con el relevo, pero estoy segura que no tendrás ningún problema. I, per últim, a l'**Antònia**,

gràcies per l'ajuda que em vas proporcionar des de la meva arribada, per la vida que donaves al laboratori i per tots aquells mots que vas deixar al diccionari del Risueño Lab, es troba molt a faltar el teu somriure ressonant per tot el *coffee corner*.

Mi más sincero agradecimiento va para mi familia, a la **iaia Isabel** y el **avi Tano**, porque, aunque me sigas preguntando por el colegio, sé que el interés siempre será sincero. Y a la **iaia**, por los cuentos de animales que me contabas de pequeña mientras te dormías, porque seguro que tienen algo que ver con mi interés por la biología. Me has enseñado que el amor y el cariño son imposibles de olvidar. Y a mis padres, al **papa** y la **mama**, porque vosotros sí que habéis estado desde el primer día, porque el placer por la lectura viene de vosotros y sin la lectura, escribir todas estas palabras habría sido imposible. Gracias por la confianza ciega, la ayuda constante y el énfasis con que me animáis en cada pequeño paso que doy.

Y, por último, a ti **Marc**. No tengo palabras para agradecer lo mucho que me has llegado a ayudar a lo largo de estos años. Gracias por la paciencia, sobre todo, pero también por empeñarte en que fuese libre, que dejase de pensarme tanto las cosas. Me empujaste a empezar este proyecto y lo que hemos conseguido desde entonces es una vida entera, un hogar y una familia. Una parte de esta Tesis te pertenece, sin ti, tampoco hubiese sido posible. Te quiero.

Resumen

La prolactina (PRL) y el receptor de prolactina (PRLR) están ampliamente estudiados como posible diana terapéutica en distintos procesos tumorales debido a su papel en la proliferación y la diferenciación celular. Por este motivo, este proyecto se ha centrado en desvelar por primera vez el papel del receptor y su ligando en las neoplasias hematológicas, concretamente en la leucemia mieloide aguda (LMA), una enfermedad con mal pronóstico y caracterizada por recaídas producidas por procesos de quimiorresistencia, dejando en evidencia la necesidad de hallar nuevas estrategias terapéuticas que erradiquen la enfermedad y eviten las recidivas. En este trabajo se demuestra la importancia de la señalización mediada por el PRLR debido a la activación por su ligando natural en la LMA. En lo que respecta al ligando, se ha observado que, aunque la PRL no tiene un papel relevante en el inicio de la LMA, sí que participa en el mantenimiento de ésta mediante un incremento de la proliferación y de la capacidad de autorrenovación de las células. Por otro lado, el estudio de la funcionalidad del PRLR ha revelado una implicación tanto en el inicio como en el mantenimiento de la LMA, permitiendo una mayor migración celular hacia otros tejidos y proporcionando resistencia a agentes quimioterapéuticos debido a diferentes mecanismos de quimiorresistencia (MOC), donde destaca la entrada en senescencia para evitar que los daños en el ADN producidos por los fármacos eliminen las células neoplásicas, fomentado por la activación de Stat3 y Stat5 mediada por el receptor. Además, su expresión incrementada en superficie podría ser utilizada como biomarcador de fácil detección para el diagnóstico y seguimiento de la LMA. La inhibición de la vía de señalización de PRL-PRLR, sobre todo la inhibición centrada en el receptor *per se*, permite una disminución en la capacidad proliferativa, de autorrenovación y de migración, así como un incremento en la sensibilidad a quimioterapia relacionada con una salida del estado senescente de las células. Estos datos ponen en evidencia por primera vez que la supresión de la señalización mediada por PRLR dificulta el progreso de la LMA e incrementa la sensibilidad a fármacos, revirtiendo los mecanismos de quimiorresistencia, sugiriendo que el desarrollo preclínico de inhibidores dirigidos al receptor podría considerarse una estrategia terapéutica muy prometedora con especificidad de células transformadas.

Abstract

Prolactin (PRL) and prolactin receptor (PRLR) are widely studied as potential new therapeutic targets in several cancer types due to their role in proliferation and differentiation. For this reason, this project has focused on disclosing for the first time the role of this receptor and its ligand in haematological malignancies, particularly in acute myeloid leukaemia (AML). AML is characterized by a poor outcome, bad prognosis, and frequent relapse due to chemotherapy resistance, highlighting the urgent need for new therapeutic strategies which completely eradicate the disease. In this project we demonstrate the importance of the PRLR signalling due to the natural ligand activation in AML. Regarding the ligand, even though PRL does not have any role in AML initiation, it participates in the maintenance of the disease increasing proliferation and self-renewal capacity of the cells. On the other hand, PRLR functionality studies reveal an implication not only in the initiation, but also in the maintenance of AML, allowing a greater cellular migration to other tissues and providing chemotherapy resistance due to different mechanisms of chemoresistance (MOC). Among them the induction of senescence to prevent cell death due to DNA damage produced by drugs, enhanced by PRLR-mediated Stat3 and Stat5 activation, stands out. Moreover, increased surface PRLR expression could be used as an easy diagnostic and follow-up biomarker for AML. The inhibition of PRL-PRLR signalling pathway, especially the inhibition of the receptor, decreases not only the proliferative, self-renewal and migration capacity of leukemic cells, but also increases the sensitivity to chemotherapy related with an exit of the senescent state of the cells. Those results suggest for the first time that PRLR signalling suppression attenuates AML progression and increases the sensitivity to drugs, reverting the mechanisms of chemotherapy, suggesting that the preclinical development of inhibitors targeting the receptor could be used as a potential malignant cell-specific therapeutic strategy.

Abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico

AMPc: adenosín monofosfato cíclico

ANOVA: análisis de la varianza

AraC: citarabina

AraCDP: citarabina difosfato

AraCMP: citarabina monofosfato

AraC R: resistente a citarabina

AraCTP: citarabina trifosfato

Arg: arginina

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ATM: del inglés *Ataxia Telangiectasia Mutated*

ATR: del inglés *ATM and Rad3-related*

ATRA: del inglés *all-trans retinoic acid* (ácido holotransretinoico)

BME: 2-mercaptoetanol

BSA: albúmina de suero bovino

BSP: blastos en sangre periférica

BMO: blastos en médula ósea

C/EBP β : del inglés *CCAAT/enhancer-binding protein beta*

cADN: ADN complementario

CCHMC: Cincinnati Children's Hospital Medical Center

CDA: citidina deaminasa

CEEA: comité de ética de experimentación animal

CFU: unidad formadora de colonias

CISH: el inglés *cytokine inducible SH2-containing protein*

COL: del inglés *cell of origin* (célula de origen)

CRE: del inglés *cAMP response element* (elemento respuesta a AMPc)

CRISPR: del inglés *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (repeticiones palindrómicas cortas, agrupadas y regularmente interespaciadas)

Ct: umbral de ciclo

CXCL12: quimiocina 12 con motivo C-X-C

CXCR4: receptor de quimiocinas C-X-C tipo 4

dCK: deoxicitidina quinasa

dCMPK: deoxicitidina monofosfato quinasa

DDR: del inglés *DNA damage response* (respuesta al daño en el ADN)

DiI: 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine

DMSO: dimetilsulfóxido

DUPD1: proteína fosfatasa dual específica 1

EC50: concentración media máxima eficaz

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EGF: factor de crecimiento epidérmico

ELISA: ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas

ELN: *European Leukemia Network*

ER α : receptor de estrógenos alfa

F: femenino

FAB: francesa-americana-británica

FLT3: tirosina cinasa parecida a fms-3

FLT3L: ligando de FLT3

FBS: del inglés *fetal bovine serum* (suero fetal bovino)

FSC: dispersión frontal de la luz

GALT: galactosa-1-fosfato uridiltransferasa

GAS: elementos sensibles a interferón γ

GEO: del inglés *gene expression omnibus*

GFP: del inglés *green fluorescence protein* (proteína verde fluorescente)

GH: del inglés *growth hormone* (hormona del crecimiento)

Gly: glicina

hENT: transportador de equilibrio de nucleósidos

HSC: del inglés *hematopoietic stem cell* (célula madre hematopoyética)

hPRLR: del inglés *human prolactin receptor* (receptor de prolactina humano)

IDIBAPS: Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer

IGTP: Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol

IJC: Institut de Recerca contra la Leucèmia Josep Carreras

IL-3: interleuquina 3

IMIM: Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques

IPSS-R: del inglés *revised international prognostic scoring system*

Jak: Janus Quinasa

LCM: leucemia de células del manto

LCP: leucemia de células plasmáticas

Lin-: linaje negativo

LLA-B: leucemia linfoblástica aguda B

LLA-T: leucemia linfoblástica aguda T

LMA: leucemia mieloide aguda

LMC: leucemia mieloide crónica

LPA: leucemia promielocítica aguda

LSC: del inglés *leukemic stem cell* (célula madre leucémica)

M: masculino

MAPK: proteína quinasa mitogénica activadora

MDR: del inglés *multidrug resistance phenotype* (fenotipo de resistencia a multidrogas)

MFI: intensidad media de fluorescencia

MILE: *Microarray Innovations in Leukemia*

MLL: del inglés *mixed-leukemia lineage 1* (leucemia mixta de linaje 1)

MM: mieloma múltiple

MM: MonoMac-1

MNC: célula mononucleada

MO: médula ósea

MOC: del inglés *mechanisms of chemoresistance* (mecanismos de quimiorresistencia)

mPRL: del inglés *mouse prolactin* (prolactina de ratón)

MRP4: del inglés *multidrug resistance protein 4* (proteína de resistencia a multidrogas 4)

NaCl: suero fisiológico

N/D: sin datos

NDK: quinasa nucleósida difosfato

NFκβ: factor nuclear kappa beta

NIH: del inglés *National Institute of Health* (Instituto Nacional de la Salud)

NPM1: nucleofosmina 1

ns: no significativo

NT: no transducido

NT5E: 5'-nucleotidasa

OIS: del inglés *oncogenic-induced senescence* (senescencia inducida oncogénicamente)

OMS: organización mundial de la salud

PAF: factor activador de plaquetas

PBS: tampón fosfato salino

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PI3K: fosfoinositol 3-quinasa

PIAS: proteínas inhibidoras de Stats activos

PIP2: fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato

PIP3: fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato

PN-I: pirimidina nucleosidasa I

PRL: prolactina

PRLR: receptor de prolactina

PTEN: fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato 3-fosfatasa

QR: quimiorresistencia

R/R: recaída y refractariedad

RMA: del inglés *Robust Multichip Average*

ROS: especies reactivas del oxígeno

RT-PCR: PCR semicuantitativa en tiempo real

RXR α : receptor de ácido transretinoico

SA- β -gal: beta galactosidasa

SAHF: del inglés *senescence-associated heterochromatin foci* (condensaciones de heterocromatina asociadas a la senescencia)

SASP: del inglés *senescence-associated secretory phenotype* (fenotipo secretor asociado a la senescencia)

SCF: factor de células madre

SEM: error estándar de la media

sgRNA: del inglés *single-stranded guided RNA* (ARN monocatenario guía)

shRNA: del inglés *short hairpin RNA*

SMD: síndromes mielodisplásicos

SMI: del inglés *small molecule inhibitor* (molécula pequeña inhibitoria)

SOCS: proteínas supresoras de la señalización de citoquinas

SP: sangre periférica

SRE: del inglés *serum response element* (elemento respuesta a suero)

SSC: dispersión lateral de la luz

TGF β : factor de crecimiento transformante beta

TPO: trombopoyetina

TRH: hormona liberadora de tirotropina

UB: Universidad de Barcelona

VDR: receptor de vitamina D3

VIP: péptido inhibidor vasoactivo

Índice

1. INTRODUCCIÓN	31
1.1. Neoplasias hematológicas	33
1.1.1. Leucemia mieloide aguda.....	33
1.1.2. Síndromes mielodisplásicos.....	35
1.1.3. Células madre leucémicas	35
1.1.3.1. Identificación de las células madre leucémicas	35
1.1.3.2. Célula de origen	37
1.1.3.3. Heterogeneidad tumoral	37
1.1.4. Entorno tisular	40
1.1.5. Tratamientos	40
1.1.5.1. Nuevas estrategias terapéuticas.....	42
a) Cribado de alto rendimiento.....	42
b) Combinación de fármacos.....	43
c) Microambiente como diana terapéutica.....	43
d) Cáncer como una enfermedad crónica	43
e) Diferenciación para eliminar las LSC	44
f) Inhibidores de vías de señalización	44
1.1.6. Quimiorresistencia.....	44
1.1.6.1. Activación de la citarabina.....	46
1.2. Prolactina	48
1.2.1. Síntesis y secreción	48
1.2.2. Funciones.....	49
1.2.3. Formas y modificaciones.....	49
1.3. Receptor de Prolactina.....	51
1.3.1. Situación en el genoma y estímulo de la expresión.....	51
1.3.2. Estructura	52
1.3.3. Activación.....	52
1.3.4. Distribución y regulación.....	53
1.3.5. Isoformas	54
1.3.5.1. Isoforma larga	55
Estructura	55
Señalización	55
1.3.5.2. Isoforma intermedia.....	62
Estructura	62
Funciones	62
1.3.5.3. Isoforma corta.....	63

Estructura	63
Funciones	63
1.3.5.4. Isoforma soluble	64
Estructura	64
Funciones	64
1.3.5.5. Isoforma $\Delta S1$ y $\Delta S2$	65
Estructura	65
1.4. La señalización del PRLR en cáncer	66
1.4.1. PRL y cáncer	66
1.4.1.1. Inhibidores de PRL	66
1.4.2. PRLR y cáncer.....	66
1.4.2.1. Antagonistas del PRLR.....	67
1.4.2.2. Anticuerpos neutralizantes del PRLR.....	68
1.4.2.3. Pequeñas moléculas inhibitoras	68
1.5. Senescencia	70
1.5.1. Mecanismos de entrada en senescencia	71
1.5.1.1. Acortamiento de telómeros.....	73
1.5.1.2. Respuesta al daño en el ADN	73
1.5.1.3. Activación de oncogenes	73
1.5.2. Mecanismos de mantenimiento en senescencia	74
2. OBJETIVOS.....	77
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	81
3.1. Materiales.....	83
3.1.1. Líneas y cultivos celulares.....	83
3.1.2. Muestras primarias.....	84
3.1.3. Compuestos.....	85
3.1.4. Anticuerpos acoplados a fluoróforo	86
3.1.5. Anticuerpos primarios.....	86
3.1.6. Cebadores utilizados para la RT-PCR semi-cuantitativa.....	87
3.2. Métodos	89
3.2.1. Generalidades y estadística	89
3.2.2. Contaje celular y viabilidad.....	89
3.2.3. Análisis de la expresión de proteínas en superficie	90
3.2.3.1. Análisis de la expresión de PRLR en superficie	90
3.2.3.2. Análisis de la diferenciación mieloide	90
3.2.3.3. Análisis de marcadores de migración celular	90

3.2.4. Análisis de la expresión de genes por PCR semi-cuantitativa en tiempo real	91
3.2.5. Clonaje y transducción.....	91
3.2.5.1. Clonaje en el plásmido intermediario pUC19.....	91
3.2.5.2. Mutagénesis dirigida.....	92
3.2.5.3. Clonaje en el vector intermediario pEF1.....	92
3.2.5.4. Clonaje en el vector lentiviral pULTRA.....	93
3.2.5.5. Clonaje de shRNAs en el plásmido pLKO.1.....	93
3.2.5.6. Clonaje de sgRNAs en el plásmido pLentiGuide-Puro.....	94
3.2.5.7. Transducción de vectores lentivirales en células leucémicas	95
3.2.5.8. Análisis de la señalización con vectores reporteros	96
3.2.6. Estudios de supervivencia y proliferación.....	96
3.2.6.1. Citotoxicidad	96
3.2.6.2. Cálculo de las concentraciones efectivas medias (EC50).....	97
3.2.6.3. Ensayo de proliferación con DiI	97
3.2.6.4. Análisis del ciclo celular	97
3.2.6.5. Análisis de las reversiones de la citotoxicidad.....	98
3.2.7. Ensayo de clonogenicidad.....	98
3.2.8. Estudios <i>in vivo</i>	98
3.2.8.1. Ensayo de competición de xenotrasplante con líneas celulares	99
3.2.8.2. Xenotrasplante con líneas celulares.....	99
3.2.9. Western Blot.....	100
3.2.10. Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).....	101
3.2.11. Ensayo de migración transpocillo	101
3.2.12. Generación de líneas resistentes a citarabina.....	101
3.2.13. Estudio de la senescencia	102
3.2.14. Análisis bioinformáticos	102
3.2.14.1. Connectivity Maps.....	102
3.2.14.2. Análisis de la expresión génica asociada a LSCs.....	102
4. RESULTADOS	105
4.1. Resultados preliminares.....	107
4.2. Estudio de la PRL y el PRLR en neoplasias hematológicas	110
4.2.1. Expresión de PRL y PRLR en células hematopoyéticas sanas y neoplásicas	110
4.2.2. Caracterización del papel de la vía de señalización PRL:PRLR en LMA... 121	121
4.2.2.1. Estudio de la señalización basal del PRLR.....	126
4.2.2.2. Estudio de la señalización de PRLR tras su activación con el ligando 127	127
4.2.2.3. Estudio de la señalización mediante inhibidores.....	132
4.2.3. Caracterización del papel de la PRL en la LMA.....	139

4.2.3.1. Estudios in vitro y ex vivo.....	139
4.2.3.2. Estudios in vivo	146
4.2.4. Efecto diferencial de las células PRL wt y PRL mut	148
4.2.5. Efecto diferencial de las células PRLR wt y PRLR short.....	153
4.2.5.1. Estudio de la capacidad migratoria.....	157
4.3. Papel de la PRL y del PRLR en la quimiorresistencia	162
4.3.1. Sensibilidad a quimioterapia en líneas celulares de LMA.....	162
4.3.2. Sensibilidad a quimioterapia en células de LMA transducidas con PRL wt y PRL mut.....	163
4.3.3. Sensibilidad a quimioterapia en células de LMA transducidas con PRLR.....	166
4.3.4. Implicación del PRLR en la resistencia a citarabina	168
4.3.5. Sensibilidad a quimioterapia y senescencia.....	171
4.4. Papel de la PRL y PRLR en la diferenciación	179
4.4.1. Papel de la PRL y su antagonista en la diferenciación	179
4.4.2. Papel de los inhibidores de PRLR:PRL en la diferenciación.....	184
4.5. Efecto de la pérdida de función de PRLR en las células de LMA.....	192
5. DISCUSIÓN	199
6. CONCLUSIONES.....	213
7. BIBLIOGRAFÍA	217
8. ANNEXOS.....	243
I. Tabla de pacientes de LMA	245
II. Tabla de pacientes de SMD.....	253
III. Publicaciones.....	255

Lista de figuras

Figura 1. Modelo jerárquico de la hematopoyesis normal y la hematopoyesis en el contexto leucémico.....	37
Figura 2. Modelo de adquisición de quimiorresistencia asociado a las recaídas.....	45
Figura 3. Esquema general de la internalización y activación de la citarabina.....	47
Figura 4. Heterodimerización de PRLR por unión del ligando PRL.....	53
Figura 5. Estructura de las diferentes isoformas de PRLR.....	54
Figura 6. Vías de señalización activadas por PRLR.....	56
Figura 7. Vía de señalización de PRLR en relación con Jak2/Stat5 y sus acciones a nivel nuclear.....	59
Figura 8. Señales celulares que promueven la entrada en senescencia y los cambios fenotípicos que este proceso conlleva.....	72
Figura 9. Mapa del plásmido lentiviral pULTRA.....	93
Figura 10. Mapa del plásmido pLKO.1-TCR.....	94
Figura 11. Mapa de los plásmidos pLentiCas9-Blast y pLentiGuide-Puro.....	95
Figura 12. La vía de señalización del PRLR está diferencialmente expresada en las LSCs en comparación con las HSCs y precursores tempranos.....	108
Figura 13. La bromocriptina disminuye la supervivencia celular en líneas de LMA.....	109
Figura 14. La bromocriptina induce la diferenciación mieloide en líneas de LMA...	109
Figura 15. La PRL está sobreexpresada a nivel transcripcional en LMA con translocación de MLL y en SMD y el PRLR está sobreexpresado en LMA y SMD.....	111
Figura 16. La expresión génica de Stat5a se encuentra incrementada en células de LMA respecto a células hematopoyéticas sanas, mientras que la de Stat5b y Jak2 está disminuída.....	112
Figura 17. La expresión de PRLR y Jak2 se ve reducida en el momento de la recaída, mientras que la expresión de Stat5a/b incrementa.....	113
Figura 18. Las células de neoplasias hematológicas expresan niveles mayores de PRLR en superficie respecto a células hematopoyéticas sanas.....	116

Figura 19. Las células de muestras primarias de SMD expresan niveles mayores de PRLR en células leucémicas CD45 ^{low} y en pacientes con riesgo citogenético mayor.....	118
Figura 20. La expresión de PRLR a nivel de proteína en muestras neoplásicas varía entre distintos pacientes, pero es superior a la observada en muestras de células hematopoyéticas sanas.....	118
Figura 21. Expresión en superficie de PRLR en líneas celulares de neoplasias hematológicas.....	120
Figura 22. La forma PRL wt, pero no PRL mut, induce señalización a través de la vía Jak2/Stat5.....	123
Figura 23. Las transducciones de PRLR wt y short sobreexpresan la isoforma correspondiente en todas las validaciones realizadas.....	125
Figura 24. La isoforma PRLR wt y short activan mayoritariamente la vía de señalización Jak2/Stat5.....	127
Figura 25. La PRL, pero no G129R, activan la señalización mediada por Jak2/Stat5, principalmente, cuando las células sobreexpresan la isoforma PRLR wt.....	129
Figura 26. La PRL activa la vía de señalización JAK2/Stat5 y la posterior internalización en el núcleo de pStat5 en las células transducidas con la isoforma PRLR wt.....	131
Figura 27. Vías de señalización de PRLR una vez activado por el ligando PRL y sus diferentes puntos de inhibición farmacológica.....	133
Figura 28. Todos los inhibidores tienen acción citotóxica en el rango micromolar.....	134
Figura 29. La inhibición de Stat3 y Stat5 disminuyen la viabilidad celular independientemente de la expresión de PRLR.....	135
Figura 30. La expresión de la isoforma PRLR short disminuye la sensibilidad a los inhibidores de Stat3 y Stat5, pero no de Jak2.....	136
Figura 31. La PRL revierte el efecto citotóxico de los inhibidores de Stat3 y Stat5, pero no de ruxolitinib, inhibidor de Jak2.....	138
Figura 32. Las células de LMA no ven afectada su viabilidad tras el tratamiento con PRL o con su antagonista G129R.....	139
Figura 33. La PRL estimula la proliferación de las células de LMA transducidas con el PRLR wt, pero no se ven afectadas por el antagonista G129R, mientras que la	

isoforma dominante negativa (short) no se ve afectada por ninguno de los tratamientos.....	141
Figura 34. La PRL estimula la proliferación de las células de LMA transducidas con la PRLR wt, pero no se ven afectadas por el antagonista G129R, de forma sostenida en el tiempo.....	142
Figura 35. La PRL o su antagonista no modifican las fases del ciclo celular en las células leucémicas transducidas con PRLR.....	143
Figura 36. La clonogenicidad de las células de LMA no se ve afectada por los tratamientos con PRL o su antagonista.....	144
Figura 37. El antagonista de PRLR disminuye la viabilidad celular de muestras primarias de LMA sin afectar las células hematopoyéticas sanas.....	146
Figura 38. La PRL incrementa la proliferación de las células de LMA, mientras que el antagonista G129R disminuye la capacidad de injerto.....	148
Figura 39. Las células de LMA transducidas con PRL wt tienen una capacidad proliferativa y clonogénica mayor que las transducidas con la forma dominante negativa.....	150
Figura 40. Las células transducidas con PRL mut tiene una capacidad leucemogénica inferior.....	152
Figura 41. Las células transducidas con PRLR con una diferencia de expresión mayor respecto a la línea parental presentan un incremento en la proliferación, fase mitótica y conogenicidad.....	155
Figura 42. Las células transducidas con PRLR short tienen una capacidad leucemogénica inferior en médula ósea, mucho más pronunciada en bazo, relacionándose posiblemente con una capacidad migratoria inferior.....	161
Figura 43. Modulación de CXCR4 (CD184) sobre las células leucémicas.....	158
Figura 44. La vía de señalización PRL-PRLR regula negativamente la expresión de CD184 y promueve la movilización de las células leucémicas.....	161
Figura 45. La expresión de PRLR correlaciona positivamente con una mayor resistencia a citarabina.....	163
Figura 46. La PRL no afecta a la resistencia a citarabina asociada a la vía PRLR-PRL.....	165
Figura 47. La PRL no es capaz de revertir los efectos citotóxicos de citarabina.....	166

Figura 48. Las células MonoMac-1 y SKM-1 transducidas con PRLR presentan una mayor resistencia a los tratamientos con citarabina.....	167
Figura 49. Las células de LMA resistentes generadas tienen una menor sensibilidad a la citarabina e incrementan el valor de su EC50.....	168
Figura 50. La expresión del PRLR está incrementada en superficie en las líneas de LMA resistentes a citarabina.....	169
Figura 51. La sobreexpresión de PRLR promueve cambios génicos que favorecen la resistencia a citarabina.....	170
Figura 52. Cambios en la expresión génica en el metabolismo de la citarabina debido al incremento de expresión de PRLR.....	171
Figura 53. Las células de LMA con una expresión mayor de PRLR son más senescentes y, por lo tanto, más resistentes a tratamientos farmacológicos.....	172
Figura 54. Las células de LMA sensibles a citarabina y transducidas con PRLR wt son más senescentes que la línea parental.....	173
Figura 55. El estado senescente se relaciona con una mayor expresión de PRLR y una mayor resistencia a citarabina.....	175
Figura 56. Modelo de señalización de entrada en la senescencia por el estímulo de daño en el ADN, así como la diana de elimusertib, un inhibidor de ATR.....	177
Figura 57. El inhibidor de ATR (elimusertib) sensibiliza las células a citarabina, sobre todo a las células transducidas con PRLR.....	177
Figura 58. La PRL incrementa la diferenciación granulocítica (CD11b) en las células SKM-1 transducidas con PRLR wt, de igual manera que lo incrementa el cotratamiento con PRL y agentes diferenciadores en todas las líneas celulares estudiadas.....	180
Figura 59. El cotratamiento de PRL y agentes diferenciadores no genera grandes cambios en la diferenciación monocítica (CD14).....	181
Figura 60. Acciones de la vitamina D3 en las células relacionadas con la diferenciación.....	182
Figura 61. La PRL junto con la vitamina D3 estimulan la translocación nuclear de VDR.....	183
Figura 62. La señalización mediada por MEK-Erk no tienen ninguna influencia en la diferenciación mieloide.....	185

Figura 63. La vía de señalización de PI3K-Akt tiene un rol importante en los procesos de diferenciación granulocítica y monocítica.....	186
Figura 64. La inhibición de Jak2 no tiene ningún papel en la diferenciación mieloide.....	187
Figura 65. La señalización mediada por Stat3 promueve el bloqueo de la diferenciación, pero puede ser revertida con el uso de inhibidores y con el tratamiento conjunto de ellos con agentes diferenciadores.....	189
Figura 66. La inhibición de Stat5 disminuye la diferenciación granulocítica e incrementa ligeramente la monocítica.....	190
Figura 67. El uso de shRNA para silenciar el gen de PRLR no consiguió disminuir la expresión del receptor.....	193
Figura 68. La expresión de PRLR está disminuida en los clones seleccionados.....	194
Figura 69. La represión de la expresión de PRLR induce una salida del estado de senescencia en las células.....	195
Figura 70. La represión de la expresión de PRLR genera una disminución en la capacidad clonogénica de las células.....	196
Figura 71. Acciones de la PRL en el contexto leucémico.....	204
Figura 72. Acciones del PRLR en el contexto leucémico.....	210
Figura 73. Posibles estrategias terapéuticas dirigidas al PRLR y sus efectos en el contexto leucémico.....	211

Lista de tablas

Tabla 1. Información de las líneas celulares.....	84
Tabla 2. Compuestos utilizados.....	86
Tabla 3. Lista de anticuerpos acoplados a fluoróforo para citometría de flujo.....	86
Tabla 4. Lista de anticuerpos primarios.....	87
Tabla 5. Lista de cebadores utilizados para la RT-PCR semicuantitativa	88
Tabla 6. Cebadores utilizados para amplificar PRL y delimitarlo con las dianas de restricción EcoRV.....	92
Tabla 7. Cebadores utilizados para la mutagénesis dirigida con oligonucleótidos solapantes.....	92
Tabla 8. Cebadores para el clonaje de la forma PRLR short con las dianas de restricción.....	92
Tabla 9. Cebadores específicos para los shRNA.....	93
Tabla 10. Relación de plásmidos complementarios necesarios para la generación de lentivirus de tercera generación.....	95
Tabla 11. Relación de pacientes de LMA incluidos en los estudios.....	252
Tabla 12. Relación de pacientes de SMD incluidos en los estudios.....	254

1. Introducción

1.1. Neoplasias hematológicas

Las neoplasias hematológicas forman un grupo de enfermedades oncológicas que afectan a la sangre, a la médula ósea y al sistema linfático y, debido a la conexión que tienen estos órganos gracias al sistema inmune y al sistema circulatorio, si uno de ellos se ve afectado, afectará a los otros dos. A diferencia de los tumores sólidos, las neoplasias hematológicas no presentan mutaciones prevalentes y en la gran mayoría se observa un cariotipo normal, lo que las separa a nivel de diagnóstico, tratamiento y estudio de los demás tipos de cáncer. Este grupo de enfermedades incluyen leucemias, linfomas, enfermedades mieloproliferativas, mielodisplasias y mielomas (Arber et al., 2016; Eisfeld et al., 2017). Debido al interés que presenta para este trabajo, los siguientes apartados se centrarán, básicamente, en leucemia mieloide aguda (LMA) que, dentro de las leucemias de linaje mieloide, es la más común, con una incidencia de 4,3 casos por cada 100.000 que se incrementan hasta 17,9 por cada 100.000 en adultos mayores de 65 años (Estey & Döhner, 2006).

1.1.1. Leucemia mieloide aguda

La leucemia mieloide aguda (LMA) es una neoplasia hematológica caracterizada por la acumulación de progenitores mieloides, los blastos, que presentan un bloqueo en la diferenciación y tienen una respuesta muy reducida a estímulos proliferativos (Dick & Bonnet, 1997; Estey & Döhner, 2006; Thomas & Majeti, 2017). El bloqueo en la diferenciación produce una insuficiencia de células sanguíneas normales (glóbulos rojos, plaquetas y granulocitos, entre otros) que contribuyen a la morbilidad de la enfermedad (Thomas & Majeti, 2017). Según el Instituto Nacional de la Salud de los Estados Unidos (NIH) un 0,5% de la población mundial será diagnosticada con LMA en algún momento de su vida y sólo el 28,7% sobrevivirán más de cinco años. El riesgo de padecer LMA incrementa a partir de los 40 años de edad, siendo la edad media de diagnóstico los 68 años y la de mortalidad, los 73 años (Döhner et al., 2017).

Existen diferentes alteraciones citogenéticas asociadas a la aparición de LMA que pueden estar relacionadas con la edad, como son las deleciones -5/-7, o ser independientes a ésta, como las translocaciones t(15;17) y t(8;21). Aunque estas alteraciones tengan un papel importante, la mayoría de pacientes de LMA presentan un cariotipo normal y sólo se observan alteraciones genéticas en diferentes proteínas

como FLT3, NPM1, CEBPA, MLL, RAS, BAALC o EVI1, entre otras (Eisfeld et al., 2017). Cabe destacar la mutación en la nucleofosmina 1 (NPM1) ya que es la más común, presentándose en el 48-64% de los casos de LMA con cariotipo normal (Estey & Döhner, 2006).

Dado que una característica fundamental de la LMA es la presencia anormal de blastos alterados en médula ósea y sangre, no es sorprendente que el diagnóstico de la neoplasia se base en la cuantificación de estas células, confirmándose la aparición de la enfermedad cuando los blastos superan el 20-30% de la población celular total de médula ósea y considerando el estado de remisión cuando el conteo desciende al 5% (Döhner et al., 2015; Estey & Döhner, 2006).

La ausencia de un tumor sólido que caracterizar y la gran heterogeneidad que presenta la LMA ha hecho imperiosa la necesidad de clasificar la neoplasia para poder generar pronósticos y aplicar tratamientos más efectivos a los pacientes. Destacan dos clasificaciones: la clasificación Francesa-Americana-Británica (FAB), basada en la morfología de las células (Bennett et al., 1976) y la clasificación más reciente de la OMS (Organización Mundial de la Salud), basada en criterios citogenéticos y moleculares (Arber et al., 2016). La **clasificación FAB** fue publicada por primera vez a finales de los años 70 y clasifica la LMA en función del nivel de maduración de los blastos leucémicos. Podemos diferenciar hasta 8 tipos de leucemia clasificados de M0 a M7. Las LMAs M0, M1, M2 y M3 presentan células preferentemente con diferenciación granulocítica; la M4 presenta diferenciación granulocítica y monocítica; la M5 presenta diferenciación monocítica; y, finalmente, la M6 y M7 presentan diferenciación eritroblástica (Bennett et al., 1976). En este punto es interesante mencionar que la leucemia promielocítica aguda (LPA), considerada una LMA tipo M3 según la clasificación FAB, no se considerará en este trabajo debido a las características propias y al tratamiento específico que conlleva su diagnóstico. Aunque la morfología de las células sigue siendo fundamental para el diagnóstico de la LMA, ésta no tiene ninguna relación con el pronóstico de la enfermedad, haciendo que la clasificación FAB sólo tenga importancia en investigación, permitiendo comparar resultados anteriores a los actuales (Arber et al., 2016; Bennett et al., 1976). La **clasificación más reciente de la OMS** se publicó el 2016 y, principalmente, es una

revisión de las clasificaciones anteriores, sin modificar los grupos e incorporando nuevos datos clínicos, morfológicos, inmunofenotípicos, citogenéticos y moleculares que han surgido desde la última revisión del 2008. Debido a su relación con el pronóstico, esta clasificación es la utilizada actualmente (Arber et al., 2016).

1.1.2. Síndromes mielodisplásicos

Los síndromes mielodisplásicos (SMD) engloban un conjunto de patologías caracterizadas por hematopoyesis fallidas que llevan a citopenias, displasias morfológicas de uno o más linajes hematopoyéticos, presencia de sideroblastos en anillo, exceso de blastos y anomalías genéticas (Arber et al., 2016; Jaiswal & Ebert, 2014), generalmente producidas por *splicing* de ARN (Papaemmanuil et al., 2013). Además, en la mayoría de casos la enfermedad progresa hacia una LMA afectando mayoritariamente a individuos de edad avanzada (Arber et al., 2016; Jaiswal & Ebert, 2014; Palacios-berraquero & Alfonso-pi, 2021).

La gran heterogeneidad observada entre pacientes y la gran complejidad de los SMD hacen que la clasificación sea difícil y esté basada, principalmente, en el grado de displasia y en el porcentaje de blastos, así como la presencia de delección en 5q (Arber et al., 2016; Palacios-berraquero & Alfonso-pi, 2021). Esta heterogeneidad también afecta al tratamiento de los pacientes, ya que muchos no requieren tratamientos o sólo tratamiento de soporte, mientras que en otros casos se utilizan agentes hipometilantes y, en casos más severos, tratamientos similares a los empleados en la LMA (Arber et al., 2016).

1.1.3. Células madre leucémicas

1.1.3.1. Identificación de las células madre leucémicas

Como se ha comentado anteriormente, la proliferación de los blastos leucémicos es muy limitada, lo que sugiere que existe otra población capaz de mantener el *pool* de células leucémicas.

En condiciones normales, la hematopoyesis humana está estrictamente regulada y se basa en una jerarquía donde las células madre hematopoyéticas (HSC, del inglés *Hematopoietic Stem Cell*), unas células indiferenciadas y con capacidad de autorrenovación, son capaces de generar células progenitoras que se multiplicarán y

diferenciarán en los distintos linajes celulares sanguíneos (Chopra & Bohlander, 2019) **(Figura 1)**. En la década de los 90, Dick y Bonnet, y más adelante Lapidot, demostraron que existía una pequeña población de células con un fenotipo y unas propiedades similares a las HSC; las llamaron células madre leucémicas (LSC, del inglés *Leukemic Stem Cell*) por analogía con las HSC (Dick, 1996; Dick & Bonnet, 1997; Lapidot et al., 1994). Dentro de la población de células leucémicas, la población CD34⁺CD38⁻ era capaz de generar leucemia en ratones SCID/NOD, corroborando la existencia de una célula madre leucémica capaz de generar toda la población de blastos leucémicos (Lapidot et al., 1994). Esta teoría nos sugiere que la LMA está organizada como una jerarquía de células muy similar a un sistema hematopoyético normal (Dick, 1996; Dick & Bonnet, 1997; Lapidot et al., 1994) **(Figura 1)**. Aunque esté establecido el fenotipo de las LSC como CD34⁺CD38⁻ independientemente del subtipo de la LMA (Dick & Bonnet, 1997), esta clasificación tiene ciertas limitaciones (Dick, 2008). Los marcadores de superficie son antígenos cuya expresión puede verse modificada debido a procesos de diferenciación, mecanismos alterados en cáncer. Por lo tanto, hay que ser especialmente cuidadosos a la hora de escoger los marcadores de las LSC (Dick, 2008). La mejor manera de definir una LSC reside en criterios funcionales: la propiedad clave de las células madre es la capacidad de diferenciarse en combinación con la capacidad de autorrenovación (Dick, 2008). Se ha observado que las *long-term* HSC con elevada capacidad autorrenovativa generan las *short-term* HSC, con una capacidad autorrenovativa inferior (Guenechea et al., 2001; Jordan & Lemischka, 1990). Otros estudios relacionados determinaron que las LSC también presentan diferencias en la capacidad autorrenovativa, igual que la comentada respecto a las HSC. Aun así, una clara diferencia entre las HSC y las LSC es que las segundas tienen una capacidad regenerativa mayor una vez son inyectadas en un receptor (Dick & Bonnet, 1997; Jordan & Lemischka, 1990).

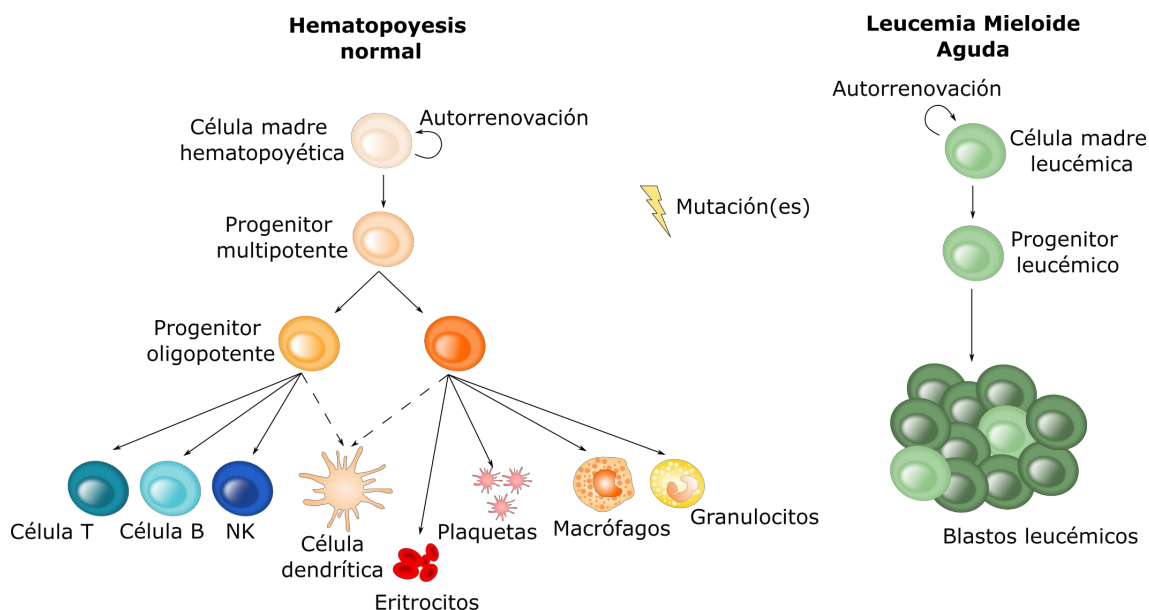


Figura 1. Modelo jerárquico de la hematopoyesis normal y la hematopoyesis en el contexto leucémico.

1.1.3.2. Célula de origen

Aunque la teoría de Dick y Bonnet mencionada anteriormente ha servido como esquema básico de la organización jerárquica de la LMA, datos experimentales posteriores sugieren que la transformación leucémica ocurre en un progenitor más maduro y no en las HSC (Chopra & Bohlander, 2019). La célula de origen de la LMA (COL, del inglés *Cell of Origin of Leukemia*) es una célula que ha sufrido diferentes cambios y transformaciones, modificándola y convirtiéndola en una LSC. Existen dos teorías que podrían explicar esta transformación: la primera afecta a las HSC, que podrían aumentar su potencial proliferativo (Dick & Bonnet, 1997), mientras que la segunda teoría sostiene que un progenitor ya predestinado a un linaje determinado adquiriría capacidad de autorrenovación (Chopra & Bohlander, 2019; Dick, 2008). Estudios más recientes demuestran que las LSC tienen enriquecidos los programas de célula madre, pero no los progenitores o embriológicos, sugiriendo que la COL puede provenir de una HSC transformada o que el proceso leucemogénico proporciona a los progenitores componentes de programas de células madre neonatales (Eppert et al., 2011).

1.1.3.3. Heterogeneidad tumoral

La gran heterogeneidad observada en la LMA la encontramos en el fenotipo de los blastos leucémicos no sólo a nivel morfológico, sino también a nivel funcional,

abarcando diferencias en la proliferación o, incluso, en el inicio del tumor (Dick, 2008). Podemos diferenciar dos tipos de heterogeneidad: la intrapaciente y la interpaciente. La **heterogeneidad intrapaciente** está definida en la clasificación FAB de la LMA mencionada anteriormente, donde encontramos los subtipos de la enfermedad con blastos más o menos diferenciados (Bennett et al., 1976; Dick, 1996). Por otro lado, la **heterogeneidad interpaciente** la podemos explicar mediante dos modelos excluyentes entre sí y vigentes actualmente: el modelo estocástico y el modelo jerárquico (Dick, 2008).

El **modelo estocástico** defiende que, inicialmente, un tumor es biológicamente homogéneo, pero toda célula progenitora puede verse afectada por factores intrínsecos y extrínsecos que la guiarán por dos caminos completamente distintos: la autorrenovación y la diferenciación. Si la célula se autorrenueva, se obtendrán dos células con las mismas características que la célula inicial; en cambio, si la célula se diferencia perderá las características de célula madre, pero conservará la capacidad de proliferación, de manera que podrá generar células idénticas y totalmente diferenciadas. Estos dos procesos ocurren de manera aleatoria o estocástica (Ogawa, 1993; Till et al., 1964). Varios autores han evidenciado que las HSC se encuentran en estado quiescente o en fase G₀ del ciclo celular, indicando que la autorrenovación está asociada a una salida del estado de latencia, mientras que la diferenciación se caracteriza por una continua réplica de las células (Lajtha, 1979; Ogawa, 1993). Si tenemos en cuenta este modelo, no tenemos cabida para las LSC, ya que todas las células tumorales serían funcionalmente equivalentes, pero sí que observaríamos la presencia de LSC funcionales (Dick, 2008; Dick & Bonnet, 1997; Wang & Dick, 2005).

Por otro lado, el **modelo jerárquico** defiende la existencia de una población de células con características de célula madre y capacidad de autorrenovación, responsables de generar una población tumoral funcionalmente heterogénea. Esta pequeña población son las LSC (Dick, 2008). Teniendo en cuenta este modelo, la organización de la LMA es entendida como una caricatura de la jerarquía de la hematopoyesis en condiciones normales, donde en la parte más alta tenemos una

célula madre indiferenciada y con capacidad de autorrenovación capaz de generar toda la población de blastos leucémicos (Dick, 2008; Dick & Bonnet, 1997).

La principal diferencia entre las LSC funcionales y las LSC reside en que las primeras pueden aparecer de manera espontánea y todas las células del tumor pueden comportarse como tal. En cambio, en el modelo jerárquico, sólo una pequeña población son LSC (Dick, 2008).

Las LSC son células con mucha plasticidad y una elevada adaptabilidad, siendo capaces de generar un sistema, aunque sí jerárquico, mucho más dinámico que el descrito en la hematopoyesis (Greaves, 2016) y en el modelo jerárquico (Dick, 2008). Esto nos lleva a un tercer modelo para explicar la heterogeneidad intrapaciente: el **modelo de la evolución clonal**, que defiende la existencia de una jerarquía funcional. Ya en la década de los años 70, Nowell propuso que las trayectorias evolutivas que siguen las células de las neoplasias hematológicas eran muy complejas y ramificadas (Nowell, 1976), conclusiones confirmadas por varios autores más recientemente (Anderson et al., 2011) y que van en paralelo con la teoría evolutiva de Charles Darwin y su Árbol de las Especies (Greaves, 2016; Greaves & Maley, 2012; Merlo et al., 2006). Las LSC pueden sufrir mutaciones o cambios epigenéticos que ayudan a la adquisición de fenotipos que favorecen la expansión de células con capacidad de autorrenovación, así como la migración e invasión de tejidos, siempre y cuando no pierdan la capacidad de autorrenovación y características de célula madre. Estas modificaciones permiten la generación de una subpoblación de blastos que estarán más adaptados a la supervivencia a tratamientos y a las condiciones del ecosistema tisular en el que se encuentran (Greaves & Maley, 2012; Merlo et al., 2006; Reya et al., 2008).

Actualmente, la única manera para determinar qué modelo es el correcto sería poder aislar las diferentes células presentes en el tumor y analizar sus características individualmente. Aun así, como se ha comentado en el apartado anterior, aislar las LSC de la población de células leucémicas es complicado y aún no se conocen los marcadores totalmente específicos para ello (Dick, 2008).

1.1.4. Entorno tisular

La interacción con el entorno celular es importante tanto en condiciones normales como en neoplasias. En el caso de la LMA este entorno se conoce como estroma medular y, aunque no tiene una función clara, juega un papel crucial en la regulación de las HSC y LSC (Raaijmakers et al., 2010), así como en la evolución hacia la mejora en la supervivencia y la resistencia a fármacos, proporcionando una ventaja evolutiva (Greaves & Maley, 2012; Lathia et al., 2011). Por otro lado, la proliferación de las células leucémicas en la médula ósea también es responsable de producir cambios en el microambiente estromal, generando nichos más aptos para el crecimiento de las células CD34⁺, permitiendo la alteración de la respuesta antitumoral del sistema inmune (Colmone et al., 2008). Esta ventaja evolutiva hacia las células leucémicas declina la balanza hacia este tipo celular, haciendo que el número de HSC se vea disminuido progresivamente (Colmone et al., 2008; Gilbert & Hemann, 2010).

Los tratamientos quimioterapéuticos pueden alterar el ecosistema formado por los tejidos, generando nuevas presiones selectivas y nuevas oportunidades para el surgimiento de variantes celulares tumorales capaces de sobrevivir a la terapia que, conjuntamente con la protección que suponen los nichos especializados, protegen a las células del tratamiento (Gilbert & Hemann, 2010).

1.1.5. Tratamientos

Desde la década de los 70, la terapia combinatoria ya se consideró una opción para tratar a los pacientes de LMA (Rodríguez et al., 1973) y, poco después, se optó por el “régimen 7+3” (Yates et al., 1973), basado en 7 días de tratamiento con citarabina y 3 días con antraciclinas (daunorubicina o idarubicina) (Döhner et al., 2017; Yates et al., 1973). Casi 50 años después, el régimen 7+3 sigue siendo el utilizado en clínica, pero acompañado de trasplante de progenitores hematopoyéticos (Estey & Döhner, 2006; Thomas & Majeti, 2017).

Una vez diagnosticada la LMA, se procede a un tratamiento en dos fases. La primera fase consiste en el régimen 7+3 y se aplica siempre que el paciente sea elegible para este tipo de tratamiento. Pretende conseguir una remisión total, definida como una presencia de blastos leucémicos inferior a un 5% en médula ósea (Estey & Döhner,

2006). Actualmente, es la única respuesta que lleva a la cura del paciente y a un incremento de la supervivencia (Döhner et al., 2015; Estey & Döhner, 2006). La segunda fase pretende alargar la remisión completa del paciente y es esencial, dado que las recaídas son frecuentes, aunque pasados tres años desde la remisión, la probabilidad de recaída disminuye hasta un 10% (Döhner et al., 2015; Estey & Döhner, 2006). Este tratamiento consiste en dosis de citarabina de manera intensiva seguido, siempre que sea posible, de trasplante autólogo o alogénico de progenitores hematopoyéticos (Döhner et al., 2015).

En pacientes menores de 60 años, las ratios de remisión rondan el 20-75%, mientras que en pacientes mayores sólo son del 10%. Esta bajada en la recuperación se asocia a la dificultad de sobrevivir al tratamiento y a la relación existente entre la edad y la aparición de anomalías citogenéticas que agravan las condiciones de la LMA (Estey & Döhner, 2006; Thomas & Majeti, 2017). Estos tratamientos disminuyen eficientemente la población de blastos leucémicos a corto plazo, lo que supone una mejoría en el curso de la enfermedad, pero los resultados a largo plazo no han mejorado en las últimas décadas. La supervivencia de los pacientes menores de 60 años durante 5 años ronda el 35-40% y la media de supervivencia es, aproximadamente, de un año (Thomas & Majeti, 2017).

La importancia de las LSC a nivel clínico no sólo reside en ellas como iniciadoras de la LMA, sino en sus características de célula madre y su heterogeneidad entre pacientes, entre otras. Recientemente se ha observado que un incremento en el perfil génico de las LSC, así como un incremento en número de células CD34⁺CD38⁻ en el momento de diagnóstico, nos puede dar información sobre la supervivencia y la respuesta a tratamientos que tendrá cada sujeto (Eppert et al., 2011; Shlush et al., 2017). Estas características, junto con la idea del sistema jerárquico de la LMA donde las LSC están en la parte más alta, nos llevan al estudio de las LSC como una diana terapéutica efectiva para erradicar completamente la LMA y evitar las recaídas (Copelan, 2006; Dick & Bonnet, 1997; Greaves & Maley, 2012). En este punto es donde surge la complejidad de la enfermedad, ya que las LSC tienen características de célula madre donde destacan la autorrenovación, comentada anteriormente, una quiescencia relativa, resistencia a la apoptosis y la posesión de bombas de eflujo que

eliminan las sustancias que entran al citoplasma de la célula, generando resistencia a fármacos (Copelan, 2006; Lajtha, 1979; Ogawa, 1993). Además, el estroma medular confiere un entorno que favorece el crecimiento de las LSC y las protege de los agentes externos (Colmone et al., 2008).

1.1.5.1. Nuevas estrategias terapéuticas

La visión de las LSC como una diana efectiva para erradicar la LMA y otras neoplasias hematológicas (Copelan, 2006; Dick & Bonnet, 1997; Greaves & Maley, 2012) ha llevado al estudio de diferentes estrategias centradas en estas células. Caracterizar las LSC y saber en qué se diferencian de las HSC es un paso clave para entender la patología y descubrir nuevos tratamientos contra la LMA, pero presenta muchas dificultades. Aunque el concepto de célula madre se estableció hace décadas, el estudio de las HSC y su comparación con las LSC se ha visto dificultado por la falta de marcadores específicos y fiables que nos ayuden a identificarlas y aislarlas de la población leucémica total (Dick, 1996, 2008; Dick & Bonnet, 1997; Lapidot et al., 1994; Ogawa, 1993). Aun así, sigue habiendo un elevado interés en el estudio de las LSC y su comparativa con las HSC, debido a la firma génica similar, aunque ligeramente distinta (Eppert et al., 2011; Shlush et al., 2017).

Aunque las terapias no han cambiado en las últimas décadas, el estudio de nuevas estrategias está en alza. A continuación, se describen algunos de los métodos más usados para el desarrollo de nuevos fármacos y el descubrimiento de nuevas opciones terapéuticas.

a) Cribado de alto rendimiento

Las diferencias en la firma génica de las LSC y las HSC, así como entre las LSC en las recaídas y al momento de diagnóstico (Eppert et al., 2011) nos pueden ayudar a encontrar la ventana terapéutica entre las HSC y LSC, permitiendo un tratamiento dirigido exclusivamente contra las células leucémicas. El desarrollo de cribados de alto rendimiento ha ayudado enormemente a la identificación de estas moléculas o elementos y nos permiten iniciar el desarrollo de posibles inhibidores, como es el caso de los antihistamínicos (Cornet-Masana et al., 2019; Laverdière et al., 2018). Aun así, es necesaria mucha más investigación, ya que la resistencia a fármacos derivada de las

bombas de eflujo que contienen las LSC junto con la complejidad a la hora de identificar y aislar las LSC, dificultan el estudio de estas células (Dick, 2008; Greaves & Maley, 2012).

b) Combinación de fármacos

Con la premisa del régimen 7+3 (Yates et al., 1973) y viendo la efectividad del cotratamiento, se formuló el liposoma CPX-351, con un ratio 5:1 de citarabina y daunorubicina. La encapsulación permite una mayor vida del fármaco y disponibilidad para las células, incrementando el efecto antileucémico, aunque los efectos secundarios son los mismos que con el tratamiento libre (Feldman et al., 2011).

El problema que suponen las bombas de eflujo de las LSC y que confieren resistencia a fármacos se ha intentado solventar con la combinación de fármacos citotóxicos y no citotóxicos. Aun así, la plasticidad y adaptabilidad las LSC hace el estudio de nuevas terapias complejo y con resultados poco satisfactorios (Estey & Döhner, 2006; Greaves & Maley, 2012).

c) Microambiente como diana terapéutica

Como se ha comentado anteriormente, la interacción con el microambiente y los cambios de éste asociados al tratamiento son cruciales para la supervivencia y capacidad proliferativa de las células tumorales. Se han realizado estudios centrados en atacar directamente éste microambiente o bien impedir la interacción de éste con las células que lo rodean, ya sean LSC o blastos leucémicos (Pienta et al., 2008).

d) Cáncer como una enfermedad crónica

Llevar la enfermedad, no sólo las leucemias, sino cualquier neoplasia, al ámbito crónico es una terapia establecida y utilizada actualmente en clínica. Mientras que las drogas citotóxicas favorecen presiones que seleccionan las células resistentes a los tratamientos, las terapias citoestáticas retrasan la progresión y la mortalidad de los pacientes en mayor medida que los tratamientos más agresivos. El conjunto de células tumorales ve suprimida su actividad proliferativa, disminuyendo así la aparición de nuevas mutaciones, y, además, consumen nutrientes que, en otras condiciones, serían únicamente para las células resistentes que sobreviviesen al tratamiento citotóxico (Greaves & Maley, 2012). Se ha observado que el mantenimiento de un tumor ovárico

sin modificaciones en ratones alarga la vida del animal indefinidamente (Duan et al., 2017).

e) Diferenciación para eliminar las LSC

Se ha observado que las LSC y los blastos leucémicos tienen un bloqueo en los procesos de diferenciación. Este bloqueo mantiene las características de célula madre de las LSC que, básicamente, son las que impiden que muchos tratamientos lleguen a ellas debido a las bombas de eflujo, entre otras. Derivar el bloqueo de la diferenciación y dirigir las células a un linaje hematopoyético alternativo podría ser una terapia eficaz para erradicar completamente la población de células leucémicas. La inducción de una diferenciación terminal de las LSC eliminaría el conjunto de estas células, dejando únicamente los blastos leucémicos que, dada su baja actividad proliferativa y su vida finita, podrían ser erradicados con tratamientos citotóxicos convencionales (Sachlos et al., 2012).

f) Inhibidores de vías de señalización

Una vez más, las similitudes entre las LSC y las HSC hace que compartan vías de señalización con ligeras diferencias. Esto ha llevado al estudio de moduladores de estas vías de señalización y, aunque han mejorado las tasas de remisión (Burnett et al., 2011; Jin et al., 2006), el éxito se ha visto disminuido debido a los efectos secundarios que conlleva la extrema similitud entre las vías de señalización de la hematopoyesis sana (HSC) y leucémica (LSC) (Takebe et al., 2011).

Paralelamente, para contrarrestar la problemática asociada a la extrema similitud entre las LSC y las HSC, se han aprobado diversos fármacos que defienden la premisa del tratamiento personalizado. Aunque se necesitan más estudios para verificar sus efectos, es interesante mencionar que los estudios preliminares indican que las nuevas estrategias terapéuticas centradas en mecanismos de acción pueden ser muy efectivas con un efecto antileucémico elevado y una toxicidad muy reducida, disminuyendo los efectos secundarios (Risueño et al., 2021).

1.1.6. Quimiorresistencia

Aunque los tratamientos para combatir la LMA se establecieron hace décadas, las recaídas siguen siendo uno de los retos más complicados a afrontar actualmente

(Figura 2). Los datos de remisión son satisfactorios, pero muchos pacientes tienen recaídas provocadas, principalmente, por la resistencia adquirida de las células leucémicas a los tratamientos (Ferrara et al., 2019; Qian et al., 2020). Se ha observado que el 80% de los pacientes mayores de 65 años mueren en el lapso de un año desde el diagnóstico debido a fenómenos de quimiorresistencia (Shallis et al., 2019). Uno de los intentos para mejorar el tratamiento y evitar la resistencia se basa en la propuesta de una nueva clasificación de la LMA independiente de la Clasificación FAB y la propuesta por la OMS y que depende de la sensibilidad a tratamientos antileucémicos en el momento del diagnóstico. Agrupa a los pacientes en tres grupos: quimiosensibles a diagnóstico, quimiorresistentes a diagnóstico y quiorresistentes de adquisición por evolución clonal (Short et al., 2020; Short & Ravandi, 2016).

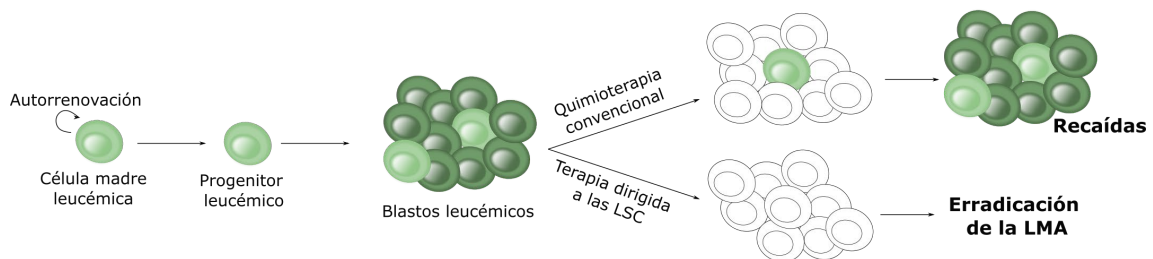


Figura 2. Modelo de adquisición de quimiorresistencia asociado a las recaídas.

Las recaídas y la refractariedad (R/R), entendidas como la reaparición de la enfermedad (Vosberg & Greif, 2019) y la ausencia de remisión completa después de dos ciclos de quimioterapia (Bose et al., 2017; Schmid et al., 2006), respectivamente, son el mayor problema que provoca la ausencia de respuesta a los tratamientos de LMA. Las R/R pueden existir antes de la exposición a quimioterapia o bien se pueden desarrollar o incrementar durante el tratamiento (Marin et al., 2016). Se ha observado que el 60% de los pacientes de riesgo favorable y el 85% de riesgo adverso desarrollan R/R y sólo el 10-20% sobreviven más de 5 años (Fajardo-Orduña et al., 2021).

Aunque los mecanismos de resistencia a fármacos también son heterogéneos entre pacientes, tienen algunas similitudes recogidas en el fenotipo de resistencia a multidrogas (MDR, del inglés *Multidrug Resistant Phenotype*). Se caracteriza por ser un fenómeno multifactorial que genera resistencia generalizada a distintos tratamientos y se explica por un conjunto de mecanismos de quimiorresistencia (MOC, del inglés *Mechanisms Of Chemoresistance*) que llevan a la disminución de la eficacia de los

tratamientos anticáncer (Fajardo-Orduña et al., 2021; Marin et al., 2016). Los MOC tienen tres características clave: en primer lugar, la reducción de la cantidad de fármaco dentro de la célula debido a disfunciones en mecanismos de absorción y al incremento de bombas de eflujo; en segundo lugar, la disminución de los activadores de fármacos y el incremento de los inactivadores; y, por último, la reducción de la efectividad del fármaco debido a cambios en la diana terapéutica, al incremento de la capacidad de reparación de los daños en el ADN, a la disminución de los mecanismos proapoptóticos y al incremento de los antiapoptóticos, al incremento de la respuesta al estrés y a los cambios en el microambiente (Fajardo-Orduña et al., 2021; Zhang et al., 2019).

La clave para incrementar la supervivencia reside en entender los mecanismos de quimiorresistencia, sobre todo asociados a citarabina, ya que es el fármaco más usado en clínica. Para hacerlo, es imprescindible conocer los MOC del paciente en cada momento de la historia clínica para poder desarrollar estrategias efectivas (Fajardo-Orduña et al., 2021).

1.1.6.1. Activación de la citarabina

En condiciones normales, la citarabina entra por diferentes vías a la célula: por difusión pasiva (Cros et al., 2004) y mediante transportadores de membrana, conocidos como transportadores de equilibrio de nucleósidos (hENT, del inglés *human Equilibrative Nucleoside Transporter*) (Negoro et al., 2011). Una vez dentro de la célula, la citarabina tiene que ser fosforilada un total de tres veces por diferentes elementos. Primero, la deoxicitidina quinasa (dCK) da lugar a la citarabina monofosfato (AraCMP), seguidamente, la deoxicitidina monofosfato quinasa (dCMPK) da lugar a la citarabina difosfato (AraCDP) y, por último, el nucleósido difosfato quinasa (NDPK) da lugar a la citarabina trifosfato (AraCTP), la forma activa. Ésta última puede entrar al núcleo celular y unirse al ADN durante la Fase S del ciclo celular, provocando la apoptosis de la célula (Fajardo-Orduña et al., 2021) (**Figura 3**). Se ha observado que la AraCTP es un indicativo de la citotoxicidad ejercida por la droga a nivel celular y, por lo tanto, está directamente relacionada con la respuesta al fármaco (Cros et al., 2004; Negoro et al., 2011). Además, una disminución en la cantidad de AraCTP se relaciona con resistencia al fármaco debido a poca actividad

de los transportadores de la familia hENT, bajos niveles de enzimas activadoras (sobre todo dCK) y altos niveles de enzimas inactivadoras (CDA, citidina deaminasa, y NT5E, 5'-nucleotidasa, entre otras), mientras que observamos mayores acumulaciones de AraCTP en células sensibles que en resistentes (Fajardo-Orduña et al., 2021).

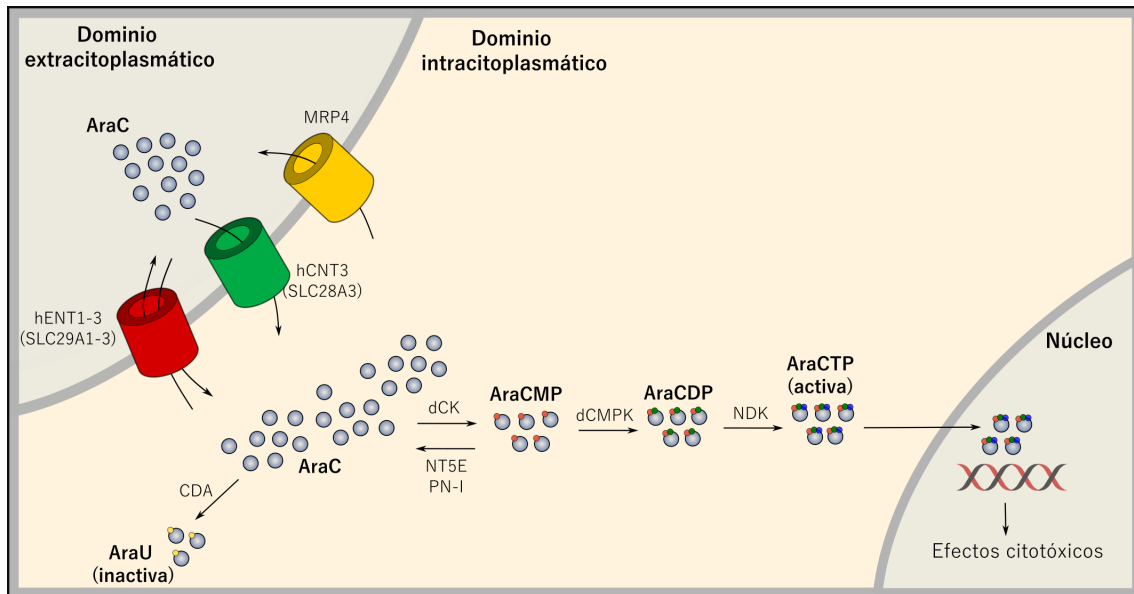


Figura 3. Esquema general de la internalización y activación de la citarabina.

El desarrollo de fármacos enfocados a evitar y solventar el problema de la quimiorresistencia se basa en la combinación de varias moléculas que promuevan la apoptosis de las células leucémicas de tres maneras distintas: incrementando el efecto apoptótico que se ha visto disminuido por la citarabina, inhibiendo las vías de señalización relacionadas con la quimiorresistencia e inhibiendo el fenotipo quimiorresistente (Fajardo-Orduña et al., 2021).

1.2. Prolactina

La prolactina (PRL) es una hormona polipeptídica que, originalmente, recibió su nombre debido a la habilidad de promover la lactancia en respuesta al estímulo de la succión producida por las crías de mamíferos (Riddle et al., 1933). Actualmente, la PRL se considera una hormona multifuncional con un rango de acciones muy amplio, sintetizada y secretada por múltiples órganos y tejidos (Freeman et al., 2000; Gregerson, 2006; Marano & Ben-Jonathan, 2014).

1.2.1. Síntesis y secreción

La síntesis y liberación de PRL está mediada por la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) y el péptido inhibidor vasoactivo (VIP), mientras que su liberación está inhibida por la dopamina (Neidhart, 1997).

Anteriormente, se creía que la PRL sólo podía ser sintetizada por las células lactotropas de la glándula pituitaria anterior (Riddle et al., 1933), pero posteriormente se ha descrito su síntesis y secreción en diferentes tejidos y órganos, refiriéndose a ella como PRL extrapituitaria y presentando la misma estructura y capacidad de unión a su receptor (Bern & Nicoll, 1968; Marano & Ben-Jonathan, 2014). Entre los órganos extrapituitarios secretores de PRL encontramos el cerebro (concretamente el hipotálamo) (DeVito, 1988), órganos reproductores masculinos y femeninos, tejido adiposo, cóclea, células endoteliales, folículos pilosos y piel (Freeman et al., 2000; Gregerson, 2006; Marano & Ben-Jonathan, 2014) y tejidos del sistema inmune (Freeman et al., 2000; Gregerson, 2006; Hiestand et al., 1986; Marano & Ben-Jonathan, 2014).

En cuanto al sistema hematopoyético, las células sanguíneas mononucleadas, los timocitos y los linfocitos de sangre periférica expresan PRL constitutivamente a nivel transcripcional (Pellegrini et al., 1992), totalmente independiente de la prolactina pituitaria (Hiestand et al., 1986). La PRL podría tener un papel importante en la hematopoyesis ya que las células estromales y las células primitivas CD34⁺ de médula ósea expresan la hormona bajo el estímulo del factor activador de plaquetas (PAF) y el receptor de prolactina (PRLR), respectivamente, promoviendo el crecimiento y la diferenciación celular (Bellone et al., 1995, 1997).

Un gran número de líneas celulares hematopoyéticas humanas, derivadas principalmente de leucemias y linfomas, sintetizan y secretan PRL, aunque ninguna de ellas depende totalmente de la hormona para su crecimiento. Además, la relación entre la transformación neoplásica y la expresión génica de PRL no ha sido determinada (Hiestand et al., 1986). Aun así, se ha observado un incremento en el ARN mensajero (ARNm) de PRL en líneas celulares derivadas de sarcoma histiocístico (U937) al aplicarles tratamientos con vitamina D3 y el factor de crecimiento transformante beta (TGFβ), dos agentes diferenciadores que incrementan los marcadores monocíticos y macrofagocíticos, produciendo la diferenciación terminal del macrófago (Testa et al., 1993). Es importante mencionar para el trabajo que se está presentando, que aunque existe evidencia de que los pacientes con LMA presentan niveles elevados de PRL en suero (Hatfill et al., 1990) y que los blastos mieloides leucémicos producen y expresan PRL a nivel transcripcional y traduccional (Kooijman et al., 2000; Montgomery, 2001; Pellegrini et al., 1992; Sabharwal et al., 1992), la función de la PRL en los procesos leucémicos se desconoce.

1.2.2. Funciones

Como se ha comentado anteriormente, aunque la PRL originalmente fue estudiada por sus funciones reproductivas y osmorreguladoras, actualmente se han caracterizado otras como sus funciones en el metabolismo y en el comportamiento (Bole-Feysot et al., 1998; Freeman et al., 2000). Una de las funciones más estudiada y más interesante a nivel de patologías, son las acciones que la PRL lleva a cabo en el crecimiento y desarrollo de diferentes órganos y tejidos. Se ha demostrado que la PRL es capaz de incrementar las ratios proliferativas de distintos tipos celulares y tejidos, así como aumentar y potenciar el crecimiento tumoral. También es importante mencionar las acciones de la PRL en la inmunorregulación, ya que inhibe la apoptosis de los linfocitos e incrementa los rechazos en trasplantes, entre otras (Bole-Feysot et al., 1998).

1.2.3. Formas y modificaciones

En el genoma humano, la PRL se codifica desde un único gen situado en el cromosoma 6 y formado por 5 exones y 4 intrones, con un tamaño de 10kb. La

transcripción de esta hormona está regulada por dos promotores independientes: uno de ellos controla la expresión de la PRL pituitaria, mientras que el otro regula la expresión extrapituitaria (Freeman et al., 2000; Gregerson, 2006).

Aunque la PRL mayoritaria se encuentra en su forma de 23kDa, existen diversas variantes en circulación producto de modificaciones pre- y post-traduccionales.

El **empalme o *splicing* alternativo** y la **escisión proteolítica** son las modificaciones menos frecuentes y tienen lugar en la glándula pituitaria y en el hipotálamo (Sinha, 1995).

La **dimerización, polimerización y formación de agregados con proteínas de unión** generan una molécula de 100kDa, la macroprolactina (Sinha, 1995). Las cantidades presentes en el organismo son muy bajas en condiciones normales y sólo se ven incrementadas en patologías como las hiperprolactinemias (Cavaco et al., 1995).

La **fosforilación** tiene lugar en las vesículas secretoras de las células lactotropas, justo antes de la exocitosis (Greenan et al., 1989). Una vez fosforilada, la PRL tiene una menor actividad biológica, suprime la secreción de PRL no fosforilada y actúa como antagonista de las vías de señalización activadas por la PRL no fosforilada, así como de los procesos proliferativos de las células Nb2 de linfoma de rata, una línea celular dependiente de PRL para poder proliferar (Coss et al., 1999).

La **glicosilación** de la PRL tiene lugar en la glándula pituitaria y, además de disminuir su actividad biológica, disminuye la capacidad de unión al receptor y la reactividad inmunológica (Gregerson, 2006).

1.3. Receptor de Prolactina

El receptor de prolactina (PRLR) pertenece a los receptores transmembrana de clase I, ya que sólo cruza la membrana una única vez, y a la familia de los receptores de tirosina quinasa debido a su actividad (Abramicheva & Smirnova, 2019; Brooks, 2012). Puede sufrir modificaciones dando lugar a diferentes isoformas estructuralmente distintas y que señalizan de manera diferencial (Brooks, 2012; Clevenge & Kline, 2001).

La unión del PRLR con su ligando, la prolactina, genera un complejo heterodimérico que induce un cambio conformacional en el dominio extracelular que se transmite al dominio intracitoplasmático, permitiendo la transducción de señal y la consiguiente activación de las distintas vías de señalización (Brooks, 2012).

1.3.1. Situación en el genoma y estímulo de la expresión

En el genoma humano, el gen del PRLR se encuentra localizado en el cromosoma 5 y está constituido por 11 exones. La expresión del gen está iniciada por la acción de tres promotores diferentes que controlan exones específicos (PI, PII y PIII) (Abramicheva & Smirnova, 2019). Mientras que el promotor PI y el PII son específicos de las gónadas e hígado, respectivamente (Hu et al., 1996), el PIII está activo en todos los tejidos sensibles a PRL (Hu et al., 1999). Los promotores y, por lo tanto, la estimulación de la expresión del receptor, está afectada por diferentes factores como el estradiol, los receptores de estrógenos α ($ER\alpha$, del inglés *Estrogen Receptor*) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF, del inglés *Epidermic Growth Factor*):

El **estradiol** estimula la expresión de PRLR en el contexto de líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7 y T47D) (Leondires et al., 2002).

La **unión de $ER\alpha$ a C/EBP β** (del inglés *CCAAT/enhancer-binding protein beta*) estimula específicamente el promotor PIII (Hu et al., 1999).

El **EGF** estimula la expresión de PRLR por sí sólo o desencadenando la cascada de señalización de MAPK/MEK y PI3K, que fosforilarán y activarán $ER\alpha$, promoviendo la expresión del receptor (Kavarthapu & Dufau, 2016).

1.3.2. Estructura

El PRLR está formado por tres componentes distintos: el dominio extracelular, transmembrana e intracitoplasmático (Cleveng & Kline, 2001).

La función principal del **dominio extracelular** es la unión del ligando. Presenta homología con los receptores de la familia de las citoquinas y está formado por dos subdominios que poseen motivos fibronectina-*like* tipo III: el S1, en la región amino-terminal, y el S2, situado en la región proximal a la membrana. Existen dos puentes disulfuro en el dominio S1 y un motivo WS en el dominio S2 críticos para el plegamiento y movilización del receptor. Además, S1 y S2 forman un complejo con una elevada afinidad por el ligando (Abramicheva & Smirnova, 2019; Bouilly et al., 2012; Cleveng & Kline, 2001).

El **dominio transmembrana** cruza una única vez la membrana celular y es predominantemente hidrofóbico. Se desconoce si tienen una función concreta en la señalización, pero hay alguna evidencia que ayuda a la dimerización del receptor (Abramicheva & Smirnova, 2019; Bouilly et al., 2012; Cleveng & Kline, 2001).

El **dominio intracitoplasmático** lleva a cabo la transducción de señal y, debido a modificaciones, genera distintas variantes o isoformas del receptor (Cleveng & Kline, 2001).

1.3.3. Activación

En humanos, el PRLR puede ser activado por PRL, por la hormona del crecimiento (GH, del inglés *Growth Hormone*) y por el lactógeno placentario. Aunque todos pueden actuar en el rango nanomolar, es importante mencionar que la GH se encuentra en un rango 10 veces inferior a la PRL y que el lactógeno placentario sólo se produce durante el embarazo, sugiriendo que la mayor activación del receptor viene dada por su ligando natural, la PRL (Goffin & Touraine, 2015).

La activación del receptor tiene lugar cuando los dominios extracelulares de dos moléculas de PRLR interaccionan con dos sitios de unión asimétricos del ligando (**Figura 4**). En primer lugar, la PRL se une a una molécula del PRLR, en la zona S1 y S2, también conocida como *site 1*, que posee una elevada afinidad por el ligando.

Seguidamente, la PRL ya unida a la primera molécula de PRLR, se une a una segunda molécula del receptor, en el *site 2*, que ha incrementado su afinidad. Una vez tenemos el complejo dimérico del PRLR unido a una molécula de PRL, se inicia la transducción de señal, que activará el transductor de señal Janus Quinasa 2 (Jak2) y el factor de transcripción Stat, así como la proteína quinasa mitogénica activadora (MAPK, del inglés *Mitogen-Activated Protein Kinase*) y las vías de señalización fosfoinositol 3-quinasa (PI3K), entre otras (Maria Diakonova, 2014).

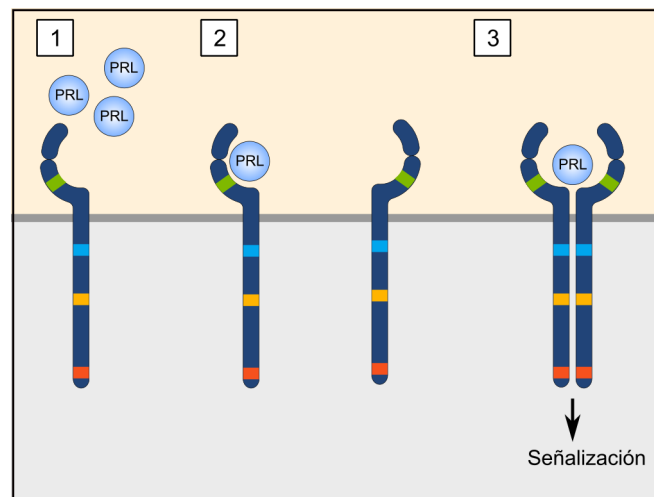


Figura 4. Heterodimerización de PRLR por unión del ligando PRL.

1.3.4. Distribución y regulación

El PRLR se encuentra en muchos tejidos, pero presenta una expresión más elevada en el hígado, la glándula mamaria y adrenal y el hipotálamo. Existen tejidos que sólo expresan una de las isoformas, mientras que se ha observado la coexpresión de varias isoformas en otros, teniendo un papel importante en el desarrollo de estos, como es el caso de los folículos del ovario (Bouilly et al., 2012).

La distribución de los receptores de prolactina es tan amplia que proponer una visión general de su regulación presenta muchas dificultades (Bole-Feysot et al., 1998). Aun así, a nivel general, la expresión del receptor está modulada por los niveles circulantes de PRL y otras hormonas, como las esteroideas, que pueden incrementar o suprimir la expresión dependiendo del contexto celular y de las condiciones fisiológicas. La PRL también es capaz de inducir degradación proteolítica del PRLR a través de procesos de ubiquitinación (Swaminathan et al., 2008). Se ha descrito que los

lisosomas son los encargados que degradar el PRLR una vez que la señalización ha sido iniciada promoviendo la ubiquitinación, internalización y degradación del receptor (Bouilly et al., 2012).

1.3.5. Isoformas

Las modificaciones transcripcionales, como el *splicing* alternativo, o post-traduccionales, como la proteólisis, generan diferentes isoformas del PRLR clasificadas por la longitud del dominio intracitoplasmático, ya que es la única estructura que se ve afectada (Abramicheva & Smirnova, 2019; Clevenge & Kline, 2001) (**Figura 5**). Aun así, algunos autores defienden que las diferencias también se pueden encontrar en el dominio extracelular (Brooks, 2012). En humanos se han observado hasta 6 isoformas diferentes: larga (80-90kDa), intermedia (50kDa), $\Delta S1$ y $\Delta S2$ (70kDa), corta 1a (56kDa), corta 1b (42kDa) y soluble (32kDa) (Cleveng & Kline, 2001). Las diferentes isoformas tienen importancia a nivel de patologías, ya que se encuentran expresadas de manera diferencial en células normales y tumorales y tienen funciones biológicas específicas. Por ejemplo, la coexpresión de la isoforma larga con la corta inhibe la respuesta a PRL, sugiriendo que la isoforma corta podría actuar como un dominante negativo y tener un papel protector contra la sobreestimulación de PRL (Hu et al., 2001).

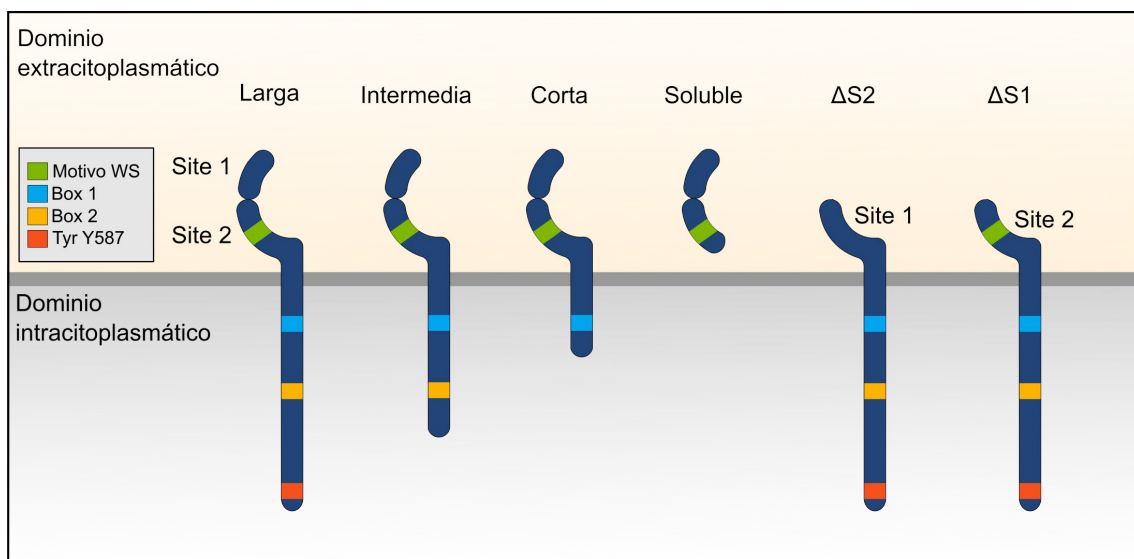


Figura 5. Estructura de las diferentes isoformas de PRLR.

1.3.5.1. Isoforma larga

La isoforma larga del PRLR fue clonada por primera vez en 1989, tiene un peso aproximado de 80-90kDa y es la isoforma que tiene el papel principal en la señalización de PRL (Boutin et al., 1989; Clevenge & Kline, 2001). Transfectando la isoforma larga en líneas celulares se ha observado que el receptor está implicado en procesos proliferativos y de supervivencia celular. Además, su expresión está asociada a fenotipos más diferenciados (Clevence & Kline, 2001).

Estructura

En la zona más proximal de la membrana de la región intracitoplasmática encontramos las estructuras Box 1 y Box 2, que presentan una elevada homología entre los receptores de citoquinas. El Box 1 es una región hidrofóbica, con una zona muy rica en prolina que se asemeja a un dominio SH3 y permite la interacción con Jak2. Por otro lado, el dominio Box 2 está menos estudiado y, aunque se sabe que es hidrofóbico y ácido, se desconoce su función (Bouilly et al., 2012; Clevenge & Kline, 2001). Contiene un total de 10 residuos de tirosina donde destaca el más C-terminal (Y587) que contribuye a la unión de los dominios SH2 de proteínas transductoras de señal, como los Stats (Clevence & Kline, 2001).

Señalización

La unión de la PRL a la isoforma larga del receptor promueve la activación de varias quinasas como Jak2, MAPK, PI3K y Src, entre otras (Abramicheva & Smirnova, 2019; Maria Diakonova, 2014) (**Figura 6**).

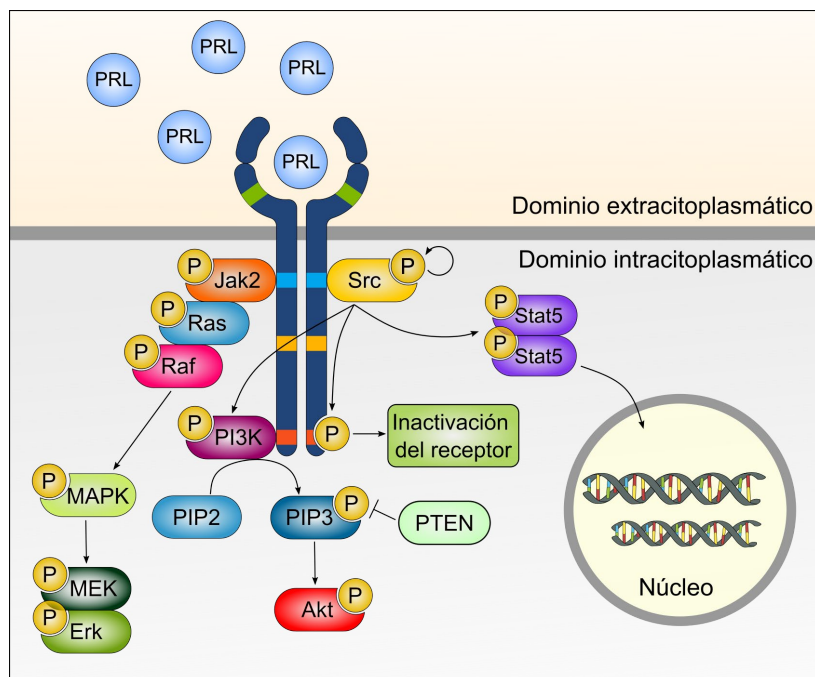


Figura 6. Vías de señalización activadas por PRLR.

a) Jak/Stat

La familia de proteínas Jak está formada por varios elementos (Jak1, Jak2, Jak3 y Tyr2) y se caracterizan por tener una activación muy rápida posterior a la activación del receptor de citoquinas al que están asociadas. Las proteínas Jak, principalmente Jak2, tienen un papel crucial en la señalización del PRLR, ya que la pérdida de Jak2 impide la señalización y la subsecuente activación de genes. Además, aunque Jak1 y Jak2 son capaces de interactuar con el PRLR, sólo Jak2 es imprescindible para la transducción de señal, por lo que este apartado se centrará únicamente en Jak2 (Cleveng & Kline, 2001) **(Figura 7)**.

Las proteínas Stat tienen un papel fundamental en la proliferación, supervivencia celular y respuesta inmune. Todas las proteínas de esta familia tienen estructuras comunes como son el dominio de unión al ADN, el dominio SH3-like y SH2 y el dominio de transactivación C-terminal. Además, todas poseen residuos de tirosina que pueden ser fosforilados por las proteínas Jak. Jak2, principalmente, une la proteína Stat5, que puede presentar dos isoformas con funciones específicas. Si nos centramos en la señalización mediada por la PRL, Stat5a tiene un papel principal, promoviendo la diferenciación de algunos tejidos, como es el caso del tejido epitelial de la glándula mamaria. Por otro lado, Stat5b se encarga del mantenimiento del dimorfismo sexual

durante el crecimiento, de la expresión de genes del hígado y está asociado a algunas funciones inmunitarias. Además, lleva a cabo el *feedback* negativo que inicia la señalización de PRL en el hipotálamo (Abramicheva & Smirnova, 2019).

Jak2 se encuentra constitutivamente acoplado a la región proximal de la membrana celular del dominio intracitoplasmático del PRLR, el Box 1, aunque es necesario un cambio conformacional en el receptor para activarlo. Cuando se produce la dimerización del receptor por acción de la unión de la PRL en el dominio extracelular, diversas moléculas quinasa asociadas fosforilan residuos tirosina de Jak2 y del PRLR. Esto promueve la unión de los factores de transcripción Stat (principalmente Stat5a/b, Stat1 y Stat3) al dominio C-terminal del receptor mediante el dominio SH2, que serán fosforilados por Jak2, permitiendo la asociación de Stat a otra molécula Stat formando homo- o heterodímeros. Cabe destacar que algunos estudios defienden que la unión de Stat5 puede ocurrir directamente con Jak2, formando el complejo PRLR/Jak2/Stat5. La asociación de Stats se disocia del elemento al que esté unido y se transloca al núcleo de la célula, uniéndose al ADN y regulando la activación de promotores con elementos sensibles a interferón γ (GAS) (Bouilly et al., 2012; Clevenge & Kline, 2001). El reclutamiento de Stat es tres veces más rápido que la activación de la cascada de MAPK, ya que esta última requiere una interacción proteína-proteína mayor (Clevence & Kline, 2001).

La vía de señalización PRLR/Jak2/Stat está altamente regulada por diferentes factores, donde destacan la participación de las proteínas supresoras de la señalización de citoquinas (SOCS) y la familia de proteínas inhibidoras de Stats activos (PIAS), que se detallan seguidamente.

Las proteínas SOCS están expresadas en las células sensibles a PRL y son las encargadas de modular la señalización de Jak/Stat activada por el PRLR. Dentro de las proteínas SOCS encontramos diferentes variantes (de SOCS1 a SOCS7 y CIS) que tienen un dominio SOCS box común formado por un dominio C-terminal y un dominio SH2, imprescindible para la interacción con residuos fosforilados de tirosina quinasa de receptores de citoquinas. SOCS1 y SOCS3 se encuentran expresados de manera transitoria, mientras que SOCS2 y CIS aumentan su expresión 24h después

de la activación del PRLR debido a la PRL. SOCS1, SOCS3 y CIS inhiben la cascada de señalización activada por PRLR y su expresión está incrementada por la presencia de Stat en el núcleo, ya que contienen promotores con sitios de unión a Stat. SOCS1 y SOCS3 se asocian al complejo PRLR/Jak2 gracias al dominio SH2 e inhiben la fosforilación de Jak2, suprimiendo su actividad catalítica. Aunque se ha descrito que la afinidad de SOCS3 por Jak2 es menor que la de SOCS1, las dos proteínas tienen actividad inhibitoria sobre Jak2. CIS, en cambio, se une al residuo de tirosina fosforilado del PRLR más próximo al punto de unión con Stat, evitando la interacción del factor de transcripción con el receptor. SOCS2 tiene la capacidad de unirse directamente al receptor y, aunque se desconoce el mecanismo mediante el que actúa, se ha observado que inhibe a SOCS1, sin afectar a SOCS3, recuperando la actividad de Jak2 (Alexander & Hilton, 2004; Howard & Flier, 2006).

La familia de proteínas PIAS está formada por PIAS1, PIAS2, PIAS3 y PIAS4, que se encuentran localizadas en el núcleo celular, donde regulan la actividad de diversos factores de transcripción como Stats, NF κ B (factor nuclear κ B) y el factor supresor tumoral p53, entre otros, mediante diversos mecanismos (Abramicheva & Smirnova, 2019; Shuai, 2006). Se ha observado que en las células Nb2 de rata, PIAS3 suprime la cascada de Stat5 iniciada por la isoforma larga del PRLR uniéndose al dominio de ADN específico de Stat5. Esta interacción se hace mediante el dominio N-terminal, que se encuentra presente en células de cáncer de mama (Abramicheva & Smirnova, 2019).

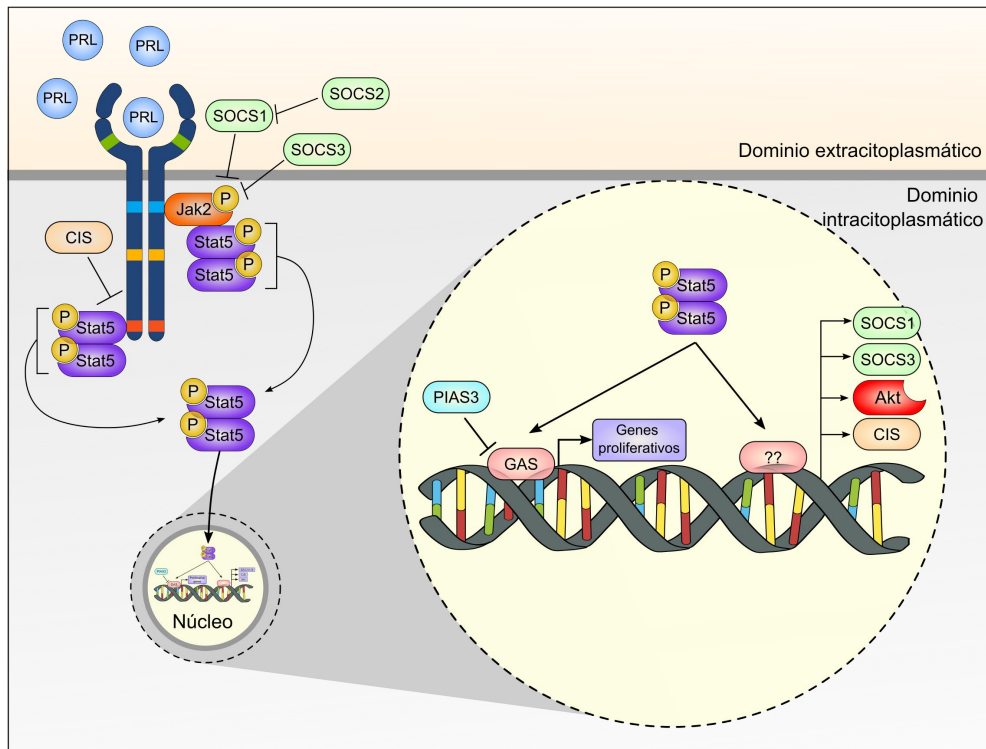


Figura 7. Vía de señalización de PRLR en relación con Jak2/Stat5 y sus acciones a nivel nuclear.

b) MAPK/Erk

La vía de señalización MAPK/Erk puede ser activada mediante la estimulación de la isoforma larga y corta del PRLR. Está iniciada por una cascada de quinasas de tres niveles, donde diferentes MAPK se fosforilan y se activan, fosforilando otra molécula MAPK. El interés de esta vía de señalización reside en la relación que tiene la activación de Erk en el desarrollo de varios tipos de cáncer (Maria Diakonova, 2014). Mediante estudios inhibiendo el PRLR con antagonistas de PRL se ha observado la supresión de la señalización de MAPK, disminuyendo la proliferación celular y dando evidencia de la activación de esta vía en las células sensibles a prolactina (Abramicheva & Smirnova, 2019).

Como se ha comentado en el apartado anterior, Jak2 se encuentra constitutivamente asociado al dominio intracitoplasmático del PRLR y su fosforilación, causada por la unión del ligando al receptor y su dimerización, recluta proteínas adaptadoras como Shc, Grb2 y SOS, donde el dominio SH2 y SH3 de estas proteínas y el dominio C-terminal del PRLR juegan un papel importante (Abramicheva & Smirnova, 2019). Estas proteínas permiten la asociación de GTPasa Ras, que recluta, fosforila y activa

Raf, que realiza la misma acción sobre MEK y, finalmente, se promueve la activación de Erk, que fosforila y activa proteínas efectoras y factores de transcripción como Myc, Jun y TCF (Clevenger & Kline, 2001).

La activación de la cascada de MAPK/MEK/Erk promueve la progresión del ciclo celular, así como la proliferación, diferenciación y apoptosis de las células (Clevenger et al., 1998; Maria Diakonova, 2014). Aun así, se ha observado que la respuesta celular mediada por la cascada de MAPK está dictaminada por la duración de la señalización y puede variar en función del contexto celular, de manera que existen diferentes efectos asociados a esta cascada (Clevenger & Kline, 2001).

c) PI3K/Akt

Las PI3K pertenecen a la familia de las quinasas lipídicas (Clevenger & Kline, 2001) y su activación promueve la supervivencia celular, la progresión del ciclo celular, la proliferación y el crecimiento celular (Abramicheva & Smirnova, 2019; Clevenger & Kline, 2001). Igual que ocurre con las vías de señalización explicadas anteriormente, su importancia a nivel patológico reside en el papel de la vía en la carcinogénesis, ya que una sobreexpresión de la vía no es suficiente para iniciar un proceso tumoral, pero sí que acelera el proceso en las células sensibles a PRL (Clevenger et al., 2009).

La cascada de PI3K/Akt se inicia con el cambio conformacional del PRLR debido a la unión del ligando. Este cambio conformacional junto con la fosforilación del mismo permite la interacción de la PI3K con el receptor gracias al dominio SH2 y SH3 y a la ayuda de proteínas acopladoras como Fyn o Ras. La unidad catalítica de la PI3K se activa alostéricamente y convierte el fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato (PIP₂) en fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP₃). Éste último puede unir Akt, que se fosforilará gracias a diferentes quinasas como PDK1 o mTOR2, activándola y permitiendo que actúe sobre diferentes dianas, activándolas (Kavarthapu & Dufau, 2016).

En un contexto tumoral, esta vía de señalización puede estar incrementada por la presencia de Stat5a en el núcleo de la célula. El factor de transcripción es capaz de unirse a la secuencia consenso de Akt, incrementando su expresión y generando más sustrato Akt para PIP₃, que la fosforilará y activará, promoviendo principalmente la

proliferación celular. Además, se ha observado en células de cáncer de mama que la activación de la vía es imprescindible para la progresión de la vía de MAPK durante la estimulación de PRL (Abramicheva & Smirnova, 2019).

Esta vía de señalización está regulada por PTEN (fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato 3-fosfatasa), que desfosforila PIP3 y regula negativamente la cascada, impidiendo la unión de Akt y la progresión de la transducción de señal (Cleveng & Kline, 2001)

d) Familia Src

La familia de proteínas protooncogénicas Src está formada por siete quinasas, cuatro de ellas (Src, Yes, Yrk y Fyn) expresadas en la mayoría de células del organismo y localizadas en la membrana celular, próximas a receptores transmembrana. La estructura SH es común en todas ellas, pero destaca la forma SH2, que permite la unión a proteínas fosforiladas en residuos de tirosina (Maria Diakonova, 2014). Están involucradas en vías de señalización que controlan la adhesión, migración, angiogénesis, supervivencia y diferenciación, entre otras (Abramicheva & Smirnova, 2019).

La observación de la interacción de las proteínas Src con el PRLR se hizo a la vez que la identificación de la asociación de PRLR/Jak2 en células Nb2 de linfoma de rata, demostrando el papel en la señalización mediada por el PRLR. Se observó que las diferentes isoformas del PRLR (larga, intermedia y corta) estaban asociadas constitutivamente a la proteína Fyn (p59^{Fyn}). Más adelante, se observó la interacción de la proteína Src (p60^{Src}) con el PRLR en hígado y tejido mamario (Cleveng & Kline, 2001; Maria Diakonova, 2014).

El mecanismo concreto de interacción entre PRLR y las proteínas Src se desconoce, pero dependiendo de la tirosina que sufra la fosforilación, la actividad que llevará a cabo será antagónica. Si se fosforila el dominio C-terminal (Y527) se induce la unión de una fosfotirosina gracias al dominio SH2 y la inactiva; en cambio, si se fosforila una tirosina interna mediante autofosforilación, la actividad quinasa de las Src se ve incrementada, permitiendo la transducción de señal uniando y activando elementos como la PI3K o los Stats, entre otros (Abramicheva & Smirnova, 2019). Dado que el PRLR puede interactuar de la misma manera con Jak2 y las proteínas Src, se ha

estudiado la posible interacción entre ellas. Aunque los resultados no han sido muy esclarecedores, parece ser que hay una interacción entre ellos, pero la activación de las Src y de Jak2 son independientes la una de la otra (Abramicheva & Smirnova, 2019; Clevenge & Kline, 2001).

1.3.5.2. Isoforma intermedia

La isoforma intermedia del PRLR fue identificada y clonada por primera vez en células de cáncer de mama T47D en 1999 (Kline et al., 1999). Tiene un peso aproximado de 50kDa debido a modificaciones que acortan el dominio intracitoplasmático y presenta diferencias funcionales en comparación con la isoforma larga (Clevence & Kline, 2001). La línea celular Nb2 de linfoma de rata codifica para la isoforma intermedia del PRLR y actúa como un potente mitógeno, efecto que no tiene en otras líneas celulares. La señalización vía Jak/Stat se encuentra activa, promoviendo la supervivencia celular pero sin tener ningún efecto proliferativo (Kline et al., 1999).

Estructura

El dominio extracelular, transmembrana e intracitoplasmático proximal a la membrana son idénticos a los explicados anteriormente en la isoforma larga, presentando los motivos Box 1 y Box 2. A diferencia de la isoforma larga, sólo posee los dominios tirosina próximos a la membrana celular y carece de la tirosina Y587 situada en el extremo C-terminal (Bole-Feysot et al., 1998; Kline et al., 1999).

Funciones

Una vez descrita la isoforma intermedia en células humanas, se observó que su afinidad por la PRL era la misma que la isoforma larga, aunque las funciones que desencadenaba eran diferentes. La activación de la isoforma intermedia no tiene ningún efecto proliferativo en las células, pero sí que está implicada en funciones osmorreguladoras y de inmunomodulación (Kline et al., 1999). Estas diferencias funcionales respecto a la isoforma larga pueden deberse a la ausencia del residuo C-terminal del dominio intracelular (Clevence & Kline, 2001; Kline et al., 1999). Este dominio podría ser clave para la activación total de receptor, incluyendo la activación de Jak2 y Fyn, y promoviendo las acciones mitogénicas clásicas del PRLR. Se ha

demostrado que la activación de la isoforma intermedia activa Jak2, pero no Fyn, que sí que se encuentra activado en las células Nb2 (que dependen totalmente de la PRL para proliferar) (Clevenger & Kline, 2001).

1.3.5.3. Isoforma corta

La isoforma corta del PRLR fue descrita en humanos y clonada en células en 2001 (Hu et al., 2001). Está generada por empalme alternativo de los exones 10 y 11 del gen del PRLR y su estructura está caracterizada por tener un dominio intracitoplasmático más corto en comparación con la isoforma larga del receptor. Cabe destacar que es una de las isoformas menos estudiada a nivel funcional (Abramicheva & Smirnova, 2019; Hu et al., 2001).

Estructura

Los cambios en el dominio intracitoplasmático hacen que el receptor carezca del dominio Box 2 y C-terminal clásico del PRLR, por lo tanto, no puede interactuar con el dominio SH2 de factores de transcripción como los Stats y le confiere un papel de dominante negativo, ya que inhibe la activación de los promotores que estimula la isoforma larga (Abramicheva & Smirnova, 2019; Hu et al., 2001). Aun así, dado que el dominio extracelular no ha sufrido ninguna modificación, posee la misma afinidad por el ligando que la isoforma larga (Hu et al., 2001).

En humanos la isoforma corta puede presentar dos variantes con estructura y función ligeramente distinta: la isoforma S1a y la isoforma S1b. La **isoforma S1a** se caracteriza por tener un dominio C-terminal único que le confiere funciones celulares y de señalización distintas a la isoforma larga, ampliando el rango de acción de la PRL. En cambio, la **isoforma S1b** tiene una función inhibitoria de las vías de señalización mayor que S1a y, básicamente, consiste en la asociación con una molécula de PRLR larga, que unirá el ligando sin promover la transducción de señal (Hu et al., 2001).

Funciones

Las dos isoformas cortas del PRLR tienen una distribución muy amplia en diferentes órganos y tejidos, hecho que da importancia a la función regulatoria que ejercen sobre la señalización de la isoforma larga. Además, aunque la función más destacada es la inhibición de la señalización y, por lo tanto, de la proliferación, como ocurre en las

células del ovario, se ha descrito que en otros tipos celulares promueve la activación de la vía de señalización de las MAPK asociadas a DUPD1 (proteína fosfatasa dual específica 1), aumentando la proliferación celular (Abramicheva & Smirnova, 2019; Hu et al., 2001).

La familia de los transductores de señal FOXO también está implicada en la señalización mediada por la isoforma corta. Esta familia de proteínas está formada, en mamíferos, por FOXO1, FOXO3 y FOXO4 y tienen un papel importante en la parada del ciclo celular, la apoptosis y las respuestas al estrés. Cabe destacar la importancia de FOXO3, que tiene un papel fundamental en el desarrollo de los folículos ováricos y promueve la transcripción de GALT (galactosa-1-fosfato uridiltransferasa) (Abramicheva & Smirnova, 2019; Halperin et al., 2008).

1.3.5.4. Isoforma soluble

La isoforma soluble del PRLR tiene un peso de 33kDa y se ha descubierto más recientemente (Tan et al., 2008).

Estructura

Debido a procesos de proteólisis celular, la isoforma soluble sólo está formada por un dominio extracelular libre que no está anclado a la membrana celular. Este cambio estructural hace imposible la señalización, aunque puede unirse al ligando en circulación. Se ha observado que puede actuar como un inhibidor *in vitro*, ya que une una tercera parte de la PRL circulante, dejando menos proteína disponible para la señalización (Ben-Jonathan et al., 2008; Clevenge & Kline, 2001).

Funciones

La inhibición de la señalización mediada por la isoforma soluble puede ocurrir de distintas maneras. Por un lado, disminuyendo la disponibilidad de PRL circulante, ya que la isoforma puede unirse eficientemente al ligando. También es capaz de unir GH, por lo que disminuye su disponibilidad para el receptor de GH. Por otro lado, una molécula de receptor soluble puede dimerizar con otra molécula de otra isoforma del PRLR, inhibiendo la señalización (Abramicheva & Smirnova, 2019; Clevenge & Kline, 2001). Asimismo, esta isoforma es capaz de incrementar el tiempo de circulación y la actividad biológica de la PRL (Abramicheva & Smirnova, 2019).

1.3.5.5. Isoforma $\Delta S1$ y $\Delta S2$

Las isoformas $\Delta S1$ y $\Delta S2$ son de reciente descubrimiento y su interés reside en la implicación en diferentes procesos tumorales (Abramicheva & Smirnova, 2019; Tan et al., 2008).

Estructura

El nombre de la isoforma viene dado por la carencia del dominio extracitoplasmático S1 y S2, mientras que el dominio intracitoplasmático es homólogo a la isoforma larga del receptor (Abramicheva & Smirnova, 2019; Clevenge & Kline, 2001). Se ha observado que las dos isoformas tienen una señalización más rápida que la isoforma larga, aunque la afinidad por el ligando es menor (Cleveng & Kline, 2001). La importancia de estas isoformas reside en su papel en el cáncer de próstata y de mama, aunque también se encuentra en células normales de éstos tejidos, así como en células endoteliales (Abramicheva & Smirnova, 2019).

1.4. La señalización del PRLR en cáncer

1.4.1. PRL y cáncer

Se ha observado que la producción de PRL está alterada en algunos tejidos patogénicos, estando también relacionada con la presencia de algunos tipos de cáncer. Por lo tanto, no es sorprendente que su regulación suscite interés (Goffin & Touraine, 2015).

1.4.1.1. Inhibidores de PRL

Como se ha comentado anteriormente, la PRL pituitaria está regulada negativamente por las acciones de la dopamina (Freeman et al., 2000). El primer inhibidor de las acciones de la dopamina fue la bromocriptina y durante más de tres décadas se ha usado como tratamiento para los prolactinomas (Neidhart, 1997). Actualmente, existen otros inhibidores con eficacia demostrada para inhibir la producción de PRL en la glándula pituitaria y, por lo tanto, disminuir sus niveles circulantes, como la cabergolina, la pergolida y la quinagolida (Gillam et al., 2006).

Aunque este mecanismo de control de la PRL circulante parecía muy prometedor, tiene algunas limitaciones, como los efectos secundarios relacionados con el tratamiento (Gillam et al., 2006) y la premisa de que la producción de PRL no está limitada a la glándula pituitaria (Marano & Ben-Jonathan, 2014). Por lo tanto, el consenso actual defiende que la dopamina y sus agonistas son incapaces de regular la producción total de PRL, haciendo más relevante dirigir las terapias al PRLR (Goffin & Touraine, 2015).

1.4.2. PRLR y cáncer

Los modelos experimentales para determinar la eficacia antitumoral de los compuestos anti-PRLR es compleja. Uno de los estándares de oro de la validación de fármacos en oncología involucra xenotrasplantes de células humanas tumorales en modelos de ratón inmunocomprometido (Goffin & Touraine, 2015). Cuando aplicamos estos modelos al campo de la PRL y su receptor, nos encontramos con varias limitaciones debidas, sobre todo, a la incompatibilidad interespecie. Primero, el PRLR humano no presenta sensibilidad a la PRL no humana, incluida la de ratón, haciendo que el efecto fisiológico de la estimulación por PRL endocrina no se pueda

observar, dificultando el diseño y la interpretación de los modelos animales (Utama et al., 2009). Segundo, la producción de PRL extrapituitaria es más difícil de detectar en células humanas inmortalizadas, haciendo que en un modelo de xenotrasplante, el entorno carezca de PRL endocrina y autocrina, disminuyendo los efectos de los fármacos anti-PRLR (Goffin & Touraine, 2015; Nitze et al., 2013). Por último, actualmente no existe ninguna línea celular, a excepción de la Nb2 de linfoma de rata, que sea dependiente de PRL para su crecimiento (Goffin & Touraine, 2015). Un intento de mejorar los modelos de ratón para estudiar el efecto de los fármacos anti-PRLR lo encontramos publicado recientemente, ya que se ha establecido una cepa de ratón, mediante una estrategia *knock-in*, que expresa PRL humana en lugar de ratón. Esto podría ayudar a resolver algunos problemas relacionados con la incompatibilidad interespecie (Christensen et al., 2013).

Aunque los modelos experimentales para estudiar el PRLR y su ligando no sean los más idóneos, se han utilizado para probar la eficacia de distintos fármacos bloqueantes de la señalización con buenos resultados en varios tipos de cáncer como el cáncer de pecho, ovario y próstata, así como tumores gastrointestinales (Goffin & Touraine, 2015).

Para el proyecto que se está presentando, es importante mencionar que, recientemente, se ha vuelto a prestar atención a la relación entre el PRLR y el sistema hematopoyético. Aunque la implicación de la PRL en la regulación del sistema hematopoyético e inmunitario ya se describió hace varias décadas (Clevenger et al., 1998), un estudio epidemiológico reciente ha identificado las neoplasias hematológicas en mujeres como el segundo tipo de cáncer más frecuente (Berinder et al., 2011). Estos datos hacen que el estudio de PRLR y PRL en LMA y otras neoplasias hematológicas sea de gran interés.

A lo largo de los años, han surgido diferentes estrategias centradas en inhibir el PRLR mediante distintos mecanismos. A continuación, se explican algunos de ellos.

1.4.2.1. Antagonistas del PRLR

En el 1996, el laboratorio de Goffin produjo el primer antagonista del PRLR a partir de una variante de la PRL humana y conocido como G129R-hPRL. Contenía una

mutación (sustituyeron la Gly129 por una Arg) que disminuía la afinidad por el lugar de unión *site 2* del PRLR, formando un homodímero incapaz de iniciar la señalización (Goffin et al., 1996). Debido a que conservaba trazas de acción agonística, el mismo laboratorio modificó la molécula delecionando los 9 últimos aminoácidos del extremo N-terminal y desarrolló el del-1-9-G129R-hPRL (Bernichtein et al., 2003). Paralelamente, se desarrollaron antagonistas similares como combinaciones de G129R-hPRL con proteínas funcionales (Goffin & Touraine, 2015) y moléculas mímicas de la hPRL fosforilada (S179D-PRL), un antagonista competitivo (Walker, 2007). Aun así, la mayoría de antagonistas que se encuentran en estudio tienen una afinidad por el receptor muy inferior al ligando natural (Goffin & Touraine, 2015).

1.4.2.2. Anticuerpos neutralizantes del PRLR

Los anticuerpos monoclonales tienen una ventaja clara sobre los antagonistas: tienen una vida media más duradera debido a su mayor tamaño, aunque esto conlleva una mayor dificultad para la eliminación vía renal (Goffin & Touraine, 2015). Actualmente existen dos estudios con anticuerpos dirigidos contra PRLR y que disminuyen la actividad inducida por PRL: LFA102, aunque al finalizar la Fase I del ensayo clínico se ha observado que presenta toxicidad tolerable por los pacientes, pero no ejerce actividad antitumoral (Minami et al., 2020); y Mat3, que se ha descartado debido a su toxicidad (Otto et al., 2015).

1.4.2.3. Pequeñas moléculas inhibitoras

Las moléculas pequeñas suelen tener afinidad en el rango de micromolar, mientras que la PRL está en el rango nanomolar. Igualmente, esto se compensa con la fácil producción de estas moléculas (Goffin & Touraine, 2015). Aun así, dirigir los tratamientos directamente contra PRLR con moléculas pequeñas no ha sido una prioridad del desarrollo de fármacos. Recientemente, desde el laboratorio de Ben-Jonathan se ha propuesto el uso de la molécula pequeña SMI-6 (del inglés *Small Molecule Inhibitor-6*) como tratamiento efectivo contra el cáncer de mama bloqueando el PRLR, aunque está en fases muy tempranas (Borcherding et al., 2021).

La presencia de PRL y su receptor en el contexto tumoral ha suscitado interés en su estudio y su posible uso como diana terapéutica, aunque, como se ha comentado, a día de hoy no se dispone de un mecanismo específico para inhibir la señalización de manera eficaz. Aun así, sigue siendo una diana terapéutica de interés para combatir diferentes procesos tumorales.

1.5. Senescencia

Uno de los grandes paradigmas de la biología celular era que las células cultivadas *in vivo* en condiciones óptimas podían replicarse indefinidamente. Esta premisa cambió en la década de los 90, cuando Hayflick y Moorhead observaron que los fibroblastos en cultivo tenían una capacidad finita de replicación y, llegado ese momento, entraban en un estado irreversible de parada del ciclo celular conocido como senescencia o límite de Hayflick (Hayflick & Moorhead, 1961). Más adelante se relacionó este proceso con el acortamiento de los telómeros de los cromosomas y el consecuente envejecimiento y disfunción del organismo (Hayflick, 1965). Actualmente, este proceso se conoce como **senescencia celular** y se entiende como una etapa en que las células han llegado al límite de su capacidad proliferativa y no pueden seguir duplicándose. Estas células se caracterizan por presentar morfología alargada, granulosis citoplasmática y cambios estructurales en la cromatina; además, aunque son metabólicamente activas, son incapaces de responder a estímulos proliferativos y apoptóticos (Di Micco et al., 2021). Paralelamente, en la década de los 90 se describió un proceso muy similar, pero con ligeras diferencias: la **senescencia prematura**, caracterizada por una senescencia inducida por un incremento en la señalización oncogénica, tratamientos con agentes diferenciadores y con dosis bajas de agentes citotóxicos, una pérdida de la capacidad supresora tumoral o una replicación aberrante y descontrolada del ADN que lleva a errores en las secuencias (Di Micco et al., 2006; Serrano et al., 1997), presentando efectos beneficiosos para el correcto funcionamiento de los organismos y tejidos (Cosme-Blanco et al., 2007). Más recientemente, se ha observado que el proceso de senescencia prematura es reversible. Al retirar el agente que ha producido la entrada en senescencia y el arresto del ciclo celular, una parte de las células morirán por catástrofe mitótica, mientras que otras saldrán del estado senescente y continuarán proliferando con normalidad (Duy et al., 2021). El término catástrofe mitótica tiene varias definiciones, pero, a grandes rasgos, es una muerte celular producida durante la mitosis debido a la combinación de puntos de control mitóticos (*checkpoints*) deficientes y daño en el ADN (Castedo et al., 2004).

1.5.1. Mecanismos de entrada en senescencia

Las señales que llevan a la célula a entrar en senescencia son diversas, pero una de las claves para la entrada es el daño producido en el ADN, que inicia la respuesta al daño en el ADN (DDR, del inglés *DNA Damage Response*). Este mecanismo bloquea el progreso del ciclo celular y previene la propagación de los daños (Di Micco et al., 2021). Teniendo en cuenta esta premisa, podemos diferenciar tres vías para estimular la entrada a la senescencia: el **acortamiento de los telómeros**, la **respuesta al daño en el ADN (DDR)** y la **activación de oncogenes (Figura 8)**.

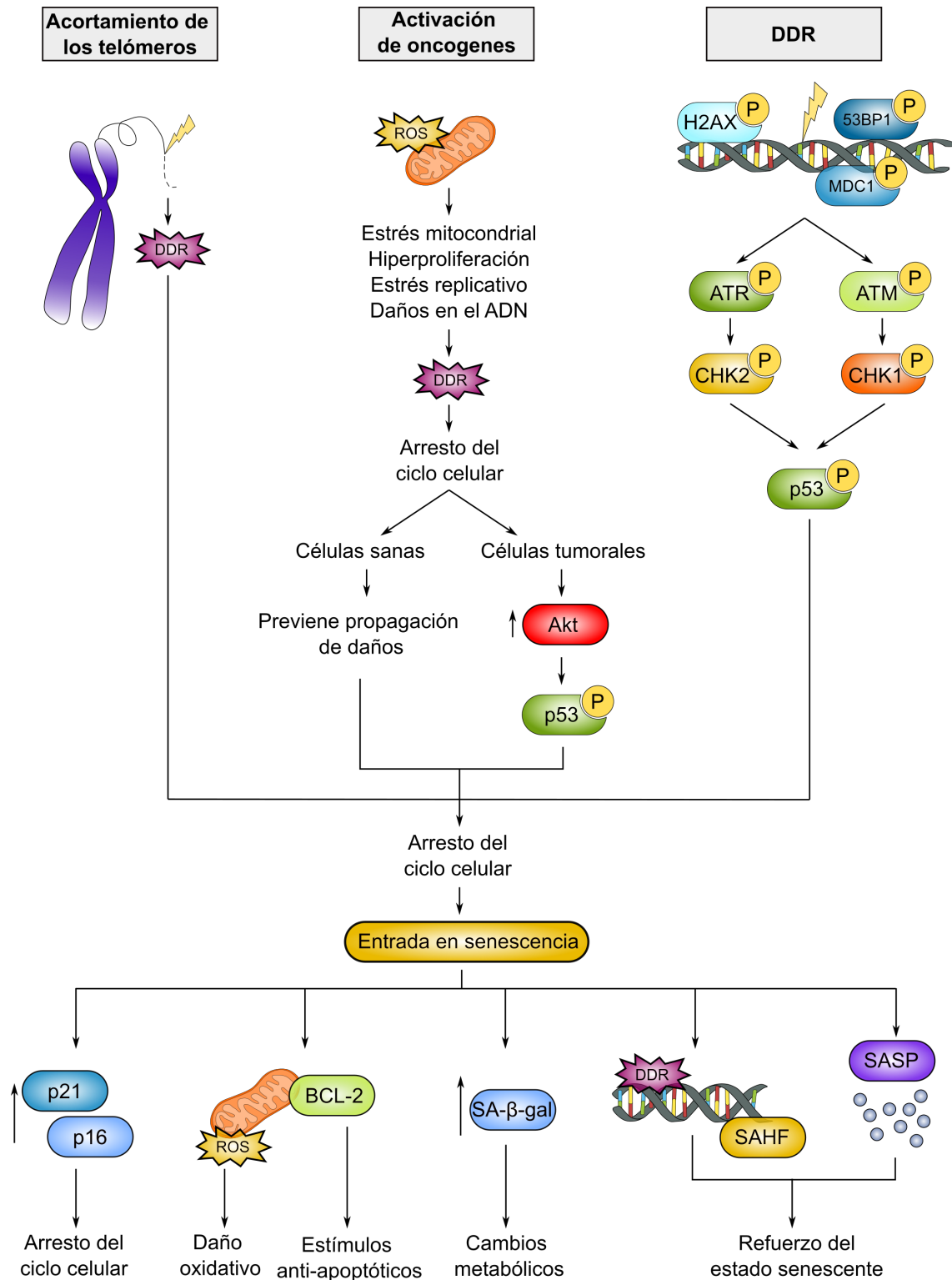


Figura 8. Señales celulares que promueven la entrada en senescencia y los cambios fenotípicos que este proceso conlleva. DDR, respuesta a daños en el ADN; ROS, especies reactivas del oxígeno; ATM, *Ataxia Telangiectasia Mutated*; ATR, *ATM and Rad3-related*; SA-β-gal, β-galactosidasa; SAHF, condensaciones de heterocromatina asociadas a la senescencia; SASP, fenotipo secretor asociado a senescencia.

1.5.1.1. Acortamiento de telómeros

El envejecimiento va asociado a la pérdida de los extremos cromosómicos, los telómeros. Este mecanismo genera una respuesta a daño en el ADN (DDR) que induce la parada del ciclo celular y el fenotipo clásico de la senescencia (Di Micco et al., 2021).

1.5.1.2. Respuesta al daño en el ADN

Los daños en el ADN activan una cascada de señalización iniciada por la fosforilación de la histona H2AX, así como de proteínas asociadas (53BP1 y MDC1). Esto genera una activación por fosforilación de ATM (del inglés *Ataxia Telangiectasia Mutated*) y ATR (del inglés *ATM and Rad3-related*) (Jackson & Bartek, 2009) que, a su vez, fosforilan y activan CHK2 y CHK1, respectivamente. Finalmente, las dos vías convergen en la activación por fosforilación de p53, que permite a la célula iniciar la entrada a senescencia gracias a la inhibición de p21, esencial para mantener la parada del ciclo celular (Di Micco et al., 2021). La inhibición de las quinasas de la señalización DDR permiten a las células senescentes salir de ese estado y volver a entrar en el ciclo celular (Di Micco et al., 2021).

1.5.1.3. Activación de oncogenes

La senescencia inducida oncogénicamente (OIS, del inglés *Oncogenic-Induced Senescence*) tiene dos fines completamente distintos. Por un lado, la activación de oncogenes produce estrés mitocondrial, hiperproliferación celular, estrés replicativo y daños en el ADN en las regiones más frágiles. Todo esto lleva a la activación de las vías DDR, promoviendo la parada del ciclo celular y, por ende, la senescencia asociada a mecanismos supresores de tumores (Astle et al., 2012; Di Micco et al., 2021). Por otro lado, la OIS puede ser un proceso reversible, sobre todo para células tumorales que han sido afectadas por tratamientos citotóxicos a dosis bajas y por agentes diferenciadores. Las células entran en estado de senescencia para evitar iniciar procesos apoptóticos, suprimidos es ese estado, y suponiendo una ventaja para los procesos tumorales (Duy et al., 2021). Una vía de señalización a destacar es la PI3K-Akt, que promueve la OIS dependiente de p53 (Astle et al., 2012).

1.5.2. Mecanismos de mantenimiento en senescencia

Una vez la célula ha sufrido la parada del ciclo celular y la consecuente entrada en senescencia, suceden varios cambios que ayudan a permanecer en ese estado como cambios morfológicos; prolongación del arresto del ciclo celular gracias al incremento de p21 y p16; daño oxidativo producido por un incremento de los niveles de ROS (especies reactivas del oxígeno) dentro de la célula; resistencia a apoptosis gracias al incremento de proteínas antiapoptóticas de la familia BCL-2; cambios metabólicos como la acumulación de β -galactosidasa (SA- β -gal), utilizada como marcador del estado senescente de las células; condensaciones de heterocromatina asociadas a la senescencia (SAHF, del inglés *Senescence-Associated Heterochromatin Foci*); y el fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP, del inglés *Senescence-Associated Secretory Phenotype*) (Di Micco et al., 2021). El SASP, aunque presenta diferencias según el tipo celular y el estímulo que ha llevado a la senescencia, es un programa caracterizado por citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento y proteasas de la matriz extracelular que refuerzan la senescencia o afectan al entorno celular de las células senescentes (Di Micco et al., 2021). La vía de señalización de Jak/Stat3 activa factores relacionados con SASP con propiedades inmunosupresoras en modelos de senescencia inducidos por la pérdida de PTEN. Los inhibidores de Jak/Stat son efectivos reprogramando SASP para incrementar los efectos de la quimioterapia (Toso et al., 2014).

Todas las vías de activación de la senescencia convergen en la activación de las vías de DDR y, por lo tanto, en la activación de p53. Esta molécula se encarga, principalmente, de la regulación de la reparación de ADN, de la detención del ciclo celular y de la consecuente entrada en senescencia mediante la inhibición de p21, impidiendo la progresión del ciclo celular y, por lo tanto, deteniendo la proliferación. La activación de p53 también promueve la entrada en apoptosis, de manera que las señales que llevan a una célula a entrar en senescencia también podrían inducir la apoptosis; la elección entre las dos vías no está clara actualmente, pero parece depender de la intensidad y duración del estímulo inicial, la naturaleza del daño y el tipo celular (Childs et al., 2014). Dado que las dos vías convergen en p53, los niveles de esta proteína determinarían la dirección que tomaría la célula (Kirschner et al., 2015).

2. Objetivos

La realización de un cribado *in silico* por el grupo de investigación ha revelado que la inhibición de la secreción de PRL potenciaría la diferenciación terminal de las células leucémicas, uno de los tratamientos más prometedores para erradicar la LMA (Sachlos et al., 2012). La confirmación de esto se llevó a cabo previamente con el uso de bromocriptina, un agonista de la dopamina y, por lo tanto, inhibidor de la secreción de PRL. El tratamiento con este compuesto disminuye la viabilidad y clonogenicidad e incrementa la diferenciación de las células de LMA sin afectar las muestras de donantes sanos (Lara-Castillo et al., 2016). Además, estudios realizados por otros grupos de investigación han revelado que las LSCs presentan una activación general de los genes activadores de la vía de señalización de PRLR, regulándola positivamente (Majeti et al., 2009; Majeti & Weissman, 2011).

En base a las publicaciones mencionadas y los datos preliminares del grupo, se ha planteado la hipótesis que el eje de señalización PRL:PRLR podría tener un papel importante en el inicio y mantenimiento de la LMA. Por lo tanto, el objetivo principal de este proyecto consiste en la identificación del papel de la PRL y su receptor en los eventos asociados con el inicio y mantenimiento de la LMA. Para poder conseguir este objetivo, se han propuesto objetivos secundarios:

- 1) Caracterización del papel de la vía de señalización de PRLR en el potencial transformante de las células de LMA y la consecuente aparición de la enfermedad.
- 2) Caracterización del papel de la vía de señalización de PRLR en los procesos leucemogénicos.
- 3) Evaluación de potencial efecto terapéutico antileucémico de los inhibidores del PRLR.
- 4) Evaluación del uso de la expresión del PRLR como biomarcador para el diagnóstico y pronóstico de la LMA.

3. Materiales y métodos

3.1. Materiales

3.1.1. Líneas y cultivos celulares

Todas las líneas celulares usadas en este trabajo se cultivaron a 37°C y al 5% de CO₂ en medio suplementado con 5-10% de suero fetal bovino (FBS) (Biowest), 2mM de L-Glutamina (Gibco) y 1mM de aminoácidos no esenciales de MEM (Biowest). Las líneas celulares de neoplasias hematológicas se cultivaron en medio RPMI1640 (Biowest) y la línea celular HEK-293T se cultivó en medio DMEM (Biowest). La información de las líneas celulares se encuentra recogida en la **Tabla 1**.

Línea celular	Patología	Procedencia	Referencia
MonoMac-1	LMA	DSMZ	Steube et al., 1997
HL-60			Gallagher et al., 1979
KG-1			Koeffler & Golde, 1978
Kasumi-1		IJC (Dr. Buschbeck)	Asou et al., 1991
U-937			Ralph et al., 1976
SKM-1		Producción propia	Nakagawa et al., 1993
SKM-1 AraC R			-
HL-60 AraC R			-
KG-1 AraC R		-	-
MDS-L	SMD	CCHMC (Dr. Starczynowski)	Rhyasen et al., 2014
K-562	LMC	IDIBAPS (Dra. Colomer)	Lozzio & Lozzio, 1975
RAMOS (RA1)	Linfoma de Burkitt		Benjamin et al., 1982
HBL-2	LCM		Abe et al., 1988
GRANTA-519		IDIBAPS (Dr. Subero)	Jadayel et al., 1997
Jurkat	LLA-T	IMIM (Dra. Bigas)	Weiss et al., 1984
CCRF-CEM			Foley et al., 1965
RPMI-8402			Huang et al., 1974
MOLT-4		DSMZ	Sahai Srivastava & Minowada, 1973
JJN-3	LCP	Hospital 12 de Octubre (Dr. Martínez-López)	Jackson et al., 1989
RPMI-8226	MM		Matsuoka et al., 1967
U-266			Nilsson et al., 1970
SR	Linfoma células B	DSMZ	Stein et al., 1981
HEK-293T	Epitelio de riñón embrionario	ATCC	Dubridge et al., 1987

Tabla 1. Información de las líneas celulares. AraC R, resistentes a citarabina; LMA, leucemia mieloide aguda; SMD, síndromes mielodisplásicos; LMC, leucemia mieloide crónica; LCM, leucemia de células del manto; LLA-T, leucemia linfoblástica aguda T; LCP, leucemia de células plasmáticas; MM, mieloma múltiple; IJC, Institut de Recerca contra la Leucèmia Josep Carreras; CCHMC, Cincinnati Children's Hospital Medical Center; IDIBAPS, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer; IMIM, Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques.

3.1.2. Muestras primarias

Las muestras de pacientes de LMA y SMD se obtuvieron de las colecciones de muestras del Hospital Clínic de Barcelona (C.0000397) y del Institut de Recerca contra la Leucèmia Josep Carreras, Campus ICO-GRiP (C.0002922). El diagnóstico y clasificación se realizó según los criterios de la OMS (Arber et al., 2016). El estudio se aprobó por los comités éticos de investigación clínica de los hospitales correspondientes y se obtuvo el consentimiento informado de los pacientes de acuerdo con la Declaración de Helsinki. Las muestras de cordón umbilical y las capas leucocitarias de donantes sanos se obtuvieron del Banc de Sang i Teixits con la aprobación del comité ético del Hospital universitario Vall d'Hebron.

La sangre periférica, la sangre de cordón umbilical, la sangre de médula ósea y los concentrados leucocitarios obtenidos de leucoaféresis terapéuticas se mezclaron con PBS y se aislaron las células mononucleadas (MNCs) por centrifugación en gradiente con Ficoll (Ficoll-Paque, GE Healthcare). En las muestras de cordón umbilical se realizó una depleción de linaje, que consiste en la selección positiva de células que expresan marcadores asociados a linajes maduros, en columna usando anticuerpos con el *Lineage cell Depletion kit* (Miltenyi Biotec) y los estudios se realizaron con la fracción negativa (lin⁻), enriquecida en la población primitiva.

Para el cultivo de células de muestras primarias de LMA se utilizó medio IMDM (Biowest) suplementado con el 3% de FBS, 2mM de L-Glutamina (Gibco), 1mM de aminoácidos no esenciales de MEM (Biowest), 100U/mL de penicilina (Biowest), 100µg/mL de estreptomina (Biowest), 1mM de piruvato sódico (Gibco), 20% de BIT9500 (Stem Cell Technologies), 5ng/mL de IL-3 (PeproTech) y 5x10⁻⁵M de 2-mercaptoetanol (BME, Sigma-Aldrich). Para el cultivo de células de cordón umbilical de donantes sanos se utilizó medio IMDM suplementado con un 1% de BSA (albúmina de suero bovino, Sigma-Aldrich), 1mM de aminoácidos no esenciales de

MEM (Biowest), 1mM de piruvato sódico (Gibco), 100U/mL de penicilina (Biowest), 20ng/mL de TPO (trombopoyetina, PeproTech), 100ng/mL de FLT3L (PeproTech), 100ng/mL SCF (factor de células madre, PeproTech) y 5×10^{-5} M de BME (Sigma-Aldrich).

3.1.3. Compuestos

Todos los compuestos utilizados en este estudio se resuspendieron en H₂O (Thermo Fisher Scientific) o DMSO (Sigma-Aldrich) siguiendo las instrucciones del proveedor. Se almacenaron a -80°C a la concentración determinada por el fabricante para una mayor conservación según las características de solubilidad del compuesto. La lista de compuestos utilizados se encuentra recogida en la **Tabla 2**.

Nombre	Abrev.	Prov.	Acción	Referencia	Núm. CAS	Solv.
Bromocriptina (mesilato)	Bromo	Enzo	Ag D2R y D3R	Johansen et al., 1986	22260-50-1	DMSO
Prolactina	PRL	PreP	Ag PRLR	Campbell et al., 1994	-	H ₂ O
del 1-9 G129R	G129R	MyBio	Ant PRLR	Bernichtein et al., 2003	-	H ₂ O
Inhibidor Stat3	Inh Stat3	SA	Inh P Stat3	Zhao et al., 2010	22112-89-6	DMSO
Inhibidor Stat5	Inh Stat5	SA	Inh P Stat5	Müller et al., 2008	285986-31-4	DMSO
Ruxolitinib (fosfato)	Ruxo	Sig Ab	Inh Jak2	Quintás-Cardama et al., 2010	941678-49-5	DMSO
PD184352	PD52	SA	Inh MEK	Sebolt-Leopold et al., 1999	212631-79-3	DMSO
Ly294-002 (hidrocloruro)	Ly, Ly002	SA	Inh PI3K	Guo et al., 2000	934389-88-5	DMSO
AMD 3100	AMD	Tocris	Ant CXCR4	Bridger et al., 1995	155148-31-5	DMSO
5-Azacidina	Aza	CC	Inh ADN metiltrans.	Brueckner et al., 2005	320-67-2	DMSO
Daunorubicina (hidrocloruro)	Dauno	SCBT	Anti-leucémico	Murphy & Yee, 2017	23541-50-6	H ₂ O
Citosina β-D-arabinofuranósido	AraC, citarabina	SA			147-94-4	H ₂ O
Ácido holotransretinoico	ATRA	SA	Dif.	Degos, 1992	302-79-4	DMSO
1α,25-Dihidroxi-vitamina D3	Vitamina D3	SA	Dif. monocítica	Napoli & Martin, 1991	32222-06-3	DMSO

Elimusertib (hidrocloruro)	Elimu	SC	Inh ATR	Lücking et al., 2020	1876467-74	DMSO
-------------------------------	-------	----	---------	-------------------------	------------	------

Tabla 2. Compuestos utilizados. Abrev, abreviatura; Solv, solvente; Enzo, Enzo Life Science; PreP, PreProtech; MyBio, MyBioSource; SA, Sigma-Aldrich; Sig Ab, Signalway Antibody; CC, Cayman Chemical; SCBT, Santa Cruz Biotechnology; SC, Selleckchem; Ag, agonista; D2R, receptor de dopamina 2; D3R, receptor de dopamina 3; PRLR, receptor de prolactina; Ant, antagonista; Inh, inhibidor; metiltrans, metiltransferasas; Dif, diferenciación.

3.1.4. Anticuerpos acoplados a fluoróforo

Los anticuerpos acoplados a fluoróforo utilizados para la citometría de flujo se encuentran recogidos en la **Tabla 3**.

Anticuerpo	Clon	Proveedor	Fluorocromo
CD11b/Mac-1	ICRF44	BD	PE
CD14	M5E2	BD	APC
CD14	MΦP9	BD	V450
CD45	HI30	BD	FITC, PE, APC, V450
CD41a	HIP8	BD	FITC
CD11c	B-ly6	BD	APC
CD33	WM53	AB D serotec	Alexa488
CD33	HIM3-4	BD	FITC, PE
CD13	WM15	BD	PE
CD13	WM15	AB D serotec	Alexa647
CD15	HI98	BD	APC
CD19	SJ25C1	BD	FITC
CD3	HIT3a	BD	APC
CD2	RPA-2.10	BD	FITC
CD56	B159	BD	PE
CD16	B73.1	BD	APC
CD34	581	BD	APC, PE
CD38	HIT2	BD	FITC, PE
CD184	12G5	BD	APC
CD45 ratón	30-F11	BD	PE

Tabla 3. Lista de anticuerpos acoplados a fluoróforo para citometría de flujo. Todos reconocen la el marcador de superficie humano, excepto si se especifica.

3.1.5. Anticuerpos primarios

Los anticuerpos primarios se utilizaron para reconocer de manera específica proteínas en superficie por citometría de flujo y proteínas totales obtenidas de lisados de células por western blot (**Tabla 4**).

Anticuerpos	Clon	Casa comercial
PRLR	U5	Thermo Fischer Scientific
PRLR	Policlonal	Abcam
PRL	9D12	Antibodies Online
GAPDH	6C5	Thermo Fischer Scientific
pStat3	3E2	Cell Signaling
Stat3	79D7	Cell Signaling
pStat5	8-5-2	Millipore
Stat5	Policlonal	Abcam
RXR α	H-10	Santa Cruz Biotechnology
VDR	D-6	Santa Cruz Biotechnology
Lamin B1	B-10	Santa Cruz Biotechnology

Tabla 4. Lista de anticuerpos primarios.

3.1.6. Cebadores utilizados para la RT-PCR semi-cuantitativa

Los cebadores utilizados para analizar la expresión de genes por RT-PCR semi-cuantitativa se encuentran recogidos en la **Tabla 5**.

Gen amplificado	Sentido	Secuencia	Referencia
GAPDH	<i>Forward</i>	GTGGACCTGACCTGCCGTCT	Pan et al., 2007
	<i>Reverse</i>	GGAGGAGTGGGTGTTCGCTGT	
PRLR long (isoforma larga)	<i>Forward</i>	TCCAGGTATGTGGGTTCAT	Ueda et al., 2006
	<i>Reverse</i>	GATTTGATGCTCATCTGTTGGA	
PRLR short 1b (isoforma corta)	<i>Forward</i>	CAACATCAAGGGGTCACCTC	
	<i>Reverse</i>	CATGAATGATAACAACCGTGTGG	
hENT1	<i>Forward</i>	GGGCAGCCTGTTTGGTCT	Levin et al., 2021
	<i>Reverse</i>	CCACTGGCAATAGCGCAG	
hENT2	<i>Forward</i>	CTCCTGTCCATGGCCAGTG	
	<i>Reverse</i>	GGGCCTGGGATGATTTATTG	
hENT3	<i>Forward</i>	TCAGCGGTGCCTCCACTGT	
	<i>Reverse</i>	GCAGCCAAGTCCACCAATGA	
MRP4	<i>Forward</i>	TCAAGTCCGTTCGGAAGGCA	McBride et al., 2009
	<i>Reverse</i>	GCATTTAACTGGTGGCCTGCA	
dCK	<i>Forward</i>	GCCGCCACAAGACTAAGGAA	Levin et al., 2021
	<i>Reverse</i>	GACTTCCCTGCAGCGATGTT	
NDK	<i>Forward</i>	ATTCCGCCTTGTTGGTCTGA	
	<i>Reverse</i>	TTGGAGTCTGCAGGGTTGGT	
PN-I	<i>Forward</i>	AACAACATAGCATCCCCGTGT	
	<i>Reverse</i>	TTCCTCAAGGCACCATCATGT	
CDA	<i>Forward</i>	TGTGCTGAACGGACCGCTA	
	<i>Reverse</i>	GCAGGTCCTCAGGCCCAA	

NT5E	<i>Forward</i>	TCTTCTAAACAGCAGCATTC	McBride et al., 2009
	<i>Reverse</i>	CATTTCATCCGTGTGTCTCAG	

Tabla 5. Lista de cebadores utilizados para la RT-PCR semicuantitativa.

3.2. Métodos

3.2.1. Generalidades y estadística

Todos los experimentos de citometría de flujo presentados a lo largo de esta tesis se han realizado con el citómetro FACSCantoII (Becton Dickinson) y los resultados se han analizado con el software FlowJo (Tristar). En todos los experimentos analizados con citometría de flujo se fijó el negativo de tinción con un control *unstained* (sin tinción) y se compensaron adecuadamente los diferentes canales de emisión con controles unitarios de tinción para corregir el *spillover* de fluorescencia entre ellos.

Los test estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism® 8.0 (GraphPad software). Para los experimentos de líneas celulares se realizó un test de normalidad para determinar la distribución gaussiana y se han realizado pruebas *t Student* no emparejadas bilaterales con un nivel de confianza del 95%. En algunos casos, se han realizado test ANOVA de medidas repetidas de dos factores. A la hora de comparar grupos de muestras primarias no se ha asumido una distribución gaussiana y se han realizado test no paramétricos de Mann-Whitney no emparejados bilaterales con un nivel de confianza del 95%. Todas las barras de error mostradas en las gráficas de barras corresponden al error estándar de la mediana (SEM), medida adoptada como estándar en el grupo de investigación al tener en cuenta la variabilidad y el tamaño de la muestra, representado, por lo tanto, la certeza relativa sobre ese valor. Se ha considerado estadísticamente significativos valores de $p < 0,05$.

3.2.2. Contaje celular y viabilidad

El contaje de células vivas para la preparación de experimentos se ha realizado con un hemocitómetro (cámara de Neubauer, VWR) con una tinción de azul tripán (Sigma-Aldrich) para la discriminación de la viabilidad. En los experimentos de citometría de flujo, los análisis se realizaron dentro de la población de células vivas identificadas como negativas para 7-AAD (eBioscience) y con un patrón correcto de tinción positiva para Hoechst33342 (Sigma-Aldrich), para detectar partículas con núcleo y descartar células fusionadas. También se ha comprobado el perfil de FSC-SSC. En algunos experimentos y por motivos de solapamiento con otras tinciones, se ha usado sólo una de las dos medidas de viabilidad.

3.2.3. Análisis de la expresión de proteínas en superficie

3.2.3.1. Análisis de la expresión de PRLR en superficie

Para analizar la expresión del receptor PRLR en la membrana de las células por citometría de flujo se realizaron tres tinciones secuenciales sobre las células: 1) anticuerpo de ratón anti-PRLR humano (**Tabla 4**); 2) anticuerpo secundario *P-phycoerythrin goat anti-mouse IgG (H+L)* (Life Technologies); y 3) marcadores específicos de poblaciones (**Tabla 3**) y marcadores de viabilidad. Se realizaron lavados de las células con el tampón PEF (PBS 1x, 0,5mM EDTA y 3% FBS) después de cada tinción. Después de la adquisición por citometría de las células, se analizó dentro de las células vivas el porcentaje de células que expresaban PRLR. En las muestras primarias el análisis se realizó dentro de las diferentes poblaciones discriminadas en base a la tinción por CD3, CD13, CD19, CD34 y CD45, entre otras. Para la selección de blastos en muestras primarias de neoplasias hematológicas se realizaron *blast gates* que permiten la identificación en base a CD45^{dim} y SSC^{int} (Lacombe et al., 1997).

3.2.3.2. Análisis de la diferenciación mieloide

Para analizar los efectos sobre la diferenciación de las células leucémicas, se analizó la expresión en superficie de marcadores de diferenciación terminal mieloide CD11b y CD14. Se cultivaron 1,5x10⁵ células/mL y se trataron con los compuestos a la concentración indicada durante 72h. Las células se tiñeron con los anticuerpos específicos para los marcadores mencionados y los de viabilidad y se adquirieron por citometría de flujo. Se analizó el porcentaje de células con la expresión de los marcadores y la MFI (media de la intensidad de fluorescencia, del inglés *Mean Fluorescence Intensity*), dependiendo del experimento, dentro de la población de células vivas.

3.2.3.3. Análisis de marcadores de migración celular

Para analizar la capacidad migratoria de las células leucémicas, se determinó la expresión de CD184 o CXCR4 en superficie. 1,5x10⁵ células/mL se analizaron en estado basal o bien se trataron con los compuestos indicados durante 72h. Las células se tiñeron con el anticuerpo específico de CD184 (**Tabla 3**) y los de viabilidad y se adquirieron por citometría de flujo. Se analizó el porcentaje de células con la expresión

de los marcadores y la MFI, dependiendo del experimento, dentro de la población de células vivas.

3.2.4. Análisis de la expresión de genes por PCR semi-cuantitativa en tiempo real

Para analizar la expresión de genes a nivel de ARN mensajero, el ARN total de las células en las condiciones de interés se extrajo utilizando el *Total RNA Purification Kit* (Norgen Biotek) siguiendo las indicaciones del proveedor. La retrotranscripción a cADN se realizó utilizando el *qScript cDNA Synthesis Kit* (Quanta Bioscience), que usa cebadores hexámeros al azar. Con el cADN obtenido se realizaron RT-PCRs semi-cuantitativas con *Power Up SYBR Green PCR Mastermix* (Applied Biosystems) y cebadores diseñados para la detección de los genes correspondientes siguiendo las indicaciones del proveedor (**Tabla 5**). La reacción se llevó a cabo en el termociclador QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) y se valoró la expresión de genes cuando se observaban perfiles de *melting curve* correctas y Cts (ciclo umbral, del inglés *threshold cycle*) inferiores a 35.

El análisis de los resultados se realizó con el software propio de QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR System, se extrajeron los Ct y los valores del gen de referencia GAPDH se restaron a los obtenidos con el resto de cebadores (Δ Ct). Seguidamente, se extrajeron los Cts de la condición control a los de las otras condiciones ($\Delta\Delta$ Ct) y se calculó el *fold change* como $FC=2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

3.2.5. Clonaje y transducción

3.2.5.1. Clonaje en el plásmido intermediario pUC19

Para poder realizar mutagénesis dirigida, se introdujo en el vector pUC19 (Addgene #50005) el inserto de PRL silvestre (wt) amplificado previamente por PCR a partir de ADN genómico de la línea celular MonoMac-1 (MM). Los cebadores utilizados para la amplificación contenían *overhangs* que permitieron delimitar el gen PRL con dianas de restricción de EcoRV (**Tabla 6**). Los resultados se secuenciaron por Sanger.

5' EcoRV SpeI - PRL	CCCGATATCCCCTAGTATATGAACATCAAA
3' EcoRV BamHI - PRL	CCCGATATCTTGGATCCAATTAGCAGTTGTTGT

Tabla 6. Cebadores utilizados para amplificar PRL y delimitarlo con las dianas de restricción EcoRV.

3.2.5.2. Mutagénesis dirigida

Para obtener la forma dominante negativa de PRL (PRL mut), se introdujeron mutaciones puntuales consistentes en el cambio de un único nucleótido que permite la sustitución de la Gly129 por una Arg mediante mutagénesis dirigida. Este cambio genera una forma de la PRL incapaz de señalar a través del receptor (Bernichtein et al., 2003; Goffin et al., 1996). Para hacerlo, se usaron oligonucleótidos solapantes (**Tabla 7**) partiendo de la construcción pUC19-PRL wt. El éxito de la mutagénesis se determinó por secuenciación Sanger.

5' PRL G129R	CAAACCAAACGGCTTCTAGAGCGCATGGAGCTGATAGTCAG
3' PRL G129R	CTGACTATCAGCTCCATGCGCTCTAGAAGCCGTTTGGTTTG

Tabla 7. Cebadores utilizados para la mutagénesis dirigida con oligonucleótidos solapantes.

3.2.5.3. Clonaje en el vector intermediario pEF1

Se ha utilizado el vector intermediario pEF1/V5-HisA (Invitrogen #V92020) para generar las construcciones de PRL y PRLR en un vector de expresión eucariota transitoria. El inserto PRL wt y PRL mut se extrajo mediante digestión con EcoRV (Thermo Fisher Scientific) del vector pUC19-PRL wt y -PRL mut para insertarlo en el vector pEF1. El plásmido pEF1-PRLR wt fue cedido amablemente por el laboratorio del Dr. Clevenge (Virginia Commonwealth University, EEUU) y el plásmido pEF1-PRLR short se obtuvo insertando la secuencia PRLR short mediante cebadores específicos junto con las dianas de restricción 5' EcoRI y 3' XbaI en el vector pEF/V5-HisA (**Tabla 8**). Los resultados se secuenciaron por Sanger.

5' EcoRI – 5' PRLR	CCCGAATTCATAATGAAGGAAAATGTGG
3' EcoRI – 3' PRLR short	CCCTCTAGAATAAGGGGTCACCTCCAACAG

Tabla 8. Cebadores para el clonaje de la forma PRLR short con las dianas de restricción.

3.2.5.4. Clonaje en el vector lentiviral pULTRA

Con el objetivo de expresar las formas de PRL y PRLR clonadas en las células mieloides se usó el vector lentiviral de tercera generación pULTRA (Addgene #24129) (**Figura 9**), que permite la expresión bicistrónica del gen de interés y el gen marcador GFP. El clonaje se realizó a partir de las construcciones previas en pEF1, transferidas al plásmido pULTRA mediante digestión con XbaI (Thermo Fischer Scientific). Los resultados se comprobaron por secuenciación Sanger.

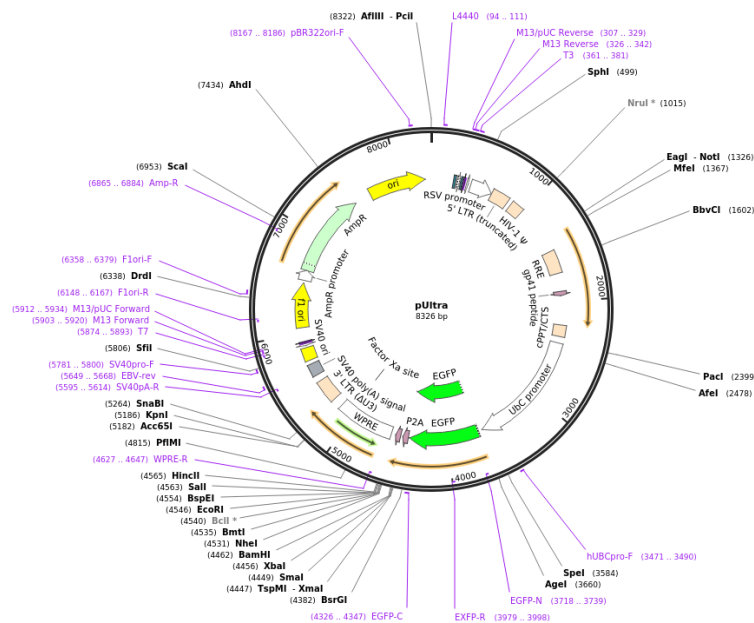


Figura 9. Mapa del plásmido lentiviral pULTRA. Plásmido obtenido por el laboratorio de Malcolm Moore (Addgene #24129).

3.2.5.5. Clonaje de shRNAs en el plásmido pLKO.1

Se ha intentado silenciar el gen PRLR mediante *short hairpin* RNA, usando como control un shRNA contra el gen GFP. Los cebadores específicos se adquirieron en el *RNA interference consortium* (<http://www.broadinstitute.org/rnai/tcr>) (**Tabla 9**).

PRLR shRNA 2	5' pLKO-TCR clon TRCN0000373248
PRLR shRNA 5	5' pLKO-TCR clon N0000059109
GFP shRNA	5' pLKO-TCR eGFP clon TRCN0000072193

Tabla 9. Cebadores específicos para los shRNA.

Las secuencias se anillaron y se insertaron en el vector pLKO.1-TCR (Addgene #10878) (**Figura 10**) siguiendo las instrucciones del proveedor. El resultado se secuenció por Sanger.

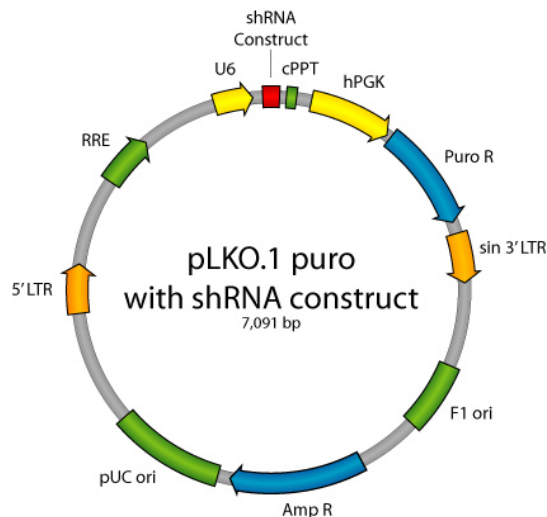


Figura 10. Mapa del plásmido pLKO.1-TCR. Plásmido obtenido por el laboratorio de David Root (Addgene #10878). El plásmido original tiene una secuencia de 1,9kb que se libera después de cortar con las enzimas de restricción AgeI y EcoRI (Thermo Fischer Scientific). Los cebadores de shRNA reemplazan la secuencia que se ha eliminado.

3.2.5.6. Clonaje de sgRNAs en el plásmido pLentiGuide-Puro

Para conseguir una disminución drástica en la expresión de PRLR, se utilizó la tecnología CRISPR-Cas9 con un sistema de dos vectores. El plásmido inicial no contiene la expresión de Cas9, por lo que es necesario transducirlo primero a las células, así que se transdujeron células de LMA con el plásmido pLentiCas9-Blast (Addgene #52962) (**Figura 11, izquierda**) y se seleccionaron mediante tratamiento con blasticidina (Sigma-Aldrich). Paralelamente, el plásmido pLentiGuide-Puro (Addgene #52963) (**Figura 11, derecha**) se digirió con la enzima de digestión BsmBI (Thermo Fischer Scientific) y los cebadores sgARN diseñados según las indicaciones del proveedor para silenciar específicamente el gen PRLR y generados en la página web chopchop (<http://www.chopchop.cbu.uib.no/>) se clonaron en él (CACCGGTTCGCTGCAAAA-CCAGACCA y CCAAGCGACGTTTGGTC-TGGTCAAA).

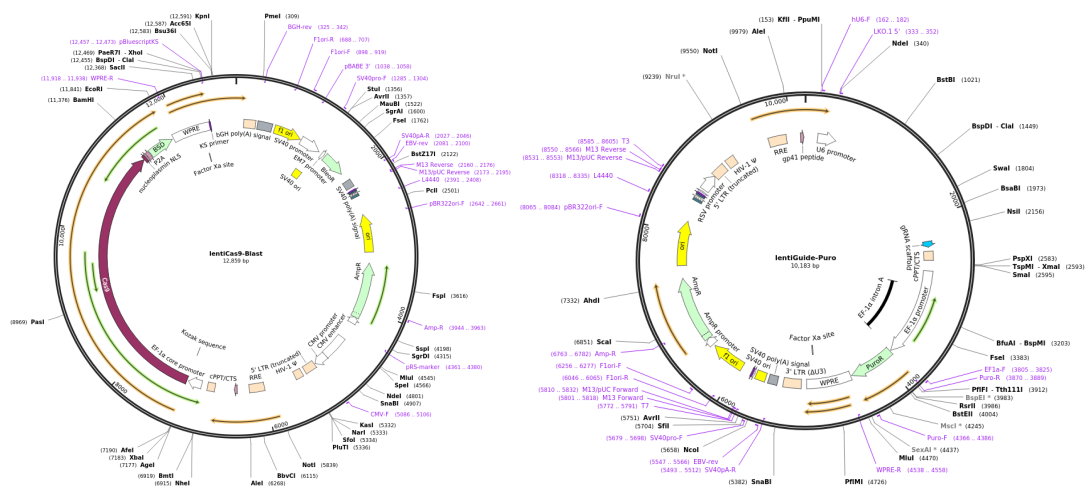


Figura 11. Mapa de los plásmidos pLentiCas9-Blast y pLentiGuide-Puro. Plásmidos obtenidos por el laboratorio del Dr. Feng Zhang (Addgene #52962, izquierda; Addgene #52963, derecha).

3.2.5.7. Transducción de vectores lentivirales en células leucémicas

2,5x10⁵ células HEK-293T en un volumen de 2mL y sembradas en placas de 6 pocillos se transfectaron con los plásmidos de interés y con plásmidos complementarios necesarios para la generación de virus lentivirales de tercera generación (Dull et al., 1998) (**Tabla 10**). La transfección se realizó por liposomas con el kit *JetPei DNA transfection reagent* (Polyplus transfection) siguiendo las indicaciones del proveedor y utilizando la proporción recomendada de plásmidos (6:4:4:3; plásmido de interés : pMDLg/pRRE : pRSV-Rev : pMD2.G).

Nombre	Procedencia	Elemento codificado
pMDL/pRRE	Addgene #12251	<i>gag, pol</i>
pRSV-Rev	Addgene #12253	<i>Rev</i>
pMD2.G	Addgene #12259	VSV-g (<i>env</i>)

Tabla 10. Relación de plásmidos complementarios necesarios para la generación de lentivirus de tercera generación.

Se infectaron 5x10⁵ células mieloides/mL con el sobrenadante lentiviral filtrado 48h después de la transfección. La infección se ayudó con una centrifugación en presencia de 4µg/mL de bromuro de hexadimetrina (Sigma-Aldrich) a 32°C durante 90'. La detección de células transducidas se realizó por la presencia de GFP+ por citometría

de flujo en el caso de pULTRA y mediante selección por blastocidina y puromicina (Sigma-Aldrich) en el caso de pLentiCas9-Blast y pLentiGuide-Puro, respectivamente.

3.2.5.8. Análisis de la señalización con vectores reporteros

Para analizar la actividad señalizadora de las formas silvestre y mutada de PRL y PRLR salvaje y short, se utilizaron distintos vectores reporteros basados en luciferasa: pGL4-CISH, que contiene la región del promotor de CISH (el inglés *cytokine inducible SH2-containing protein*), un gen regulado a nivel transcripcional por Stat5 (Fang et al., 2008); pGL4.33[luc2P/SRE/Hygro] (Promega), que contiene un elemento de respuesta a suero activado por la señalización de MAPK-Erk; pGL4.29[luc2P/CRE/Hygro] (Promega), que contiene el elemento respuesta a AMPc (CRE); y 4xM67 pTATA TK-Luc (Addgene), que contiene el elemento respuesta a Stat1/3 (Besser et al., 1999). Todos los plásmidos expresan luciferasa *luc2 (Firefly)* de manera condicional a la estimulación de los elementos respuesta. Se transfectaron $1,25 \times 10^5$ células HEK-293T/mL por el sistema JetPei con el vector pGL4 con el elemento respuesta, las diferentes construcciones de pEF1-PRL y -PRLR y un plásmido control con expresión constitutiva del gen de luciferasa *Rluc (Renilla)* (pRL-SV40, Addgene) a una proporción 2:2:1. 48h después de la transfección se lisaron las células y se analizó la luminiscencia generada por las dos luciferasas siguiendo las indicaciones del proveedor. Los datos obtenidos se presentaron como la luminiscencia de *Firefly* respecto a la de *Renilla*.

3.2.6. Estudios de supervivencia y proliferación

3.2.6.1. Citotoxicidad

Para estudiar el efecto citotóxico de los diferentes compuestos en las líneas celulares se sembraron en placas de 96 pocillos $3,5 \times 10^5$ células/mL, $2,5 \times 10^5$ células/mL y $1,5 \times 10^5$ células/mL para los experimentos de 24h, 48h y 72h, respectivamente, y se trataron con los compuestos a la concentración indicada. Pasado el tiempo adecuado, se analizó la viabilidad por conteo volumétrico, tal como se describe en el apartado **3.2.2**. En el caso de las muestras primarias, el procedimiento fue similar, pero sembrando de 5 a 10×10^5 células/mL y diferenciando las distintas poblaciones mediante anticuerpos para marcadores de distintos linajes (**Tabla 3**). Para poder seleccionar los blastos leucémicos de las muestras de neoplasias hematológicas se

realizaron *blast gates*, que permiten la identificación en base a CD45^{dim} y SSC^{int} (Lacombe et al., 1997). En todos los experimentos se usaron controles añadiendo el solvente en volumen equivalente.

3.2.6.2. Cálculo de las concentraciones efectivas medias (EC50)

La EC50 es la concentración en la cual un compuesto induce la mitad de su efecto citotóxico máximo. Su cálculo se realizó en base a los datos de citotoxicidad después del tratamiento con un amplio abanico de concentraciones del compuesto, obtenidos mediante el protocolo explicado en el apartado **3.2.6.1**. Los valores de las EC50 se obtuvieron mediante el software GraphPad Prism (*Variable slope-four parameters* o *Variable slope-three parameters*, dependiendo del experimento).

3.2.6.3. Ensayo de proliferación con DiI

Para el análisis de la proliferación celular en líneas celulares, se utilizó la sonda DiI (1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine), capaz de teñir las membranas celulares lipofílicas. La intensidad media de fluorescencia disminuirá a medida que las células se dividan, ya que la tinción se reparte entre las células hijas. Un total de 10⁵ células, previamente lavadas con PBS 1x, se tiñeron con DiI 1µg/mL durante 20' a 37°C. Pasado ese tiempo, se lavaron con PBS 1x + 20% FBS dos veces y se sembraron por triplicado a una concentración de 2,5x10⁵ células/mL en placas de 24 pocillos. Se añadieron los compuestos oportunos, si correspondía, y a día 0, 2 y 4 se retiró la mitad del medio, se analizó la tinción DiI por citometría de flujo, se añadió la misma cantidad de medio retirada y se trató con los compuestos.

3.2.6.4. Análisis del ciclo celular

Para estudiar los cambios en el ciclo celular inducidos por las diferentes transducciones o por la acción de compuestos, se cultivaron las células en medio sin FBS durante 18h para sincronizarlas. Seguidamente, se cultivaron con medio completo para ver las diferencias basales de las transducciones o bien se trataron 24h con los compuestos oportunos. Las células se lavaron con PBS 1x + 0,5mM EDTA y se fijaron con etanol al 70% frío durante 18h. Pasado este tiempo, las células se lavaron y se tiñeron con Hoechst33342 y se adquirieron los datos por citometría de flujo. Las diferentes fases del ciclo celular se determinaron por el contenido de ADN

después de descartar los dobletes (Dean & Jett, 1974); las células en fase <G0 y >G2/M se descartaron del análisis y se recalculó el 100% de la suma de las fases G0/G1, S y G2/M.

3.2.6.5. Análisis de las reversiones de la citotoxicidad

Para analizar la capacidad de la PRL para revertir la citotoxicidad de algunos compuestos, se ha tratado 72h con combinaciones de compuestos de manera simultánea y la viabilidad se ha analizado como explica el apartado **3.2.6.1**.

3.2.7. Ensayo de clonogenicidad

Para analizar la capacidad de autorrenovación de las células se han realizado ensayos de clonogenicidad. Un total de 1.000 células de líneas celulares de LMA y de células lin- de sangre de cordón umbilical o 50.000 células de muestras primarias de LMA se trataron 18h a la concentración indicada y en el medio correspondiente. Pasado este tiempo, se mezcló con 1mL de *MetboCult H4435 Enriched* (Stem Cell Technologies) y se sembró por duplicado en placas de 24 pocillos. Las unidades formadoras de colonias (CFU) se contaron en base a la morfología y la celularidad a día 7 en el caso de las líneas celulares y a día 14, generalmente, en muestras primarias de LMA y muestras de cordón umbilical.

3.2.8. Estudios *in vivo*

Toda la experimentación *in vivo* realizada en este trabajo se ha realizado de acuerdo con los procedimientos aprobados por el correspondiente Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA) de la Universidad de Barcelona (UB) y del Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol (IGTP) y en cumplimiento de lo establecido en el Real Decreto 53/2013, por el cual se establecen las normas básicas aplicadas para la protección de los animales usados en experimentación y otras finalidades científicas.

Para los estudios *in vivo*, se ha trabajado con ratones adultos inmunodeficientes NOD-scid IL2Rgamma^{null} (NOD.Cg-Prkdc^{scid}IL2rg^{tm1Wjl}/SzJ, NSG) procedentes de Jackson Laboratory. Este modelo de ratón permite una elevada eficiencia de injerto de poblaciones hematopoyéticas, así como una mayor reproducibilidad de los resultados (Agliano et al., 2008; Sarry et al., 2011).

Los animales se mantuvieron en condiciones estériles, estabulados en jaulas ventiladas con aire filtrado y manipulados en campanas de flujo laminar. Se les suministró una dieta ordinaria de laboratorio y acceso a agua y comida *ad libitum*. La temperatura se controló para oscilar entre 22 y 24°C y se aplicaron ciclos de luz-oscuridad de 12h. Los experimentos se realizaron con ratones de entre 6 y 8 semanas de edad y se mieloablacionaron con la administración intraperitoneal de 30mg/kg de busulfán (Sigma-Aldrich) 24h antes de la inyección de células.

3.2.8.1. Ensayo de competición de xenotrasplante con líneas celulares

Antes de realizar los experimentos *in vivo*, células MonoMac-1 se transdujeron con el vector comercial pULTRA-Smurf, (Addgene #48974) donde la proteína GFP ha sido reemplazada por la proteína fluorescente AmCyan, detectable por citometría de flujo, siguiendo el protocolo descrito en el apartado **3.2.5.6**. Una vez validada la transducción, se inyectaron vía intravenosa 5×10^6 células MonoMac-1 pULTRA-Smurf, junto con 5×10^6 células MonoMac-1 transducidas con el vector pULTRA-vacío, -PRLR wt y -PRLR short o bien pULTRA-vacío, -PRL wt y -PRL mut resuspendidas en solución fisiológica (0,9% NaCl, Sigma-Aldrich). Pasadas dos semanas, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y se extrajeron las tibias, los fémures y el bazo. Las células de la médula ósea procedentes de las tibias y los fémures se obtuvieron por disgregación mecánica con la ayuda de un mortero, mientras que las de bazo se obtuvieron por presión mecánica con el émbolo de una jeringa. En los dos casos, se usó tampón PBS 1x + 0,5mM EDTA + 0,5% BSA y las poblaciones presentes se analizaron por citometría de flujo. Las células leucémicas se identificaron con anticuerpos específicos de CD45 humano, descartando las CD45 de ratón, y se consideró el porcentaje de células CD45⁺ como el valor de injerto de las células. Una vez seleccionada esta población, las células control transducidas con pULTRA-Smurf y las células de interés se diferenciaron gracias a la expresión de AmCyan y GFP, respectivamente, y se representaron como el porcentaje de células, normalizando los resultados al 100%.

3.2.8.2. Xenotrasplante con líneas celulares

Se inyectaron vía intravenosa 10^6 células de la línea celular MonoMac-1, transducidas previamente con el plásmido lentiviral pLL-EF1 α -eFLuc-T2A-GFP (rLuc, System

Bioscience #LL410PA-1) para poder hacer un seguimiento de la capacidad de injerto de éstas, resuspendidas en solución fisiológica (0,9% NaCl, Sigma-Aldrich) y se dejaron 4 días sin tratar para permitir el injerto de las células humanas. Pasado este tiempo, se administró durante dos semanas y en días alternos PRL o G129R 0,2mg/kg de peso por vía intraperitoneal durante 14 días, cuando se sacrificaron por dislocación cervical. A los ratones control se les inyectó suero fisiológico, utilizado como solvente en los compuestos. Se analizó la carga leucémica en días alternos con el sistema de toma de imágenes *in vivo* no invasivo IVIS® Lumina III *In vivo Imaging System* (Perkin Elmer). Se inyectó de forma intraperitoneal Luciferina 150mg/kg de peso del ratón (Perkin Elmer) y se anestesiaron con 3% de isoflurano (BBraun). Pasados 10' se realizaron las capturas de imágenes en un lapso de 2' y se analizaron con el software Aura®.

3.2.9. Western Blot

Para el análisis de proteínas en estado basal, se recolectaron 3×10^6 células de las líneas celulares de LMA o de muestras primarias procedentes de sangre periférica o de leucoaféresis para asegurar un elevado porcentaje de blastos. Para el análisis de proteína tras un tratamiento o estímulo, 3×10^6 células de LMA se cultivaron 4-6h con medio en ausencia de FBS para sincronizar las células y se trataron posteriormente con los estímulos indicados 2h. Para analizar la proteína total, las células se lisaron con el tampón RIPA complementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas (1mM benzamidina, 1mM DTT, 1µg/mL leupeptina, 1µg/mL aprotinina, 1mM PMSF, 1mM ortovanadato de sodio, 20mM NaF). Para analizar la fracción nuclear, se ha utilizado el kit NE-PER™ *Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents* (Thermo Fischer Scientific), que permite lisar las células separando la fracción de proteínas citoplasmática y nuclear, siguiendo las indicaciones del proveedor. Una vez obtenidos los extractos de proteína, se han cuantificado con el kit *BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fischer Scientific) utilizando el espectrofotómetro *Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader* (BioTek) a 562nm.

Los extractos de proteína se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida a una concentración de 60-100µg y en presencia de condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS y β-mercaptoetanol, Sigma-Aldrich) y se transfirieron a una

membrana de nitrocelulosa de 0,2 μ m (BIO-RAD). Para la inmunodetección, se utilizaron anticuerpos primarios específicos (**Tabla 4**) y anticuerpos secundarios *IRDye®800 CW* y *IRDye® 680 CW* (LI-COR) siguiendo las indicaciones del sistema de inmunodetección Odyssey (LI-COR). Las imágenes se obtuvieron mediante el *Odyssey Infrared Imaging System®* (LI-COR) y se usó GAPDH y Lamin B1 (**Tabla 4**) como referencia para las proteínas totales y nucleares, respectivamente. Las bandas se cuantificaron con el software *ImageJ*.

3.2.10. Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

La detección de la PRL (prolactina ligando) se realizó mediante el kit *PRL (Human) ELISA kit* (Abnova), siguiendo las instrucciones del proveedor.

3.2.11. Ensayo de migración transpocillo

Para determinar la habilidad migratoria de las células de LMA se realizó un ensayo de migración a través de una membrana porosa en placas de 24 pocillos, que permite separar el pocillo de cultivo en dos cámaras, una superior y una inferior (*Millicell®Hanging cell culture insert*, Millipore). En la cámara superior se sembraron 2,5x10⁵ células/mL con el estímulo indicado y con medio completado con 5% de FBS; en la cámara inferior se añadió medio complementado con FBS 20% para otorgar a las células un medio atrayente, generando un gradiente de suero. Pasadas 72h, se analizó por citometría de flujo la cantidad de células presenten en la cámara inferior como indica en el apartado **3.2.2**.

3.2.12. Generación de líneas resistentes a citarabina

Para el estudio de resistencia en las líneas de LMA, las células HL-60, SKM-1 y KG-1 se escogieron por su elevada sensibilidad a quimioterapia y se trataron al valor de la EC50 hasta que fueron resistentes. En este punto, se incrementó gradualmente la concentración del tratamiento hasta que incrementaron la EC50, aproximadamente, el doble del valor inicial. Las células resistentes se mantuvieron con la dosis de la EC50 en el medio para que no perdiesen la resistencia y se comprobó por citometría de flujo el valor de ésta para validarlas.

3.2.13. Estudio de la senescencia

El estudio de la senescencia se realizó con el kit β -Galactosidase Staining Kit (Cell Signal) que ayuda a la detección de SA- β -Gal, un indicativo de la senescencia. 5×10^5 células/mL en estado basal o tratadas previamente según se indica, se lavaron, fijaron y tiñeron durante 12h según las instrucciones del proveedor. Pasado el tiempo establecido, se realizaron capturas de distintos planos a 40x aumentos con un microscopio invertido y se cuantificó la tinción con el software *ImageJ*.

3.2.14. Análisis bioinformáticos

3.2.14.1. Connectivity Maps

Se utilizó la serie GSE982 (GSM15451, GSM15452, GSM15453, GSM15576, GSM15577, GSM15578, GSM15561, GSM15562 y GSM15563) depositada en el repositorio GEO para obtener la firma génica asociada a la diferenciación inducida por ácido holotransretinoico (ATRA) en la línea celular HL-60 (Stegmaier et al., 2004). Se utilizaron los algoritmos del software DChip (*Harvard School of Public Health*, Boston, EEUU) para normalizar los ficheros originales (.cel) (Li & Hung Wong, 2001). Tras el análisis de las muestras normalizadas por el programa GenePattern (*Broad Institute Cancer Program*), se seleccionaron las sondas con una expresión diferencial de al menos dos magnitudes y con un valor estadístico $p < 0,005$. Se identificaron las sondas que durante el proceso de diferenciación mediada por ATRA tenían mayor regulación negativa y positiva. Estas sondas fueron sometidas posteriormente a un cribado *in silico* basado en firmas denominado *Connectivity Maps* (*Broad Institute Cancer Program*). (Lamb et al., 2006)

3.2.14.2. Análisis de la expresión génica asociada a LSCs

Se utilizó el software DChip para normalizar las muestras de expresión génica de LSC de LMA (GSM591231, GSM591232, GSM591233, GSM591234, GSM591235, GSM591236, GSM591237, GSM291238), de HSC de cordón umbilical (GSM591216, GSM591217 Y GSM591218) y de HSC de médula ósea (GSM591219, GSM591220, GSM591221 y GSM591222, pertenecientes a la serie GSE24006 (Gentles et al., 2014)).

4. Resultados

4.1. Resultados preliminares

Este trabajo surge de estudios realizados anteriormente por el grupo de investigación centrados en la búsqueda de nuevas moléculas que permitan erradicar la LMA y prevenir las recaídas. El primer paso de la búsqueda consistió en centrarse en nuevas moléculas que permitiesen inducir la diferenciación terminal de las LSCs, dirigiendo las células a un linaje hematopoyético alternativo y permitiendo la eliminación de éste grupo de células de manera indirecta (Sachlos et al., 2012). Para identificar la firma génica asociada al proceso de diferenciación terminal de las LSCs a cada uno de los linajes más importantes, se han utilizado perfiles de expresión génica de repositorios públicos (GEO, ArrayExpress) de células de LMA (LSC) y de células sanguíneas sanas (granulocitos, monocitos y células dendríticas), así como los perfiles después de tratamientos con agentes diferenciadores farmacológicos (éster de forbol, vitamina D3 y ATRA), junto con herramientas bioinformáticas. Para refinar los resultados, se eliminaron las firmas génicas asociadas a la diferenciación de las células hematopoyéticas sanas (HSC), relacionadas con una hematopoyesis normal. Las firmas génicas identificadas se enfrentaron con la base de datos de *Connectivity Maps* (Lamb et al., 2006) y se buscaron compuestos capaces de inducir cambios en el patrón de expresión génica similar a las firmas génicas de los procesos de diferenciación. La base de datos en su versión 1.0 estaba formada por 1309 compuestos, de los cuales 72 fueron escogidos debido al valor en el cribado *in silico*, la concentración a la cual inducían la expresión génica deseada y la significación de la estadística. De estos 72 compuestos, se seleccionaron 17 que se podían clasificar en cuatro familias: fármacos para la enfermedad de Párkinson, fármacos antimaláricos, agentes antifúngicos e inhibidores de la secreción de PRL. En este punto, se mostró interés en las vías de señalización del PRLR, ya que se observó que las LSCs tienen una firma génica de genes asociados a la señalización por el PRLR específica y distinta de los progenitores y células madre hematopoyéticas sanas, gracias al análisis con la base de datos GSE24006. Además, los genes implicados en la señalización mediada por el PRLR y en su regulación positiva están sobreexpresados, mientras que los genes que la regulan negativamente están reprimidos (Majeti et al., 2009; Majeti & Weissman, 2011) **(Figura 12)**.

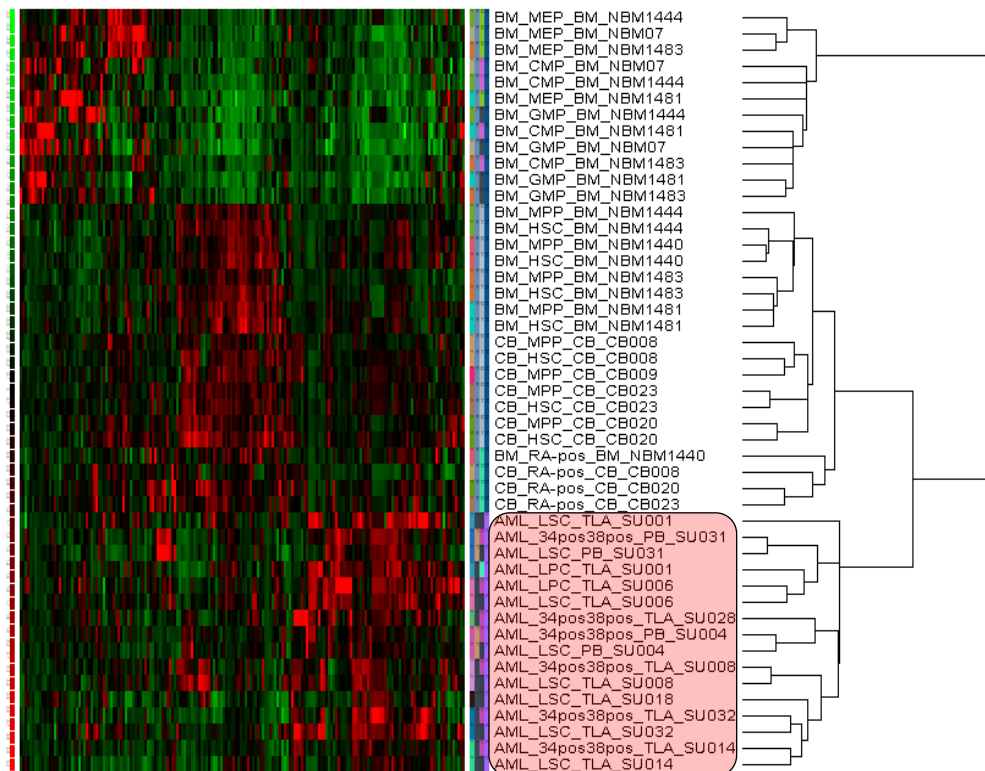


Figura 12. La vía de señalización del PRLR está diferencialmente expresada en las LSCs en comparación con las HSCs y precursores tempranos. Se seleccionaron los perfiles de expresión génica asociados a genes de la señalización del PRLR, previa normalización por RMA (*Robust Multichip Average*), y se agruparon jerárquicamente sin supervisión. Las muestras de pacientes de LMA enriquecidas para LSCs están marcadas. Los datos del array se obtuvieron de GEO GSE24006 y de la base de datos de vías de señalización KEGG *Prolactin signaling pathway hsa04917*. Los análisis bioinformáticos se realizaron con el software DChip.

La implicación de la PRL se validó con el uso de bromocriptina, una molécula moduladora del receptor de dopamina y, por ende, inhibidora de la secreción de PRL pituitaria (Lara-Castillo et al., 2016; Maurer, 1980). Las células de LMA MonoMac-1, HL-60 y KG-1 se trataron durante 72h con bromocriptina a diferentes concentraciones, observándose una disminución en la viabilidad celular (**Figura 13**) y un incremento en la diferenciación mieloide basada en la expresión en superficie de los marcadores de CD11b (diferenciación granulocítica) (**Figura 14A**) y CD14 (diferenciación monocítica) (**Figura 14B**).

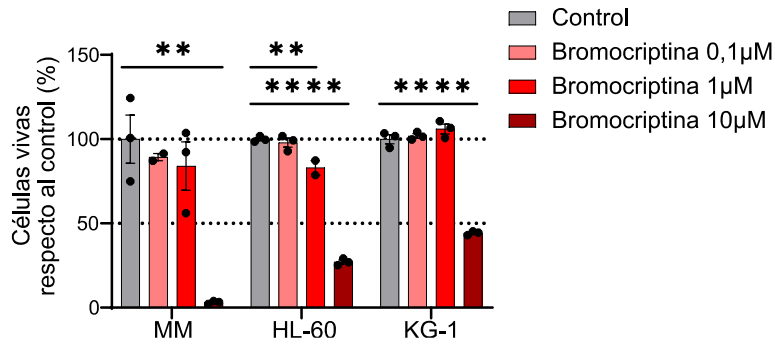


Figura 13. La bromocriptina disminuye la supervivencia celular en líneas de LMA. Células MonoMac-1 (MM), HL-60 y KG-1 se trataron 72h con bromocriptina 0,1µM, 1µM y 10µM y se analizó la viabilidad celular por citometría de flujo. Las barras indican la media de células vivas respecto al control de triplicados de tres experimentos independientes, donde cada punto es el valor de la media de cada experimento \pm SEM. ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

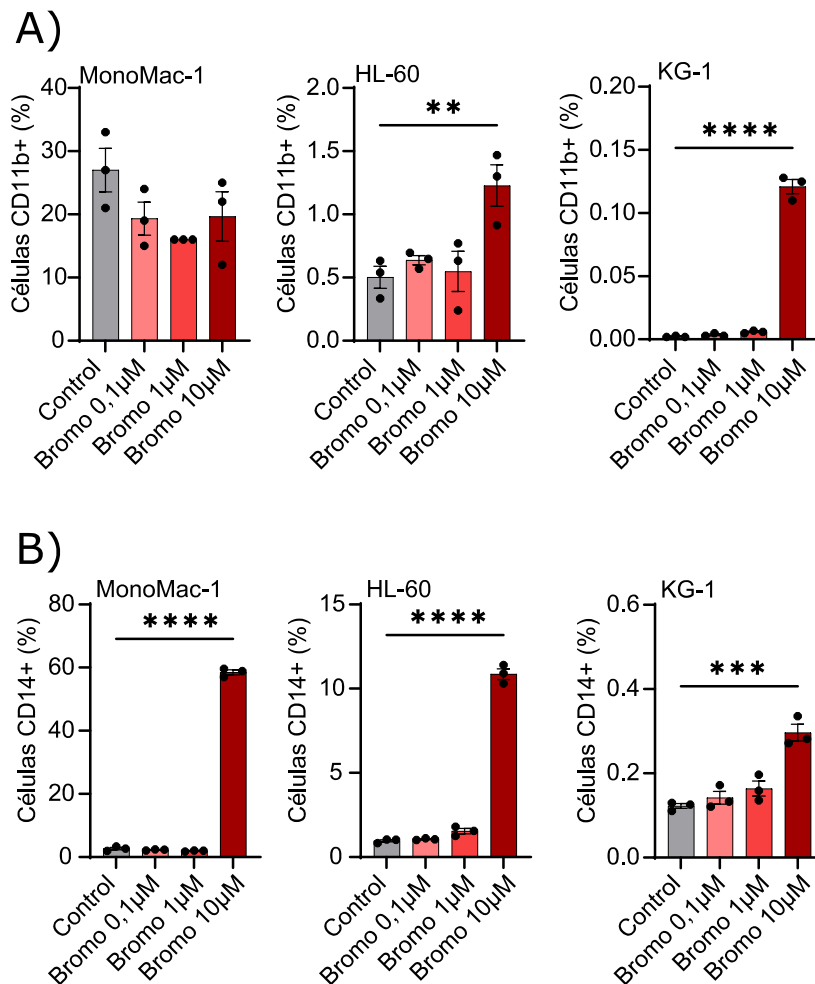


Figura 14. La bromocriptina induce la diferenciación mioide en líneas de LMA. Células MonoMac-1 (MM), HL-60 y KG-1 se trataron 72h con bromocriptina 0,1µM, 1µM y 10µM y se analizaron para la expresión en superficie de los marcadores **A)** CD11b y **B)** CD14 por citometría de flujo. Las barras indican la media de la MFI de triplicados de tres experimentos independientes, donde cada punto es el valor de la media de cada experimento \pm SEM. *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

4.2. Estudio de la PRL y el PRLR en neoplasias hematológicas

En base a los resultados obtenidos en el cribado *in silico* y viendo la implicación de las vías de señalización de la PRL, se decidió estudiar la expresión diferencial de PRL y PRLR en diferentes neoplasias hematológicas.

4.2.1. Expresión de PRL y PRLR en células hematopoyéticas sanas y neoplásicas

El primer paso para determinar la expresión de PRL y su receptor consistió en el uso de la base de datos pública de expresión génica R2: *Genomics Analysis and Visualization Platform* (hgserver1.amc.nl/cgi-bin/r2). Se escogió la base de datos GSE13159, que engloba los datos generados en el estudio MILE (*Microarray Innovations In Leukemia*) del *European Leukemia Network* (ELN), generados a partir de muestras de pacientes de LMA de sangre periférica y de médula ósea al diagnóstico (Haferlach et al., 2010; Kohlmann et al., 2008) mediante la plataforma de Affymetrix HG-U133 Plus 2.0 en su versión actual *Clariom D* y se seleccionaron las sondas de expresión 205445_at para PRL y 211917_s_at para PRLR. Una vez obtenidos los datos, aunque no se observaron diferencias en la expresión de PRL, sí que se observó un incremento significativo en la expresión de PRLR en muestras de LMA respecto a los controles (**Figura 15A**). Seguidamente, dada la gran dispersión de la expresión tanto en PRL como en su receptor, se decidió estudiar si había diferencias entre los distintos subtipos de LMA según la clasificación de la OMS (Arber et al., 2016) y se observó un incremento significativo en la expresión de PRL y su receptor entre algunos subtipos. La PRL se encuentra sobreexpresada a nivel transcripcional en pacientes con reordenamiento en el gen MLL, presente en un 5-10% de los pacientes (Eisfeld et al., 2017). Por otro lado, se ha observado un incremento del PRLR en pacientes con cariotipo normal, presente en el 45% de los diagnósticos, siendo en el grupo citogenético más común, así como en pacientes con la translocación t(8,21), presente en el 6-8% de los pacientes. Este último grupo citogenético pertenece al *core binding factor* (CBL-AML) de buen pronóstico (Eisfeld et al., 2017). A continuación, se decidió estudiar también la expresión de PRL y PRLR en SMD, ya que es una enfermedad relacionada con la LMA porque presenta características patológicas similares, afecta al linaje mielóide y se transforma a LMA en un porcentaje elevado de casos (Arber et

al., 2016). Se observó un incremento de la expresión génica tanto de PRL como de PRLR en pacientes respecto al grupo control (**Figura 15B**).

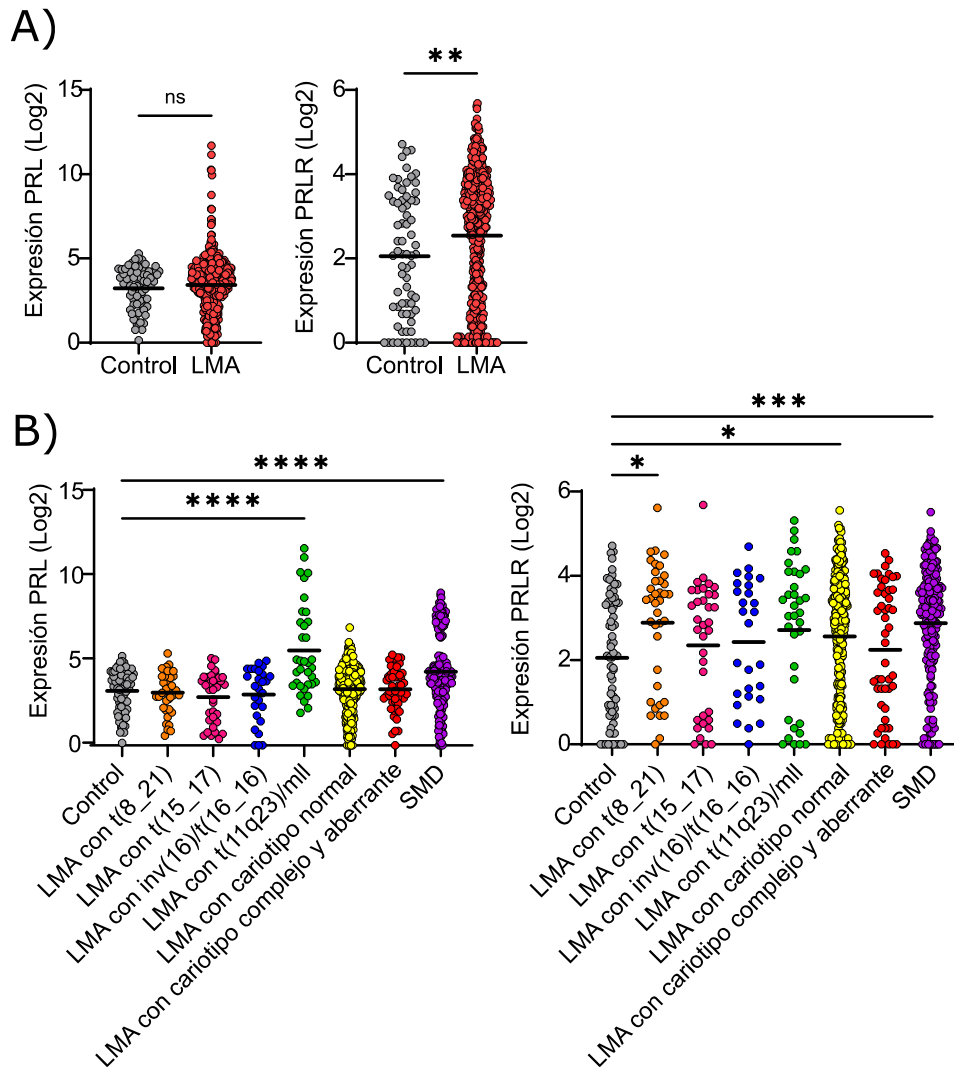


Figura 15. La PRL está sobreexpresada a nivel transcripcional en LMA con translocación de MLL y en SMD y el PRLR está sobreexpresado en LMA y SMD. A) Expresión de PRL (izquierda) y PRLR (derecha) en células primarias hematopoyéticas sanas (gris) y células de LMA (rojo). **B)** Expresión de PRL (izquierda) y PRLR (derecha) en función de los diferentes subgrupos de LMA según la clasificación de la OMS y de SMD. Cada punto indica el valor de expresión de un individuo (Log2) y la barra indica la media de todos los valores obtenidos de la base de datos GSE13159. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ns, no significativo.

Una vez analizada la expresión del receptor y el ligando, se decidió estudiar también la expresión de los principales elementos de la vía de señalización. El PRLR activa, principalmente, la vía Jak/Stat, sobre todo a través de Jak2, Stat3, Stat5a y Stat5b (Brooks, 2012). Las sondas de expresión seleccionadas para obtener los datos fueron 211917_s_at, 209991_at, 203010_at y 212549_at, respectivamente. Aunque no se

observaron diferencias en la expresión génica de Stat3 entre células sanas y células de LMA, sí que se observó un incremento de expresión de Stat5a y una disminución en la expresión génica de Stat5b y Jak2 (**Figura 16**). Esto podría deberse a varios motivos: por un lado, Stat5a es el mensajero secundario preferente de PRLR, mientras que Stat3 está relacionado con múltiples rutas de señalización; por otro lado, la función específica de Stat5a y Stat5b no está clara, pero sí se ha demostrado que no son redundantes, revelando una mayor implicación de Stat5b en las células del linaje linfoide (Maurer et al., 2019) y explicando la disminución de expresión en LMA.

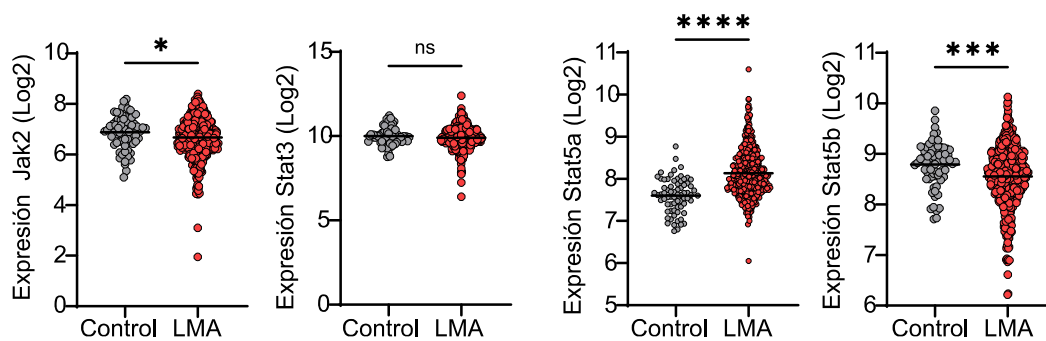


Figura 16. La expresión génica de Stat5a se encuentra incrementada en células de LMA respecto a células hematopoyéticas sanas, mientras que la de Stat5b y Jak2 está disminuida. Datos de la expresión génica en células hematopoyéticas sanas (gris) y células de LMA (rojo) de Jak2, Stat3, Stat5a y Stat5b. Cada punto indica el valor de expresión de un individuo (Log2) y la barra indica la media de todos los valores obtenidos de la base de datos GSE13159. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ns, no significativo.

Uno de los principales problemas clínicos que conlleva el diagnóstico de la LMA son las recaídas, que son frecuentes y tienen un mal pronóstico, y donde las LSCs tienen un papel fundamental (Eppert et al., 2011). Dado que en estas células la expresión de genes implicados en la señalización mediada por PRLR están activados, sería esperable que las muestras de recaídas, enriquecidas en LSCs, tuviesen una mayor regulación mediada por esta ruta de señalización. Por este motivo, se ha analizado la expresión de PRL y PRLR, así como de los elementos de la vía de señalización comentados anteriormente, en el momento del diagnóstico de la enfermedad y en el de la recaída. Para ello, se ha utilizado la base de datos pública GSE66525 y se ha seguido el protocolo publicado por Hackl *et al.* (Hackl et al., 2015). Aunque se ha observado una disminución del ARNm del PRLR, así como de Jak2, la expresión de los efectores intracelulares Stat5a y Stat5b está aumentada en las recaídas respecto al momento del diagnóstico (**Figura 17**).

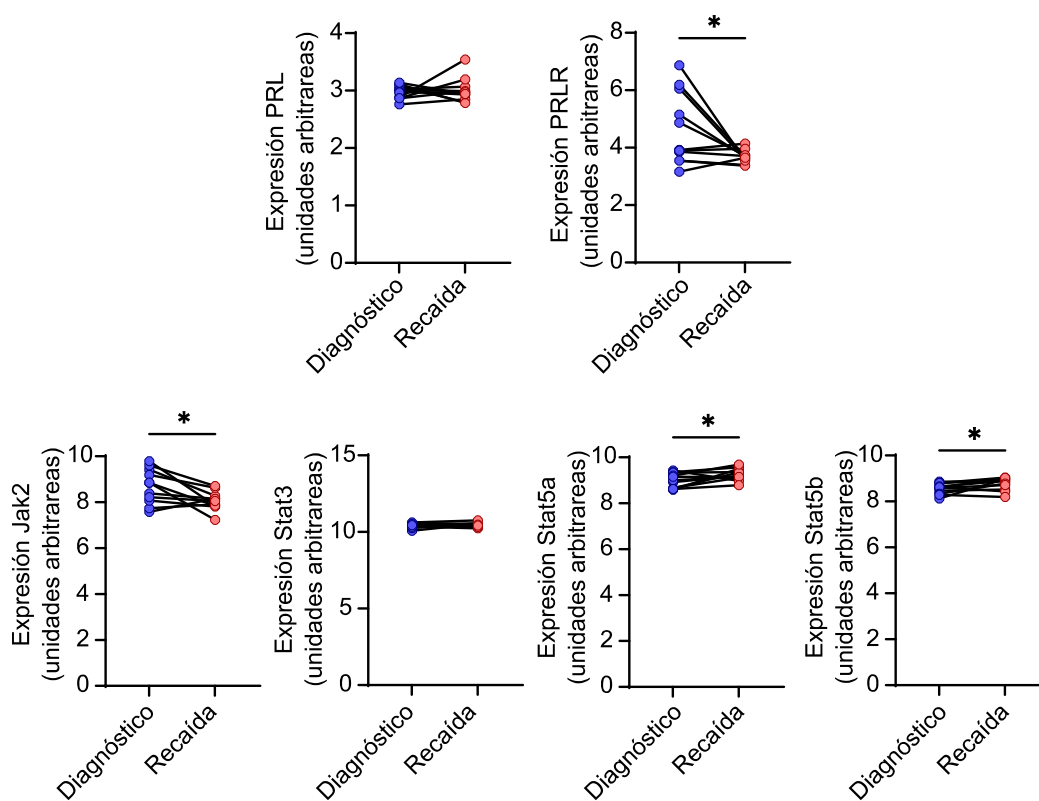


Figura 17. La expresión de PRLR y Jak2 se ve reducida en el momento de la recaída, mientras que la expresión Stat5a/b incrementa. Cada punto indica el valor de expresión de un individuo en unidades arbitrarias obtenidos de la base de datos GSE66525. * $p < 0,05$.

Con el análisis bioinformático de los datos obtenidos de repositorios públicos y la demostración de la sobreexpresión de PRLR en células de neoplasias hematológicas, se decidió analizar la expresión del receptor en superficie mediante citometría de flujo en células hematopoyéticas sanas y de neoplasias hematológicas, permitiendo observar los niveles de proteína, considerada la unidad funcional y, por lo tanto, efectiva en cuanto a señalización. La expresión de PRLR en células sanas se analizó en las MNCs aisladas por gradiente de densidad de capas leucocitarias de donantes sanos y muestras de sangre de cordón umbilical. Estas últimas se deplecionaron para obtener la fracción linaje negativa (lin-), que corresponden a las células hematopoyéticas más primitivas ya que carecen de marcadores de linajes. La expresión del receptor de neoplasias hematológicas se analizó en células hematopoyéticas de sangre periférica de muestras de LMA y de SMD, determinando la población CD45⁺ y el perfil de tamaño y complejidad SSC-FSC adecuado (datos que se obtuvieron en colaboración con otros miembros del laboratorio). Aunque las muestras de neoplasias hematológicas presentan un amplio rango de expresión del receptor, resultados

compatibles con la alta heterogeneidad de la enfermedad, se observa un incremento significativo en este respecto a la expresión en células hematopoyéticas de donantes sanos y de células de sangre de cordón enriquecidas para las fracciones celulares más primitivas (lin⁻), es decir, células madre y progenitores hematopoyéticos (**Figura 18A**). Paralelamente, se analizó la expresión de PRLR en diferentes poblaciones de células sanas, tanto nucleadas (CD45⁺) como en plaquetas (CD45⁻/CD41a⁺). Dentro de la población CD45⁺, se seleccionaron subpoblaciones hematopoyéticas mieloides (CD11c⁺, CD14⁺, CD15⁺, CD33⁺ y CD13⁺), linfocitos B (CD19⁺), linfocitos T (CD3⁺), células NK (CD2⁺/CD56⁺) y monocitos (CD14^{int}/CD16^{int}, CD14⁻/CD16⁺ y CD14⁺/CD16⁻). Los resultados obtenidos agrupan las células en tres grupos distintos según la expresión de PRLR. La expresión del receptor en células de linaje linfocitario T y en plaquetas no supera el 30%, considerándose bajo; por otro lado, las células del linaje linfocitario B expresan niveles intermedios, que rondan del 30 al 60% de células positivas para PRLR; y, por último, el linaje mielocítico expresa niveles más altos de receptor, superando el 60% de células positivas (**Figura 18B**).

Una vez observado el incremento de PRLR en células leucémicas y el incremento de expresión en el linaje mielocítico, se decidió analizar la expresión del receptor en función de la población hematopoyética CD45⁺. Aunque se seguía observando una elevada heterogeneidad en cuanto a la expresión de PRLR, se observa que la población CD45^{low}, correspondiente a la población leucémica, presenta una expresión de receptor en superficie mayor que la población CD45^{high}, representativa de la población linfocítica sana, corroborando los datos de bioinformática que demuestran la sobreexpresión de PRLR en células leucémicas. Además, el incremento de expresión significativo respecto a los linfocitos control (CD45⁺) nos muestra que la expresión de PRLR es específica de las células transformadas (**Figura 18C**). La sobreexpresión en la población CD45⁺ leucémica (CD45^{low}) nos llevó a agrupar las muestras de LMA según distintos factores: sexo del paciente, procedencia de la muestra, riesgo citogenético, refractariedad de la muestra y clasificación de la OMS (Arber et al., 2016). La concentración de PRL en sangre es más elevada en mujeres que en hombres y, además, tiene un papel fisiológico más relevante (Patil et al., 2013). Sin embargo, a nivel de expresión en LMA, no aparecen diferencias en la expresión de PRLR por

sexo, sugiriendo que, probablemente, su señalización no se vea afectada por el ligando. La procedencia de la muestra, médula ósea o sangre periférica, no presenta diferencias en cuanto a expresión del receptor, de manera que no se ve afectada por la movilización y es una característica intrínseca de la célula. En función del riesgo citogenético no se observan cambios significativos, aunque se observa una tendencia a una menor expresión de PRLR en los pacientes de riesgo más alto, lo que concordaría con los datos de expresión de ARNm de los repositorios de diagnóstico y recaída, donde se observaba una menor expresión de PRLR en el momento de la recaída respecto al diagnóstico. En cuanto a la sensibilidad a quimioterapia, no se observan diferencias significativas en la refractariedad de la muestra, aunque sí una tendencia al incremento de la expresión de PRLR en los pacientes refractarios compatible con los datos bioinformáticos iniciales, ya que la refractariedad está asociada a una mayor frecuencia de LSCs. Por último, parece que se observa un aumento de expresión de PRLR en muestras con NPM1 mutada, según la clasificación de la OMS (Arber et al., 2016), aunque el número dispar de muestras dificulta una conclusión sólida (**Figura 18D**). En resumen, en lo que respecta a las muestras de LMA y la expresión de PRLR en superficie, observamos un incremento de la expresión en células leucémicas respecto a las muestras de donantes sanos, así como las poblaciones de células linfoides sanas de los pacientes de LMA. Además, el receptor se encuentra ligeramente aumentado en muestras refractarias y disminuido en los casos clínicos adversos, en concordancia con los datos bioinformáticos anteriores.

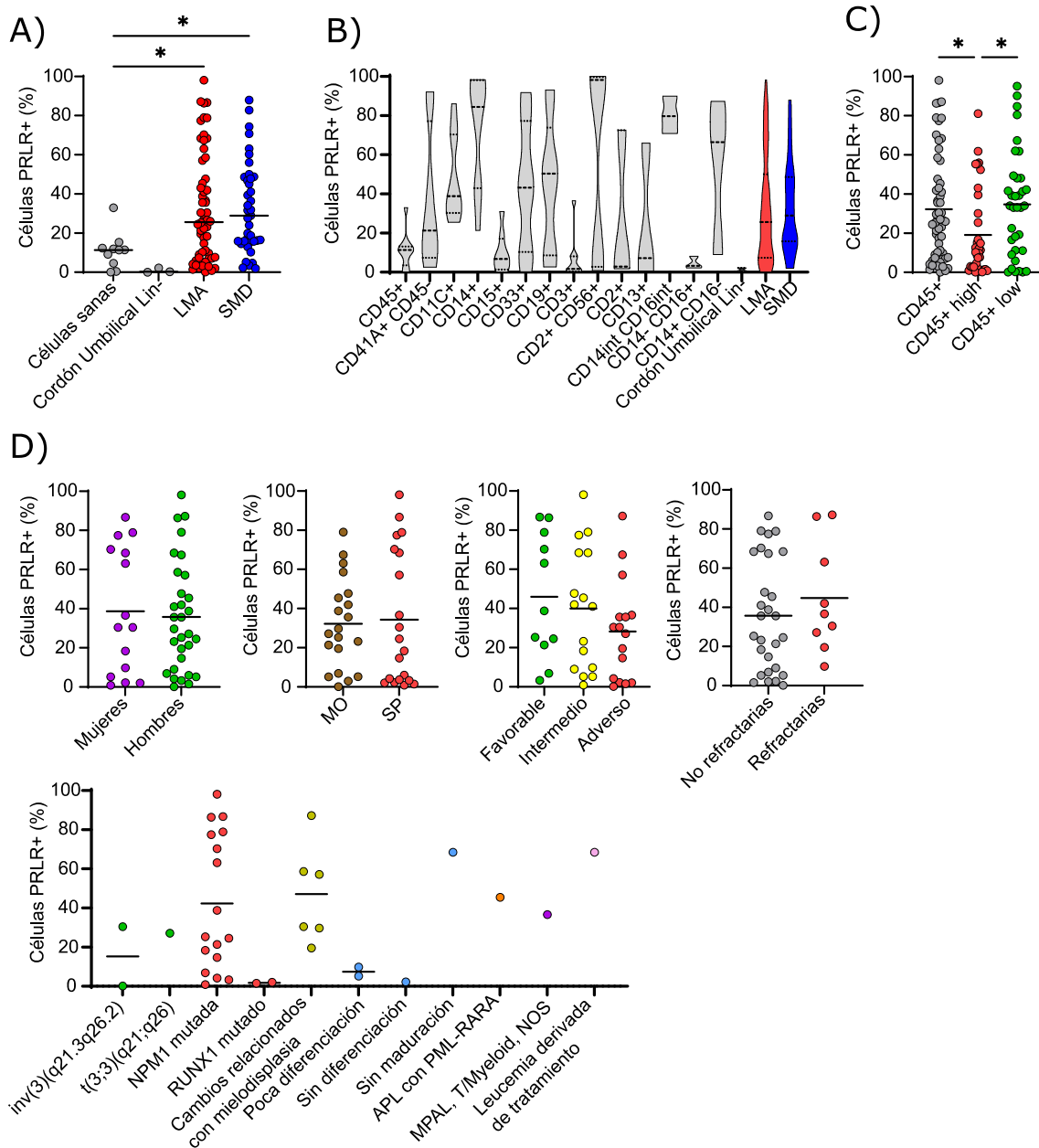


Figura 18. Las células de neoplasias hematológicas expresan niveles mayores de PRLR en superficie respecto a células hematopoyéticas sanas. La expresión de PRLR en superficie se analizó mediante citometría de flujo. **A)** Expresión de PRLR en superficie dentro de la población CD45⁺ de células de donantes sanos (gris), de sangre de cordón lin(gris), LMA (rojo) y SMD (azul). **B)** Expresión de PRLR en superficie analizada en las diferentes poblaciones hematopoyéticas de las muestras de donantes sanos (gris) en comparación con las células de LMA (rojo) y SMD (azul). **C)** Expresión de PRLR en superficie de las diferentes poblaciones de CD45⁺ en células de LMA; CD45⁺ total (gris) CD45^{high} corresponde a los linfocitos sanos (rojo) y CD45^{low} a los blastos leucémicos (verde). **D)** Expresión de PRLR en distintos subgrupos de células de LMA: sexo del paciente, procedencia de la muestra (MO: médula ósea (marrón) y SP: sangre periférica (rojo)), riesgo citogenético, refractariedad y clasificación según la OMS (Arber et al., 2016). Cada punto indica el valor de expresión de un individuo en porcentaje de células positivas para PRLR y la barra indica la media de todos los valores. *p<0,05.

Como se ha comentado anteriormente, dada la similitud entre la LMA y los SMD en las características patológicas y la afectación del linaje mielóide, entre otras, se decidió estudiar la expresión de PRLR en superficie en las muestras primarias de SMD. Además, se ha observado un incremento significativo en la expresión del receptor en las muestras de SMD tanto a nivel de ARNm como a nivel de proteína en superficie. El análisis de las distintas poblaciones CD45⁺ en las muestras primarias de SMD determinó que la población CD45^{low} (población leucémica) presenta una expresión de PRLR mayor que la población CD45^{high} (población linfóide sana) y que es específica de las células leucémicas (**Figura 19A**), corroborando, una vez más, los datos bioinformáticos previos respecto a la expresión génica. Dado que los resultados se asemejaban a los obtenidos con las muestras de LMA, se decidió seguir el mismo proceso y analizar la expresión del receptor en distintas clasificaciones: según el nivel de pronóstico siguiendo el sistema IPSS-R (Greenberg et al., 2012) y según la clasificación de la OMS (Arber et al., 2016). Aunque la clasificación según el riesgo citogenético no muestra diferencias significativas, sí que se observa una tendencia a incrementar la expresión de PRLR cuando el riesgo es más desfavorable (intermedio y adverso), coincidiendo con las muestras de pacientes que tienen una mayor probabilidad de transformación a LMA, considerándose más cercanas a esta patología. En cuanto a la clasificación según la OMS, se observa una elevada expresión de PRLR (40% de células positivas) en la mayoría de los subgrupos, excepto en los pacientes con delección 5q (**Figura 19B**). Aun así, la heterogeneidad interpaciente, la falta de datos clínicos y las pocas muestras analizadas de SMD impiden que las conclusiones sean suficientemente robustas.

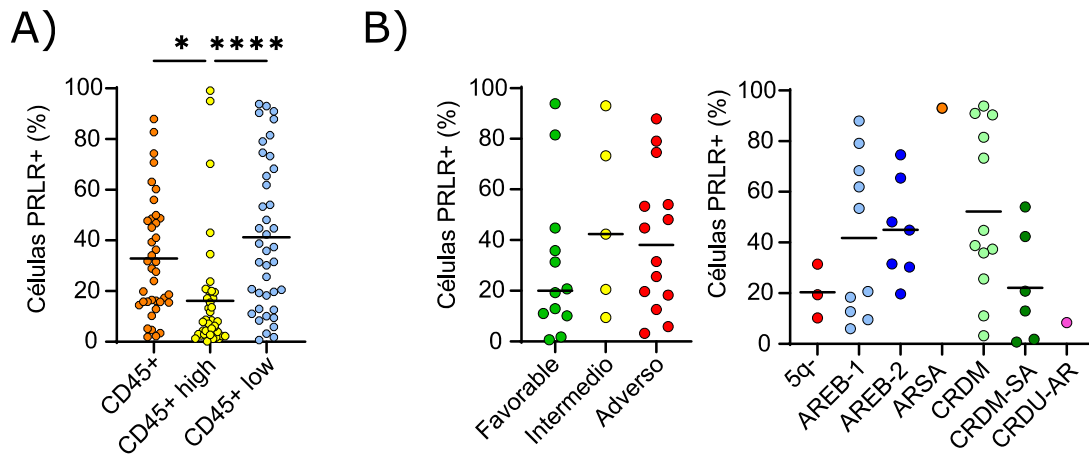


Figura 19. Las células de muestras primarias de SMD expresan niveles mayores de PRLR en células leucémicas CD45^{high} y en pacientes con riesgo citogenético mayor. La expresión de PRLR en superficie se analizó mediante citometría de flujo. **A)** Expresión de PRLR en superficie de las diferentes poblaciones de CD45+ en células de SMD. **B)** Expresión de PRLR en distintos subgrupos de células de SMD: riesgo citogenético (IPSS-R) y clasificación según la OMS (Arber et al., 2016). Cada punto indica el valor de expresión de un individuo en porcentaje de células positivas para PRLR y la barra indica la media de todos los valores. * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$.

Además de la expresión en superficie de PRLR, también se analizó la cantidad de proteína total contenida en las células. Para ello, se usaron tres muestras primarias de LMA y dos de sangre periférica procedentes de capas leucocitarias y se analizó la cantidad de PRLR mediante western blot. Se observó, igual que en superficie, que la cantidad de PRLR varía entre las muestras de LMA, pero está incrementada respecto a las muestras de donantes sanos (**Figura 20**).

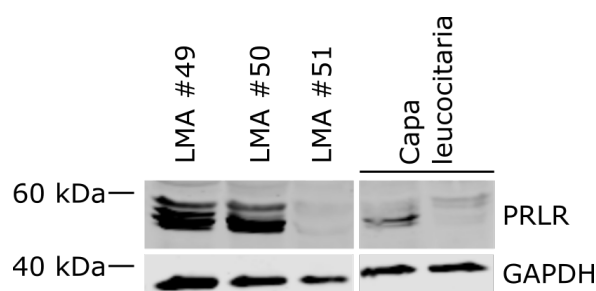


Figura 20. La expresión de PRLR a nivel de proteína en muestras neoplásicas varía entre distintos pacientes, pero es superior a la observada en muestras de células hematopoyéticas sanas. Se realizó un western blot con los anticuerpos de PRLR humano y GAPDH como control de carga.

La disponibilidad de muestras primarias es limitada, así que para poder caracterizar el papel de la PRL y PRLR en las neoplasias hematológicas se decidió comparar la expresión observada en estas muestras con la presente en líneas celulares

correspondientes. La expresión de PRLR se analizó en superficie por citometría de flujo en diferentes líneas celulares de distintas neoplasias, tanto mieloides como linfoides. Aunque se observa una elevada variabilidad en la expresión, sigue siendo consistente una mayor expresión en líneas celulares mieloides respecto a linfoides **(Figura 21)**. Aunque hasta el momento se han analizado varios parámetros relacionados con el PRLR en LMA y en SMD, a partir de este punto se decidió focalizar el estudio únicamente en la LMA, ya que el cribado inicial se realizó con líneas celulares de esta neoplasia hematológica y, además, la disponibilidad de líneas celulares y modelos de xenotrasplante permiten estudiar la enfermedad a nivel *in vitro* e *in vivo*. Los SMD, aunque están relacionados con la LMA, se descartaron porque representan un grupo mucho más heterogéneos de enfermedades y, además, su estudio se ve dificultado ya que la única línea celular descrita representativa de la enfermedad, la MDS-L (Rhyasen et al., 2014), no expresa PRLR **(Figura 21C)**.

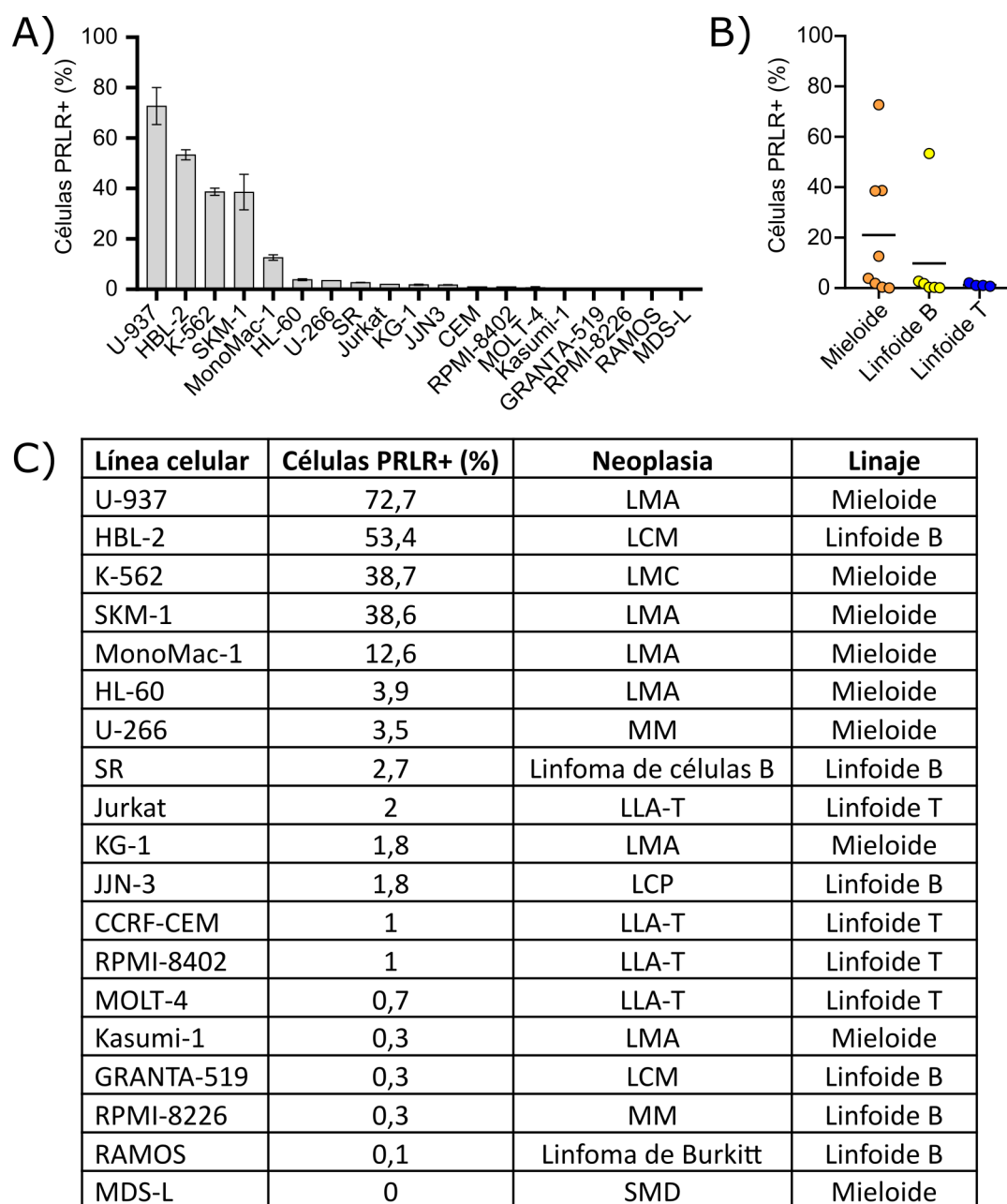


Figura 21. Expresión en superficie de PRLR en líneas celulares de neoplasias hematológicas. La expresión de PRLR se analizó mediante citometría de flujo y está representada como el porcentaje de células que expresan el receptor en líneas celulares de neoplasias hematológicas **A)** individualmente (donde cada barra representa la media de triplicados de tres experimentos independientes \pm SEM) y **B)** agrupadas por linaje mieloides o linfoides B y T (cada punto indica la expresión de PRLR de una línea celular) **C)** La tabla recoge los datos numéricos obtenidos del análisis de expresión, así como información sobre el tipo de neoplasia y el linaje perteneciente de cada línea celular. LMA, leucemia mieloides aguda; LCM, linfoma de células del manto; LMC, leucemia mieloides crónica; MM, mieloma múltiple; LLA-T, leucemia linfoblástica aguda T; LCP, leucemia de células plasmáticas; y SMD, síndromes mielodisplásicos.

4.2.2. Caracterización del papel de la vía de señalización PRL:PRLR en LMA

Aunque hay una gran heterogeneidad entre las muestras, se observa un incremento significativo en PRLR respecto a las muestras de donantes sanos. Por lo tanto, se ha estudiado la importancia tanto del receptor como de su ligando natural, la PRL, en la LMA mediante experimentos de pérdida y ganancia de función en líneas celulares. Para poder estudiar el papel del ligando y su receptor, se han generado líneas celulares de LMA que sobreexpresan la forma activa de cada uno de ellos, así como un dominante negativo. Se ha estudiado por separado qué efectos tienen la activación del receptor mediante estímulo externo, así como la activación basal de cada forma transducida.

Para poder estudiar las funciones de la PRL, las líneas celulares de LMA MonoMac-1, HL-60 y SKM-1 se transdujeron con la forma silvestre de ésta (PRL wt) y una forma mutada (PRL mut), incapaz de iniciar la transducción de señal, con la ayuda de un vector bicistrónico, permitiendo que la PRL no esté fusionada a ningún elemento y con expresión simultánea de GFP para validar la transducción. Las modificaciones de la PRL aplicadas para conseguir PRL mut se describieron en 1996 por Goffin y se modificaron en 2003 por Bernichtein (Bernichtein et al., 2003; Goffin et al., 1996) y permiten que la PRL actúe como un antagonista del receptor, ya que la sustitución del residuo Glicina en el puesto 129 por una Arginina (del-1-9-G129R) impiden la dimerización de receptor y la consecuente activación y transducción de señal sin afectar a la secreción de PRL (**Figura 22A**). El éxito de la transducción se validó mediante la expresión de GFP, superior al 90% en todos los casos, por citometría de flujo (**Figura 22B**). Una vez confirmado el éxito de la transducción, se comprobó mediante el análisis de la proteína total de PRLR por western blot que la transducción no había producido cambios en la modulación del receptor, de manera que los efectos diferenciales observados fuesen exclusivamente por la expresión diferencial de PRL (**Figura 22C**). Seguidamente, se intentaron analizar los niveles de PRL en el sobrenadante y los lisados celulares por ELISA, pero los valores estaban por debajo del límite de detección de la técnica (*PRL (Human) ELISA kit*, con un límite de detección de 2ng/mL). También se intentó determinar la concentración de PRL por

western blot, pero no se consiguió ver ninguna banda, posiblemente por las cantidades tan bajas del péptido. Una vez vista la imposibilidad de detectar los niveles de PRL mediante distintas técnicas, se decidió validar la funcionalidad de las transducciones con un ensayo de señalización para determinar qué tipo de señalización se daba en cada una de las formas de PRL transducidas. Para ello, se utilizó el vector reportero pGL4-CISH, que contiene el promotor del gen CISH, un elemento respuesta de PRL con cuatro sitios de unión distintos para Stat5, siendo rápidamente activado frente al estímulo de la PRL e indicativo de la señalización PRL/Jak2/Stat5 (Fang et al., 2008). Las células HEK-293T se cotransfectaron con pEF-vacío (HisA), -PRL wt o -PRL mut, junto con pEF-PRLR wt y el vector reportero pGL4-CISH. Se observó un aumento de la señalización en el caso de la cotransfección con PRL wt, pero no con PRL mut, indicativo de la activación productiva de PRLR a través de su ruta canónica Jak2/Stat5. Como era esperable, PRL mut no induce la activación de la señalización mediada por Jak2/Stat5 (Bernichtein et al., 2003; Chen et al., 1999; Goffin et al., 1996), actuando como un antagonista/inhibidor de la señalización del receptor (**Figura 22D**). Estos resultados validan la utilidad del sistema para el estudio del efecto de PRL en células leucémicas.

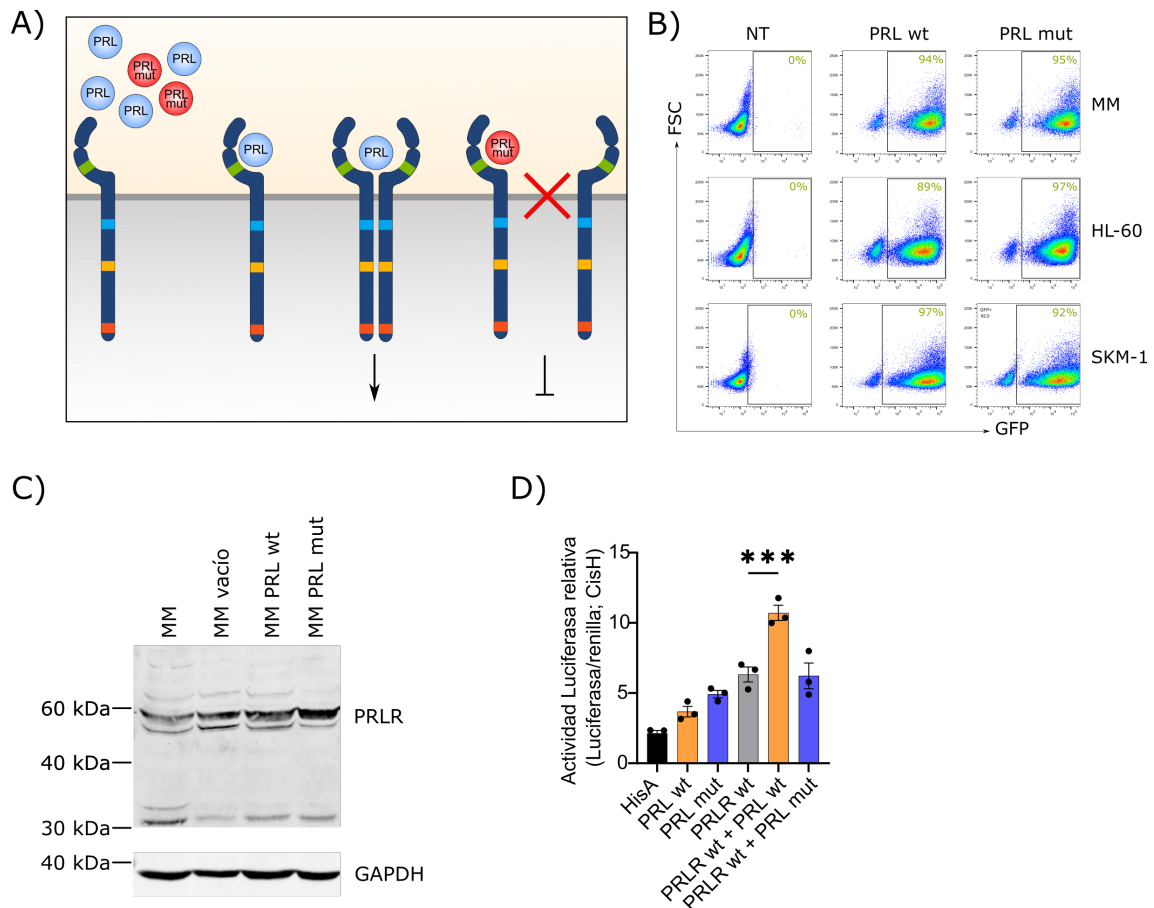


Figura 22. La forma PRL wt, pero no PRL mut, induce señalización a través de la vía Jak2/Stat5. A) Representación de la señalización con las dos formas de PRL; la PRL wt (azul) permite iniciar la transducción de señal, mientras que PRL mut (roja) no señaliza a través del receptor. **B)** Las células MonoMac-1 (MM), HL-60 y SKM-1 se transdujeron con las formas pULTRA vacío o con las formas PRL wt y PRL mut. Se analizó el porcentaje de transducción mediante la expresión de GFP por citometría de flujo. El porcentaje de células transducidas se expresa en porcentaje de células en color verde y se comparó con las células no transducidas (NT). **C)** Se analizaron los posibles cambios en el PRLR mediante western blot hibridando con anticuerpos específicos de PRLR y GAPDH como control de carga. **D)** Las células HEK-293T se cotransfectaron con pEF-PRLR wt o el vector vacío (pEF-HisA) y con las formas pEF-PRL wt y -PRL mut, junto con el vector reportero CISH para determinar la señalización activada. La actividad luciferasa se muestra como una ratio de luciferasa/renilla. Las barras indican la media de la ratio luciferasa/renilla de triplicados de tres experimentos independientes, donde cada punto es el valor de la media de cada experimento \pm SEM. *** $p < 0,001$.

Para poder estudiar los efectos de ganancia y pérdida de función del PRLR, las líneas celulares de LMA MonoMac-1, HL-60 y SKM-1 se transdujeron con dos isoformas del PRLR: la isoforma salvaje (PRLR wt) y la isoforma corta 1b o short 1b (PRLR short). La isoforma short actúa como un dominante negativo debido a su corto dominio intracitoplasmático que carece de los dominios Box 2 y C-terminal, imprescindibles para la interacción con el dominio SH2 que promueve la unión a los

factores de transcripción Stat3 y Stat5. Estas modificaciones permiten la dimerización del receptor, pero no la transducción de señal (Hu et al., 2001) (**Figura 23A**). El éxito de la transducción se cuantificó mediante la expresión de GFP analizada por citometría de flujo, siendo aproximadamente del 100% en MonoMac-1 y HL-60 y del 50% en SKM-1 (**Figura 23B**). Seleccionando la población GFP⁺, se analizó la expresión de PRLR de las diferentes transducciones y se observó un incremento en ésta en las tres líneas celulares, demostrando la expresión en superficie de las isoformas transducidas (**Figura 23C**). Dado que por citometría de flujo sólo podemos detectar el dominio extracitoplasmático, idéntico en las dos isoformas, se realizó un western blot para observar la presencia relativa de cada una de las isoformas con respecto a la expresión endógena. Aunque sólo pudimos detectarlo en MonoMac-1 y HL-60, se observa la isoforma larga y la corta en las transducciones correspondientes (**Figura 23D**). Por último, se analizó la expresión de las isoformas por RT-PCR semi-cuantitativa usando cebadores específicos, observándose un incremento en la expresión génica de la isoforma sobreexpresada (**Figura 23E**). Estos resultados validan que las líneas celulares generadas poseen las propiedades necesarias para estudiar la funcionalidad del PRLR en la LMA.

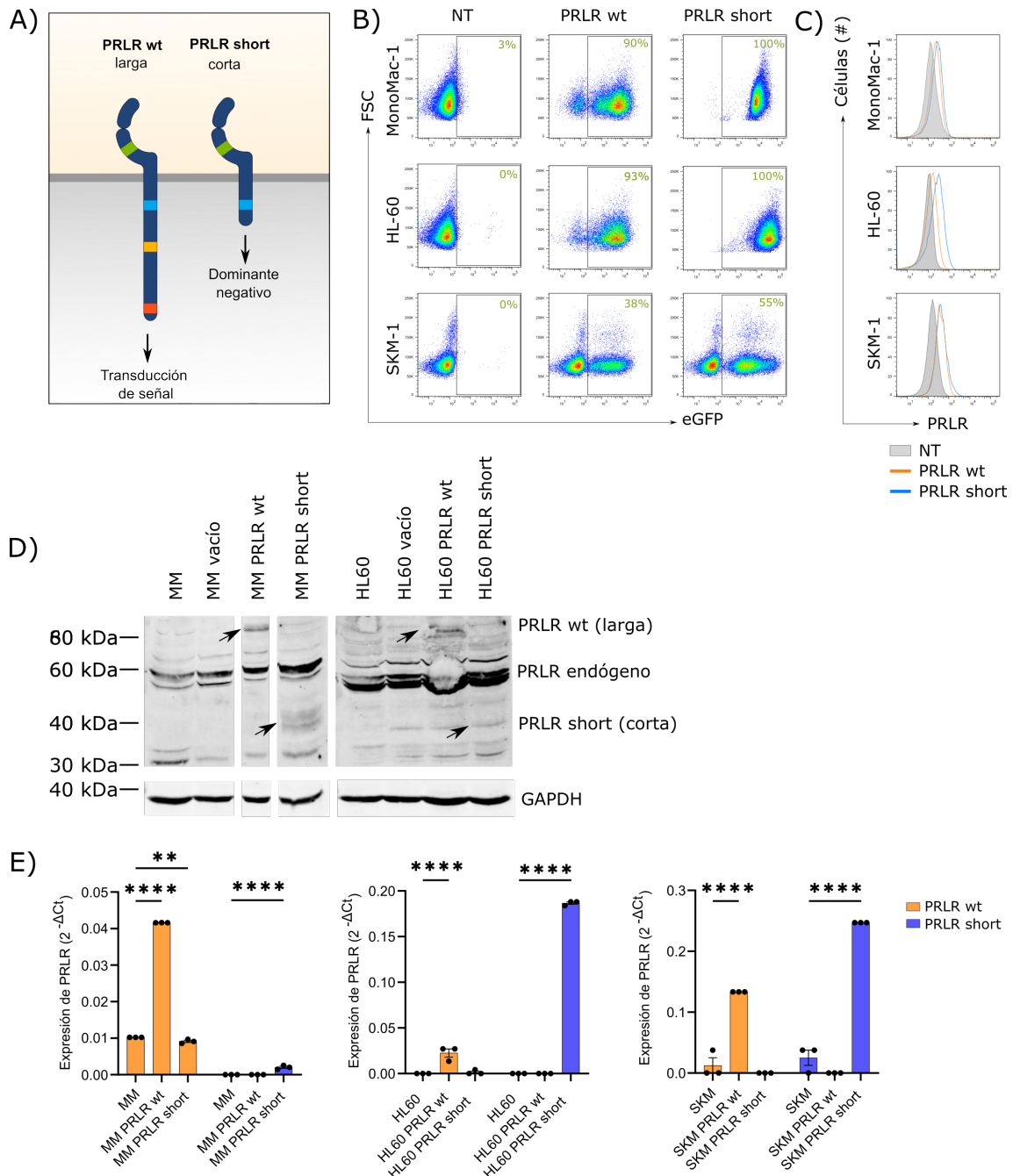


Figura 23. Las transducciones de PRLR wt y short sobreexpresan la isoforma correspondiente en todas las validaciones realizadas. A) Representación de la isoforma de PRLR wt y short y su señalización. Las células MonoMac-1 (MM), HL-60 y SKM-1 se transdujeron con las isoformas pULTRA vacía y con la isoforma PRLR wt y PRLR short. Se analizó el porcentaje de **B)** células GFP+ y **C)** células PRLR+ dentro de la población GFP+ mediante citometría de flujo. **D)** Determinación de la cantidad de proteínas de las diferentes isoformas mediante western blot en MonoMac-1 (izquierda) y HL-60 (derecha) con el anticuerpo de PRLR humano y el GAPDH como control de carga. **E)** Expresión génica de las diferentes isoformas transducidas analizada por RT-PCR semi-cuantitativa. Los histogramas representan la expresión de PRLR dentro de la población GFP+. Los gráficos de barras representan la media de expresión génica de tres réplicas de tres experimentos independientes \pm SEM respecto al control y al gen de referencia GAPDH. **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001.

4.2.2.1. Estudio de la señalización basal del PRLR

Para entender el papel del PRLR en la LMA, se analizó la señalización basal activada por las isoformas PRLR wt y short. Se utilizó un ensayo de señalización mediante la cotransfección de un vector vacío (pEF-HisA) y las dos isoformas de PRLR (pEF-PRLR wt y -PRLR short), junto con los vectores de elemento respuesta a AMPc (CRE, señalización PI3K-Akt), a suero (SRE, señalización MEK-Erk), a Stat3 (pTATA, señalización Stat3) y a Stat5 (CISH, señalización Jak2/Stat5) acoplados a luciferasa. Primero de todo, se comprobó que las transfecciones de los plásmidos con las isoformas de PRLR fueron eficientes y en niveles equivalentes para ambas isoformas por western blot hibridando los anticuerpos específicos de PRLR y de GAPDH como control de carga (**Figura 24A**). En cuanto al ensayo de señalización por luciferasa, la ratio luciferasa/renilla nos indica que existe una activación hasta seis veces mayor de la señalización mediada por Jak2/Stat5 (CISH) respecto a las otras vías estudiadas. En cuanto a las vías de PI3K-Akt (CRE), MEK-Erk (SRE) y Stat3 (pTATA) se observa una activación significativa en las células transducidas con las isoformas de PRLR, pero muy residual, ya que el eje se ha adaptado para ver la activación, pero es mínima (**Figura 24B**). En resumen, la sobreexpresión de las isoformas PRLR wt y PRLR short en el contexto leucémico promueven, sobre todo, la señalización vía Jak2/Stat5. Dado que la isoforma corta tiene una capacidad de señalización prácticamente nula, estos resultados sugieren una interacción entre la isoforma larga y corta, permitiendo una activación de las vías de señalización vinculadas a Jak2/Stat5 (Bole-Feysot et al., 1998; Clevenge & Kline, 2001).

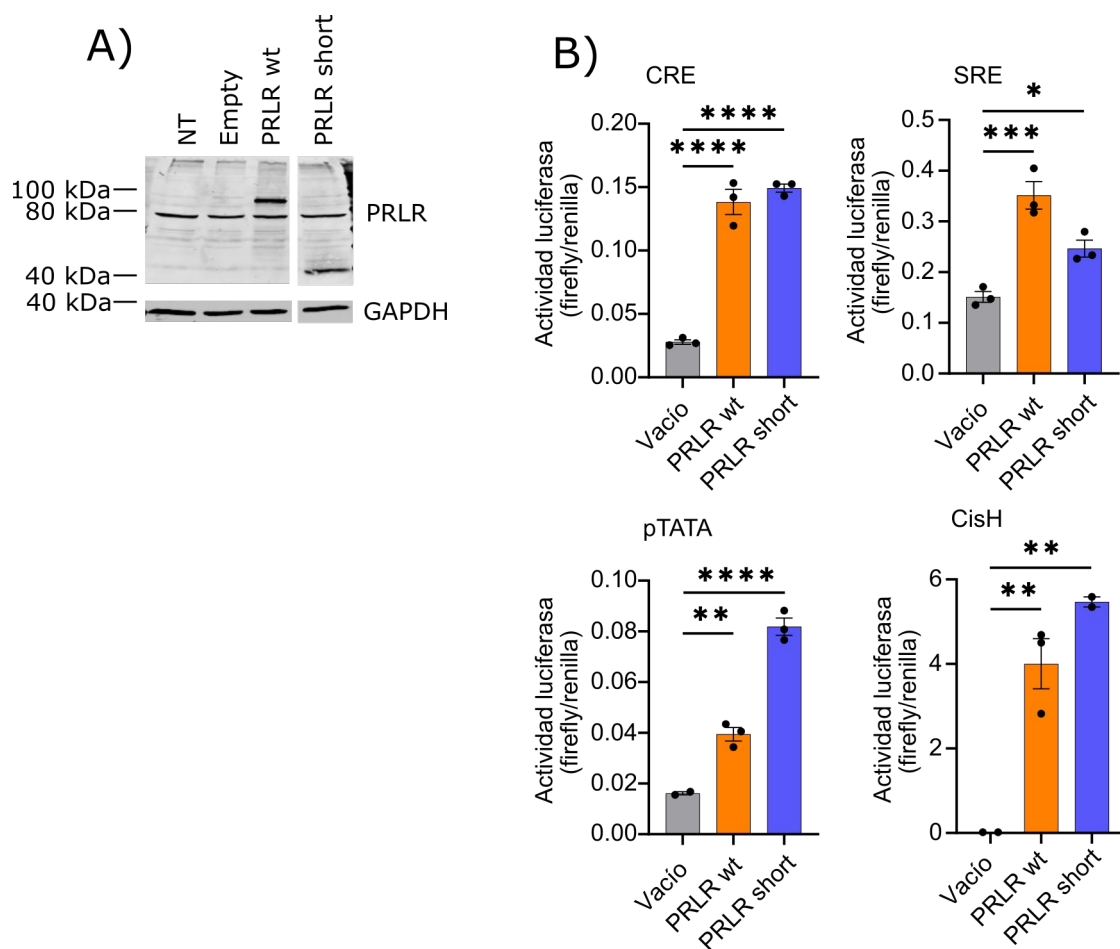


Figura 24. La isoforma PRLR wt y short activan mayoritariamente la vía de señalización Jak2/Stat5. A) Las transfecciones con los vectores pEF-HisA (vacío) y pEF-PRLR wt y -PRLR short se validaron por western blot. **B)** La actividad luciferasa se analizó mediante la ratio de luciferasa/renilla en el vector vacío y las isoformas PRLR wt y PRLR short gracias al sensor contenido en el plásmido y especificado en el título de los gráficos (CRE, SRE, pTATA y CISH). Las barras representan la media de triplicados de tres experimentos independientes \pm SEM; cada punto representa la media de un experimento. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

4.2.2.2. Estudio de la señalización de PRLR tras su activación con el ligando

Dado que la activación del receptor en estado basal promueve la activación de diferentes vías de señalización, se decidió usar el ligando y un antagonista para estudiar más a fondo la vía de señalización en LMA bajo activación e inhibición del receptor. Anteriormente, y para poder validar los resultados del cribado *in silico*, se usó bromocriptina, un agonista del receptor de dopamina y, por lo tanto, inhibidor de la secreción de PRL (**apartado 4.2**). Aun así, se ha observado que la bromocriptina sólo limita la secreción de PRL pituitaria, dejando los niveles de la extrapituitaria sin modificaciones (Johansen et al., 1986). Por lo tanto, se seleccionó el antagonista del 1-9-G129R (G129R) descrito por Goffin en 1996 y modificado por Bernichtein en

2003, un péptido que contiene la misma mutación que la forma PRL mut transducida en las células leucémicas, permitiendo la dimerización del receptor, pero no la transducción de señal (Bernichtein et al., 2003; Chen et al., 1999; Goffin et al., 1996).

En primer lugar, se utilizó de nuevo un ensayo de señalización mediante la cotransfección de un vector vacío (pEF-HisA) y las dos isoformas de PRLR (pEF-PRLR wt y -PRLR short), junto con los vectores de elemento respuesta a AMPc (CRE, señalización PI3K-Akt), a suero (SRE, señalización MEK-Erk), a Stat3 (pTATA, señalización Stat3) y a Stat5 (CISH, señalización Jak2/Stat5) en células HEK-293T. El tratamiento con G129R, el antagonista de PRLR, no promueve la activación de ninguna de las vías de señalización estudiadas, ya que no se observan incrementos significativos en los elementos respuesta. En cambio, el tratamiento con PRL sí que promueve la activación de las vías, aunque sólo cuando se expresa la isoforma PRLR wt, demostrándose que el efecto del tratamiento con PRL es dependiente del PRLR y no de una acción de la PRL sobre el receptor. Los sensores SRE (MEK-Erk) y pTATA (Stat3) no se ven modificados por ninguno de los tratamientos, mientras que CRE (PI3K-Akt) sí que presenta un incremento significativo en la isoforma PRLR wt bajo tratamiento con PRL, aun así, los niveles son tan bajos que es posible que no tenga relevancia biológica. Por último, respecto al sensor CISH (Stat5) se observa un aumento basal en las dos isoformas, pero sólo la isoforma PRLR wt responde al tratamiento con PRL, mientras que el antagonista no lo hace (**Figura 25**). En resumen, la vía de señalización Jak2/Stat5 es la principal vía activada tanto a nivel basal, donde observamos un aumento del sensor en la isoforma salvaje y short, como bajo tratamiento con el ligando, donde sólo se ve afectada la isoforma PRLR wt. Además, ninguna de las formas de receptor responde al antagonista. Estos resultados nos validan que todas las isoformas se comportan como esperábamos.

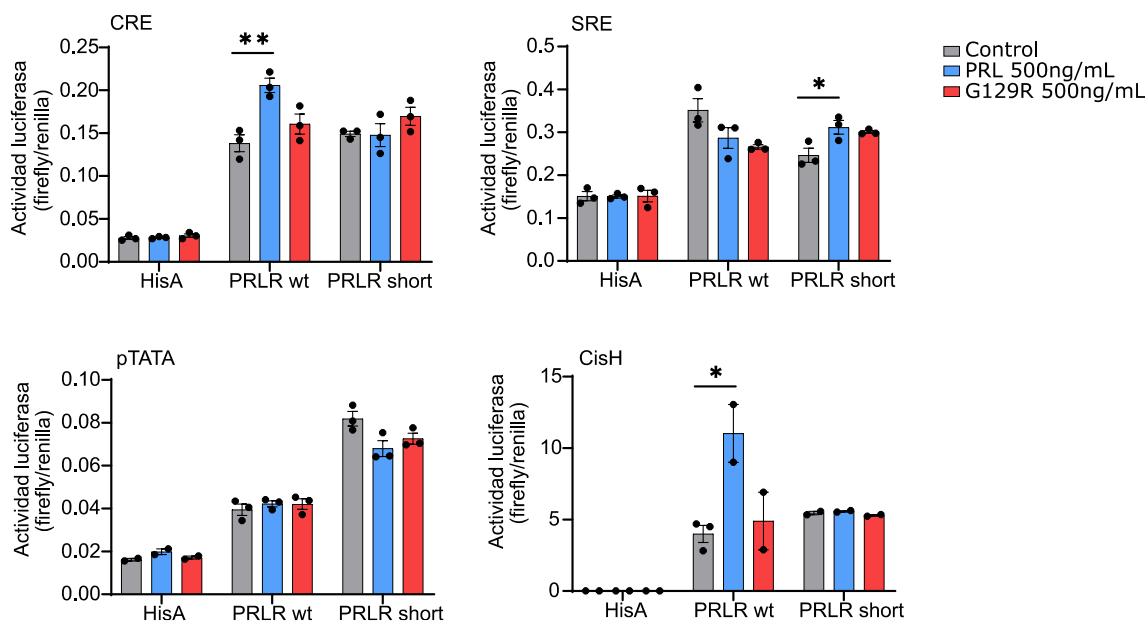


Figura 25. La PRL, pero no G129R, activan la señalización mediada por Jak2/Stat5, principalmente, cuando las células sobreexpresan la isoforma PRLR wt. Las células HEK-293T cotransfectadas con los vectores pEF-vacío, -PRLR wt y -PRLR short se trataron 48h con un vehículo, PRL 500ng/mL o G129R 500ng/mL. La actividad luciferasa se analizó mediante la ratio luciferasa/renilla. Las barras indican la media de la ratio luciferasa/renilla en triplicados de tres experimentos independientes, donde cada punto es el valor de la media de cada experimento \pm SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Aunque la señalización de Stat3 no se veía afectada por el tratamiento, dado que es una vía canónica en las células de LMA (Frank, 2007), se decidió estudiarla más en profundidad, junto con la vía de Jak2/Stat5. Se analizó la activación de Stat3 y Stat5 por el tratamiento de PRL o G129R mediante la cuantificación de proteína fosforilada relativa en función de la proteína total. Células MonoMac-1 no transducidas y transducidas con PRLR wt se trataron 2h con un vehículo, PRL y G129R, se extrajo proteína y se realizó un western blot donde se utilizaron anticuerpos para reconocer pStat3, pStat5 y sus respectivas proteínas totales, así como GAPDH como control de carga. No se observaron cambios en cuanto al pStat3/Stat3, corroborando los datos de expresión génica y sugiriendo que no está implicada en la transducción de señales a partir de PRLR en el contexto de la LMA. En cambio, sí que se observó un incremento de pStat5/Stat5, resultado esperable gracias a los datos de expresión génica y de los ensayos de luciferasa (**Figura 26A**). Esto nos llevó a analizar detalladamente la activación de la vía de Jak2/Stat5, así que se realizó un nuevo experimento de señalización mediante la cotransfección de pEF-PRLR wt y -PRLR short en células HEK-293T, junto con el elemento de señalización CisH (Jak2/Stat5)

y, en este caso, se trató 24h con un vehículo y con dosis crecientes de PRL y G129R. Se observó una activación dosis-dependiente de la señalización de Jak2/Stat5 sólo cuando teníamos presencia de PRLR wt (**Figura 26B**). Paralelamente, para poder observar si el aumento de señalización era debido a un incremento en la fosforilación de Stat5 y si era dosis-dependiente, células MonoMac-1 no transducidas y transducidas con PRLR wt se trataron 2h con un vehículo, PRL o G129R a dosis crecientes, se extrajo proteína y se realizó un western blot que se hibridó con pStat5, Stat5 y GAPDH. Las proteínas se cuantificaron y la ratio pStat5/Stat5 revela un incremento en la fosforilación dosis-dependiente de PRL, pero no de G129R. También se observa un incremento en la cantidad de proteína Stat5 total bajo tratamiento con PRL (**Figura 26C**). Por último, se quiso observar si el Stat5 fosforilado seguía la ruta de señalización descrita y era internalizado en el núcleo de la célula para llevar a cabo sus funciones sobre la regulación génica. Las líneas celulares MonoMac-1 no transducidas y transducidas con PRLR wt y PRLR short se trataron 2h con un vehículo, PRL o G129R, se extrajo la fracción nuclear de proteína y se realizó un western blot, donde se utilizaron los anticuerpos pStat3, pStat5 y sus respectivas proteínas totales, así como GAPDH como control de carga. Como era esperable, no se observaron cambios en la fosforilación de Stat3 en ninguna de las condiciones estudiadas, pero sí que se observó un aumento de la fosforilación de Stat5, acompañado de un aumento de Stat5 total, igual que en la fracción celular total (**Figura 26D**). Estos resultados nos indican que la vía mayormente activada mediante el PRLR en el contexto leucémico es la vía PRLR/Jak2/Stat5, que permite activar la transcripción de elementos en el núcleo. Además, se ha validado el papel dominante negativo que posee la isoforma PRLR short, ya que no se observa activación alguna de las vías de señalización estudiadas.

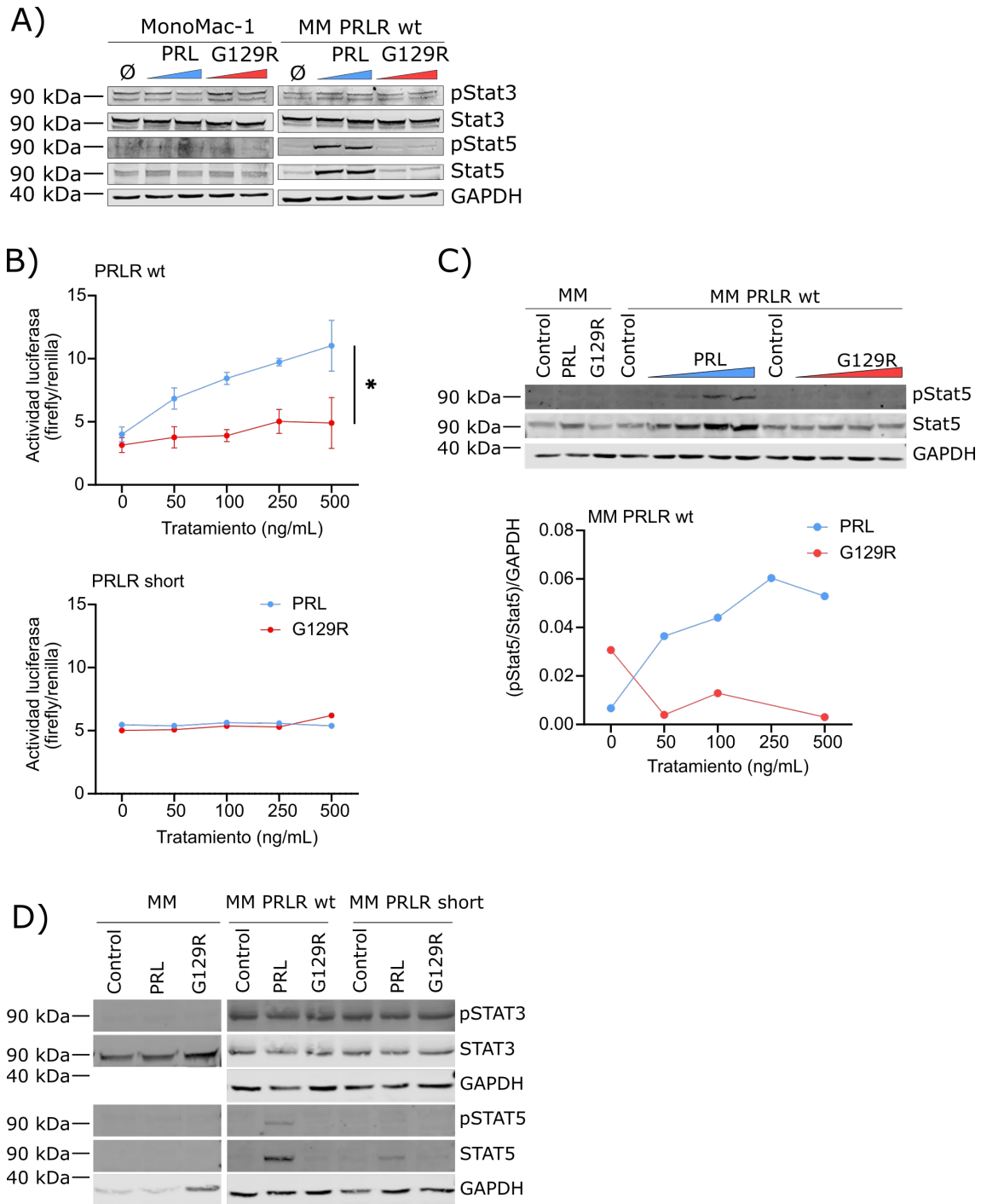


Figura 26. La PRL activa la vía de señalización Jak2/Stat5 y la posterior internalización en el núcleo de pStat5 en las células transducidas con la isoforma PRLR wt. **A)** Células MonoMac-1 (MM) no transducidas y transducidas con PRLR wt se trataron con un vehículo, PRL y G129R 250ng/mL y 500ng/mL durante 2h, se obtuvieron lisados celulares postnucleares, se realizó un western blot y se hibridó con los anticuerpos pStat3, pStat5, Stat3, Stat5 y GAPDH. **B)** Células HEK-293T se cotransfectaron con pEF-vacío, -PRLR wt y -PRLR short, junto con el elemento respuesta CISH (señalización de Jak2/Stat5) y se trató 24h con un vehículo y PRL o G129R a 50, 100, 250 y 500ng/mL; la actividad de señalización se calculó como la ratio luciferasa/renilla. **C)** Células MonoMac-1 (MM) no transducidas y transducidas con PRLR wt se trataron con un vehículo, PRL y G129R a 50, 100, 250 y 500ng/mL durante 2h; se extrajo proteína y se realizó un western

blot que se hibridó con pStat5, Stat5 y GAPDH. Se cuantificaron las bandas de proteína y se representó como la ratio de pStat5/Stat5/GAPDH. **D)** Células MonoMac-1 (MM) no transducidas y transducidas con PRLR wt y PRLR short se trataron con un vehículo, PRL y G129R 500ng/mL durante 2h; se extrajo proteína nuclear y se realizó un western blot que se hibridó con pStat5, Stat5, pStat3, Stat3 y GAPDH. Los gráficos representan la media de triplicados de tres experimentos independientes \pm SEM. * $p < 0,05$.

4.2.2.3. Estudio de la señalización mediante inhibidores

Como se ha comentado en varias ocasiones, el PRLR es capaz de activar diferentes vías de señalización (Abramicheva & Smirnova, 2019). En el contexto de la LMA, se ha observado que la principal vía activada es la de Jak2/Stat5 (**Figura 26**), aunque también se observa una ligera activación de la vía PI3K-Akt (**Figura 25**). Por otro lado, no se ha observado una mayor activación de Stat3, ni la consecuente translocación al núcleo, aunque sí que se ha visto que la PRLR puede aumentar ligeramente la transcripción de genes controlados por Stat3 (**Figura 26**). Para poder estudiar más a fondo la señalización y poder caracterizarla en el contexto de la LMA, se ha optado por el uso de inhibidores de elementos claves de estas vías: el inhibidor de Stat3 (**Figura 27A**) y el inhibidor de Stat5 (**Figura 27B**), que impiden la homodimerización de la molécula y, por lo tanto, su funcionalidad; ruxolitinib, un inhibidor de la fosforilación de Jak2 y, por lo tanto, de la unión de Stat3 y Stat5 (**Figura 27C**); y PD184352 y Ly294-002, inhibidores de la fosforilación de MEK y PI3K, respectivamente (**Figura 27D**).

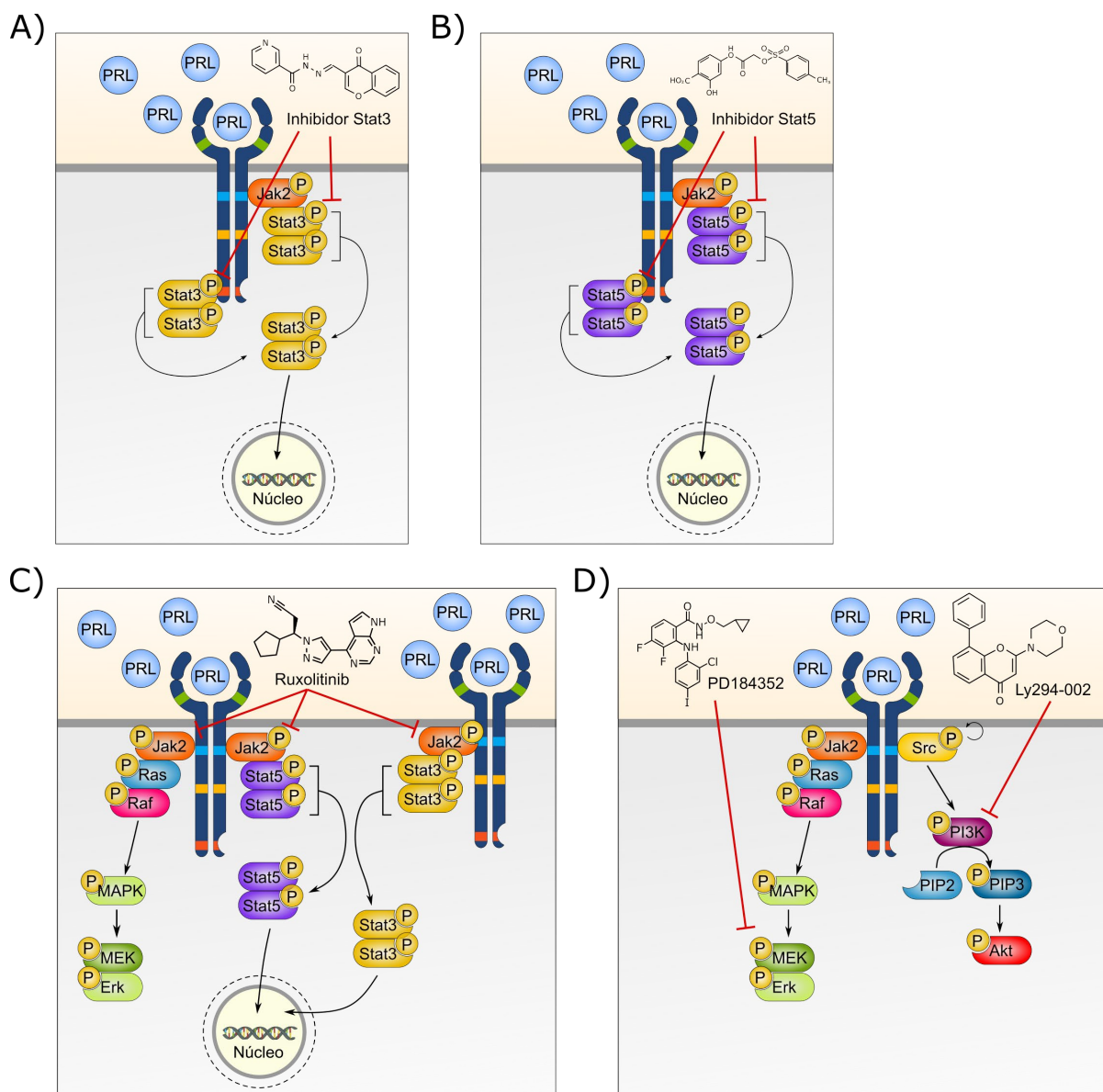
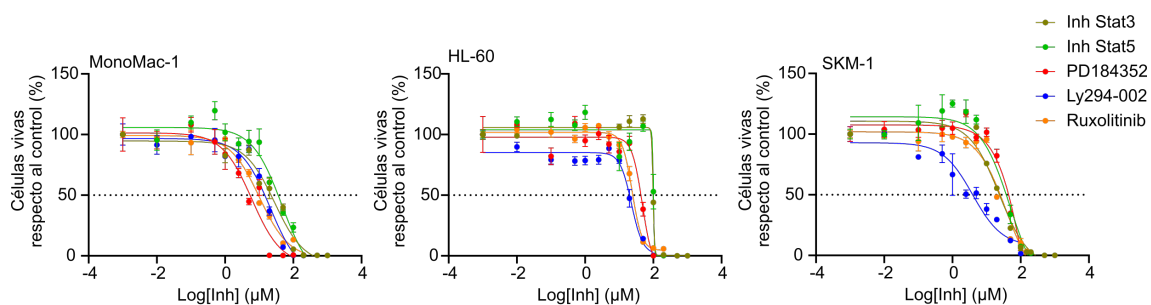


Figura 27. Vías de señalización de PRLR una vez activado por el ligando PRL y sus diferentes puntos de inhibición farmacológica. Representación de las moléculas utilizadas para **A)** inhibir Stat3 (inhibidor Stat3), **B)** inhibir Stat5 (inhibidor Stat5), **C)** inhibir Jak2 (ruxolitinib) y **D)** inhibir MEK-Erk (PD184352, izquierda) e inhibir PI3K-Akt (Ly294-002, derecha). Las flechas negras indican progresión de la señalización, las líneas rojas indican el punto de inhibición de los compuestos y la P indica fosforilación de la molécula.

Todos los compuestos comentados anteriormente tienen acción citotóxica en las células, pero estamos interesados, sobre todo, en la acción inhibitoria, por lo que se realizaron EC50 de las diferentes moléculas para determinar concentraciones con actividad citotóxica, pero no con una mortalidad demasiado elevada en las líneas celulares de LMA MonoMac-1, HL-60 y SKM-1 a 72h (**Figura 28**).



	EC50 (μM)		
	MonoMac-1	HL-60	SKM-1
Inh Stat3	133	146	22
Inh Stat5	38	213	47
PD184352	6	47	38
Ly294-002	16	22	44
Ruxolitinib	9	23	19

Figura 28. Todos los inhibidores tienen acción citotóxica en el rango micromolar. Células MonoMac-1 (MM), HL-60 y SKM-1 se trataron 72h a concentraciones crecientes de los distintos inhibidores. El valor final de la EC50 fue calculado. Cada punto representa la media de un triplicado \pm SEM.

Las células MonoMac-1, HL-60 y SKM-1 no transducidas y transducidas con PRLR wt y PRLR short se trataron 72h con los inhibidores y se analizó la viabilidad celular por citometría de flujo. Aunque no se observaron diferencias en viabilidad dependiente de la expresión de PRLR, sí que se observó una mayor mortalidad con los inhibidores de Stat3 y Stat5, respecto a las otras moléculas (**Figura 29**).

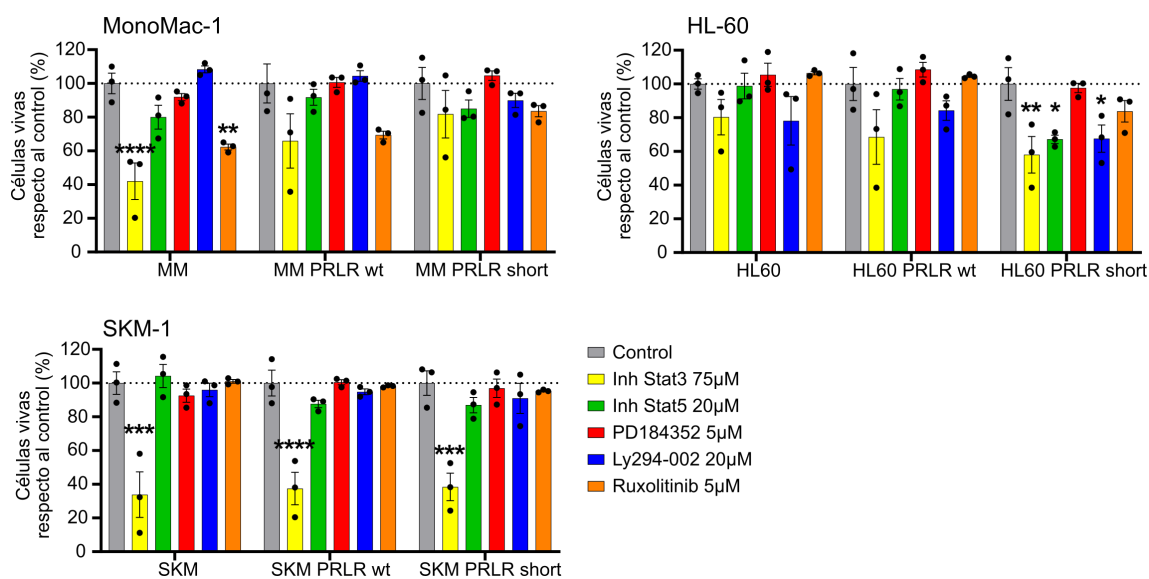


Figura 29. La inhibición de Stat3 y Stat5 disminuye la viabilidad celular independientemente de la expresión de PRLR. Células MonoMac-1 (MM), HL-60 y SKM-1 no transducidas y transducidas con PRLR wt y PRLR short se trataron 72h con un vehículo o el inhibidor de Stat3 75µM (amarillo), inhibidor de Stat5 20µM (verde), PD184352 5µM (rojo), Ly294-002 20µM (azul) y ruxolitinib 5µM (naranja). La viabilidad se analizó por citometría de flujo. Las barras indican la media \pm SEM de células vivas de cada línea de LMA respecto al control, estudiada en triplicados en tres experimentos independientes; cada punto es la media de cada experimento. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Los resultados indican que las vías principalmente implicadas en la viabilidad celular en LMA serían las relacionadas con Jak2/Stat3 y Jak2/Stat5. Para aclarar la implicación y el rol de PRL en esta señalización, las células MonoMac-1 no transducidas y transducidas con PRLR wt y PRLR short se trataron 72h con un vehículo o los inhibidores de Stat3 y Stat5 y ruxolitinib, inhibidor de Jak2 y la viabilidad celular se determinó por citometría de flujo. En lo que respecta al inhibidor de Stat3, tanto las células parentales como las transducidas con PRLR wt responden igual al tratamiento, mientras que las PRLR short son menos sensibles. En el caso de la inhibición de Stat5 se observan resultados similares, siendo, una vez más, las células PRLR short menos sensibles al tratamiento (**Figura 30A**). En cambio, el efecto del inhibidor de Jak2 no presenta diferencias en citotoxicidad y es equivalente independientemente de la presencia del PRLR o su versión dominante negativa (short) (**Figura 30B**). Estos resultados sugieren que la señalización de PRLR está mediada en mayor medida por Stat3 y Stat5, no por Jak2. Además, se observa que las células transducidas con la isoforma PRLR short poseen más resistencia a los

tratamientos con los inhibidores de Stat3 y Stat5, indicando cierta independencia a esta vía de señalización.

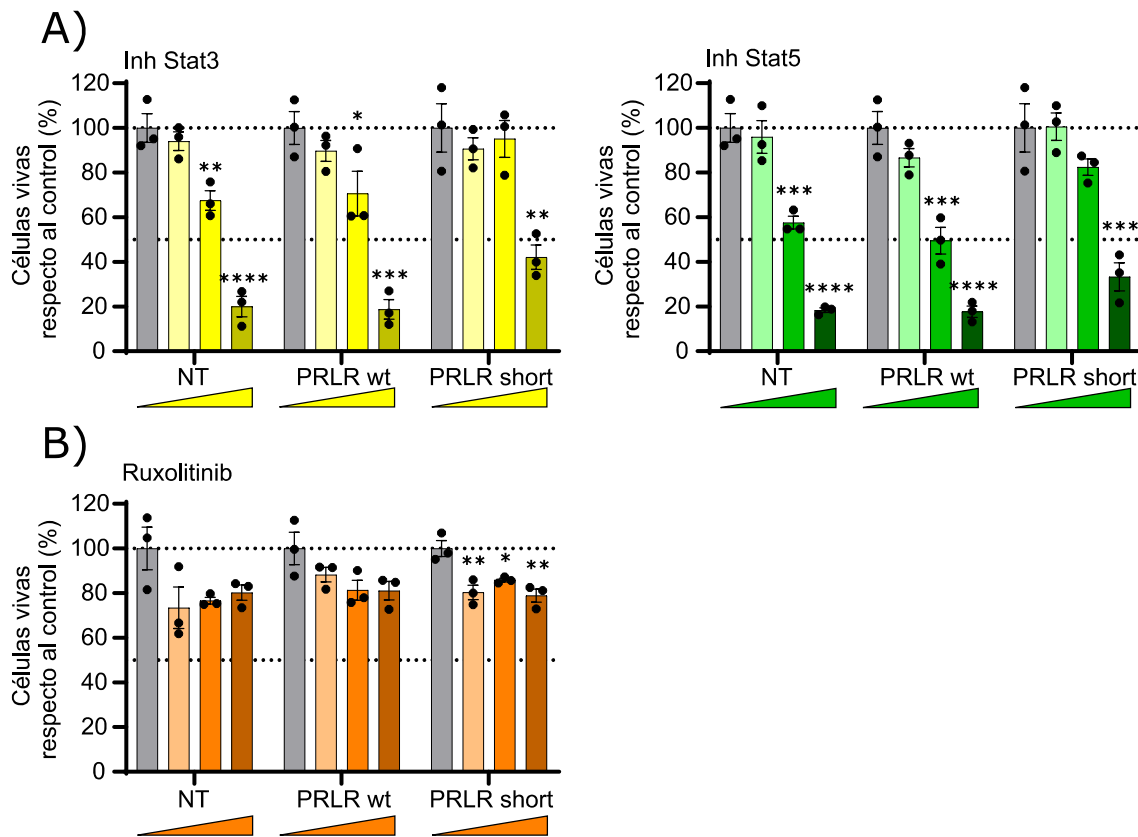


Figura 30. La expresión de la isoforma PRLR short disminuye la sensibilidad a los inhibidores de Stat3 y Stat5, pero no de Jak2. Células MonoMac-1 no transducidas (NT) y transducidas con PRLR wt y PRLR short se trataron 72h con **A)** los inhibidores de Stat3 (amarillo) y Stat5 (verde) a 10 μ M, 50 μ M y 100 μ M y **B)** ruxolitinib (naranja) a 0,5 μ M, 1 μ M y 2,5 μ M. La viabilidad celular se analizó por citometría de flujo. Las barras indican la media de triplicados de tres experimentos independientes \pm SEM y los triángulos dosis crecientes del inhibidor utilizado. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Una vez observado el efecto diferencial en la citotoxicidad de los diferentes inhibidores en las distintas isoformas del PRLR y la mayor resistencia de la isoforma dominante negativa, se decidió estudiar el papel de la activación del receptor de manera exógena en este efecto. Células MonoMac-1 no transducidas y transducidas con PRLR wt y PRLR short se trataron 72h con los inhibidores de Stat3 y Stat5 y de Jak2 (ruxolitinib) junto con un vehículo, PRL o G129R para observar si eran capaces de revertir o incrementar el efecto citotóxico de los inhibidores, respectivamente. La viabilidad celular se analizó por citometría de flujo. Es importante mencionar que en todos los casos se observa que la presencia de PRL induce proliferación en las células de LMA, siendo una tendencia en las células parentales y significativo en las

transducidas con PRLR wt, mientras que no se observa ningún efecto en la isoforma short (**Figura 31**). Estos resultados se estudiarán en profundidad más adelante. Podemos observar que el efecto citotóxico del inhibidor de Stat3 es parcialmente revertido por la presencia de PRL cuando la isoforma PRLR wt está presente. En cambio, la PRL mutada (G129R) no tiene efecto alguno. Estos mismos resultados se observan al tratar las células con el inhibidor de Stat5, ya que la PRL es capaz de revertir parcialmente el efecto citotóxico en las células PRLR wt, pero no tiene ningún efecto en las PRLR short. Además, el antagonista no ejerce ningún efecto sobre las células (**Figura 31A**). El inhibidor de Jak2 por sí sólo no tiene ningún efecto diferencial entre las líneas y, además, no se ve afectado por el tratamiento con el ligando o el antagonista del receptor (**Figura 31B**). Estos resultados nos indican que la presencia de una forma dominante negativa de PRLR reduce la sensibilidad y dependencia de la señalización por Stat3 y Stat5, lo que nos podría indicar que el receptor podría estar señalizando directa o indirectamente por Stat3 y Stat5. Además, la activación de la señalización mediada por PRLR puede, parcialmente, revertir el efecto citotóxico de los inhibidores de Stat3 y Stat5 y no se revierte con el ligando endógeno ni se ve incrementado por el antagonista del receptor G129R. Por último, la falta de efecto del inhibidor de Jak2 en la citotoxicidad celular nos indica que la señalización por PRLR, posiblemente, no está mediada por Jak2, pero sí por Stat3 y Stat5, en concordancia con los resultados obtenidos previamente.

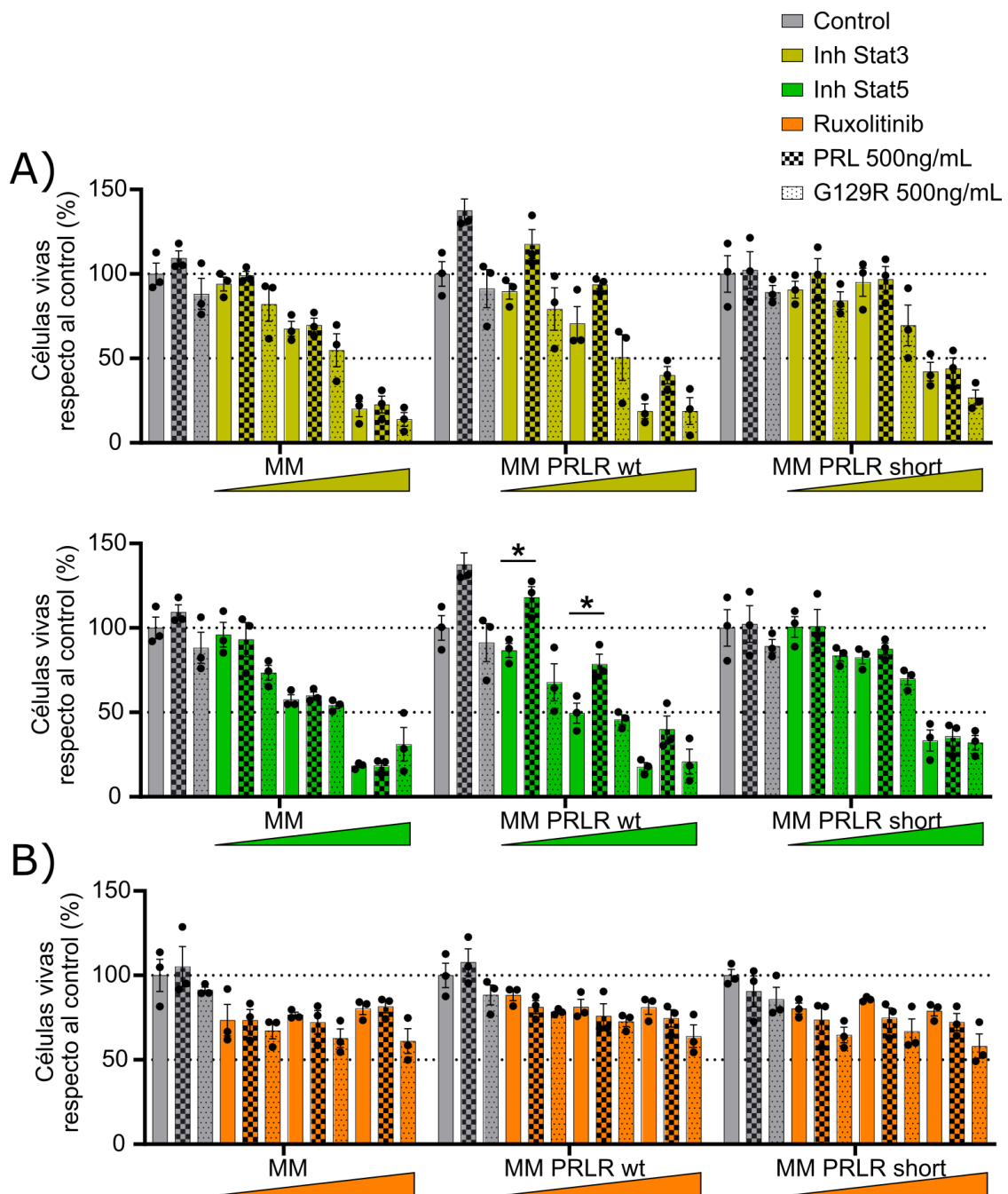


Figura 31. La PRL revierte el efecto citotóxico de los inhibidores de Stat3 y Stat5, pero no de ruxolitinib, inhibidor de Jak2. Las células MonoMac-1 no transducidas y transducidas con PRLR wt y PRLR short se trataron 72h con un vehículo o **A)** los inhibidores de Stat3 y Stat5 a 10µM, 50µM y 100µM y **B)** ruxolitinib 0,5µM, 1µM y 2,5µM junto con un vehículo o PRL y G129R 500ng/mL. La viabilidad se analizó por citometría de flujo. Las barras representan la media de triplicados de tres experimentos independientes \pm SEM. * $p < 0,05$.

4.2.3. Caracterización del papel de la PRL en la LMA

4.2.3.1. Estudios *in vitro* y *ex vivo*

La PRL incrementa la proliferación en distintos tipos celulares, así como en varios tipos de cáncer (Bole-Feysot et al., 1998; Goffin et al., 1996). Además, está demostrada la necesidad de algunos tipos celulares de esta hormona para poder proliferar correctamente, como es el caso de la línea celular Nb2 de linfoma de rata (Abramicheva & Smirnova, 2019). En este trabajo se ha observado que la PRL tiene un papel proliferativo en las células leucémicas (**Figura 31**), por lo que se decidió estudiar más en detalle estos efectos.

Las células de LMA MonoMac-1, HL-60, SKM-1, U-937, KG-1 y Kasumi-1 se trataron 72h con un vehículo, PRL y G129R, aunque ninguno de los compuestos tuvo efectos en la viabilidad celular (**Figura 32A**). Existe respaldo bibliográfico que sugiere que el antagonista de PRL presenta cierta toxicidad (Bernichtein et al., 2003; Chen et al., 1999; Goffin et al., 1996) y, aunque la mayoría de estudios se basan en experimentos *in vivo* y en modelos de cáncer de próstata, cáncer de mama y células de linfoma de rata, se decidió probar su efecto a altas concentraciones, pero no se observó citotoxicidad ni aumento en la proliferación (**Figura 32B**).

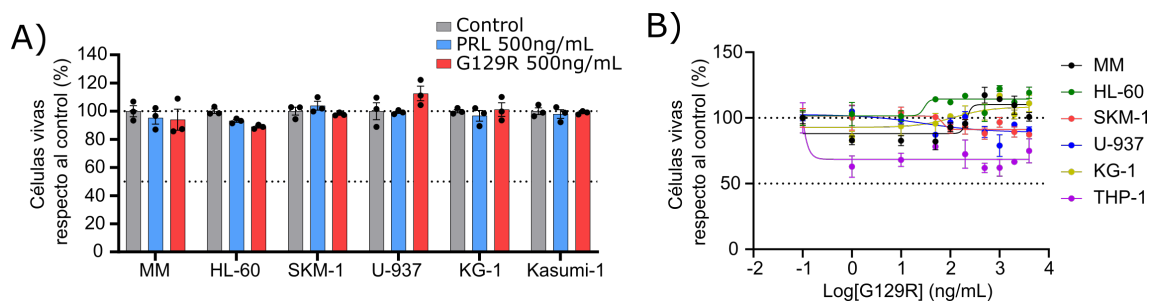


Figura 32. Las células de LMA no ven afectada su viabilidad tras el tratamiento con PRL o con su antagonista G129R. Las células MonoMac-1 (MM), HL-60, SKM-1, U-937, KG-1 y Kasumi-1 se trataron 72h con **A)** un vehículo o PRL y G129R 500ng/mL y **B)** dosis crecientes de G129R para realizar una EC50. La viabilidad se analizó por citometría de flujo. Las barras representan la media de triplicados de tres experimentos independientes \pm SEM; cada punto representa la media de un experimento. En las EC50 cada punto representa la media de un triplicado \pm SEM.

Estos resultados no son los esperados, pero se pueden deber a distintas causas. Por un lado, algunas líneas celulares de LMA, como HL-60, KG-1 o Kasumi-1, expresan bajos niveles de PRLR en superficie (4%, 2% y 0,3%, respectivamente), aunque no es

aplicable a todas las líneas utilizadas para el experimento, ya que otras expresan el receptor en el 70% de la población de células, como las U-937 (**Figura 21**). Por otro lado, aunque las líneas celulares expresan PRLR a nivel de ARNm, éste puede estar sometido a modificaciones transcripcionales o, una vez traducida la proteína, modificaciones post-traduccionales (Abramicheva & Smirnova, 2019; Clevenge & Kline, 2001). Estas modificaciones pueden generar una transducción de señal más o menos eficiente, de manera que la PRL no siempre actuaría de igual manera en la proliferación.

Para solventar el problema de las modificaciones que puede sufrir el PRLR y la consecuente disparidad en la señalización, se realizaron experimentos utilizando células transducidas con PRLR wt y PRLR short para estimular el sistema y tener una muestra de la ganancia y pérdida de función, respectivamente. Concretamente, las células MonoMac-1, HL-60 y SKM-1 no transducidas y transducidas con PRLR wt y PRLR short se trataron 72h con un vehículo, PRL y G129R y se analizó la viabilidad celular por citometría de flujo. Se observó que las células que expresaban PRLR wt veían estimulada la proliferación al ser tratadas con PRL, mientras que no se observó ningún efecto en el dominante negativo PRLR short, validando el efecto observado en la isoforma salvaje. En cambio, el antagonista G129R no tuvo ningún efecto citotóxico (**Figura 33A**). Para descartar la ausencia de efecto por baja afinidad u ocupación parcial de los receptores por parte del antagonista de PRLR, se intentó incrementar las dosis de G129R para forzar el sistema en las células MonoMac-1, HL-60 y SKM-1 no transducidas y transducidas con PRLR wt durante 72h. Como en el experimento anterior, no se observó ningún efecto sobre la viabilidad celular (**Figura 33B**). Esto nos demuestra que, en el contexto leucémico, la PRL es capaz de promover la proliferación celular de manera significativa y dependiente de la expresión de PRLR, mientras que el antagonista utilizado, el G129R, no lleva a cabo ningún efecto sobre la viabilidad de estas mismas células. Además, la isoforma dominante negativa no responde al estímulo proliferativo promovido por su ligando, debido a la incapacidad de iniciar la transducción de señal.

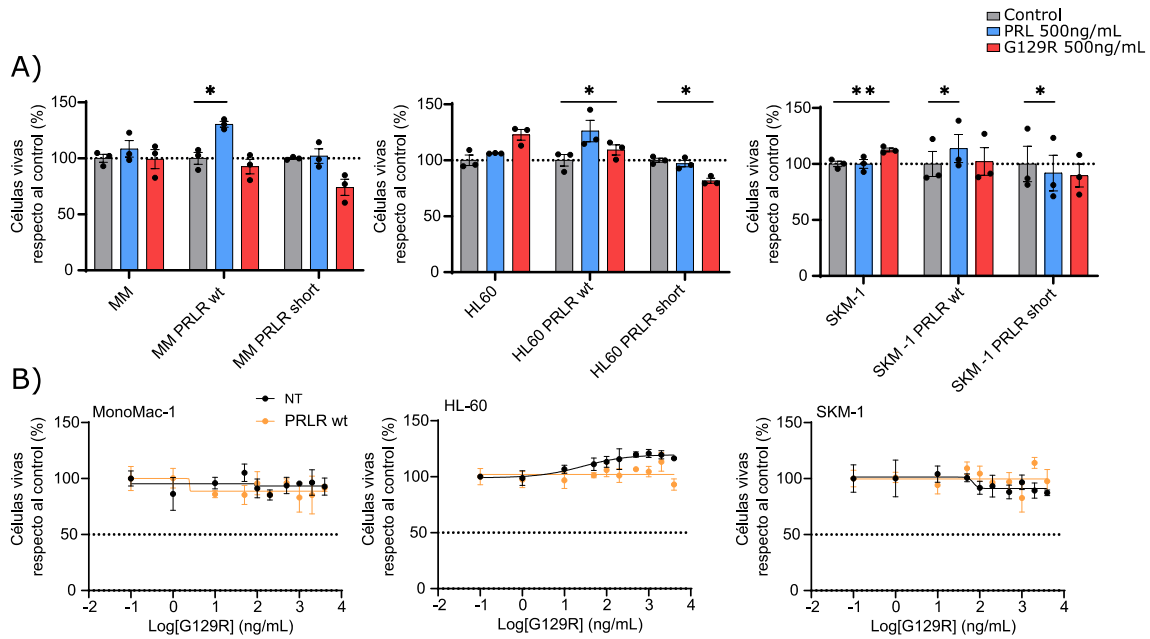


Figura 33. La PRL estimula la proliferación de las células de LMA transducidas con el PRLR wt, pero no se ven afectadas por el antagonista G129R, mientras que la isoforma dominante negativa (short) no se ve afectada por ninguno de los tratamientos. A) Las células MonoMac-1 (MM), HL-60 y SKM-1 no transducidas (NT) y transducidas con PRLR wt y PRLR short se trataron 72h con un vehículo, PRL y G129R 500ng/mL. **B)** Las células MonoMac-1 (MM), HL-60 y SKM-1 no transducidas y transducidas con PRLR wt se trataron 72h con un vehículo o con dosis crecientes de G129R. La viabilidad se analizó por citometría de flujo. Las barras representan la media de triplicados de tres experimentos independientes \pm SEM. Los puntos representan la media de cada experimento por triplicado. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Para poder corroborar los datos obtenidos y evaluar su efecto a tiempos más largos en cuanto al efecto proliferativo de la PRL en las células de LMA que expresan PRLR wt, las células MonoMac-1, HL-60 y SKM-1 no transducidas y transducidas con PRLR wt y PRLR short se trataron durante 4 días con un vehículo, PRL o G129R y se analizó la viabilidad a día 0, 2 y 4 gracias a la tinción con DiI, que permite marcar inespecíficamente los lípidos de membrana de las células y se pierde a medida que estas se dividen para proliferar (**Figura 34A**). De igual manera que ya habíamos observado, la PRL promueve la proliferación sostenida en el tiempo de las células que expresan PRLR wt, observando una disminución de la fluorescencia del DiI a día 4, mientras que las células con la isoforma PRLR short no muestran cambios proliferativos debidos al tratamiento (**Figura 34B**).

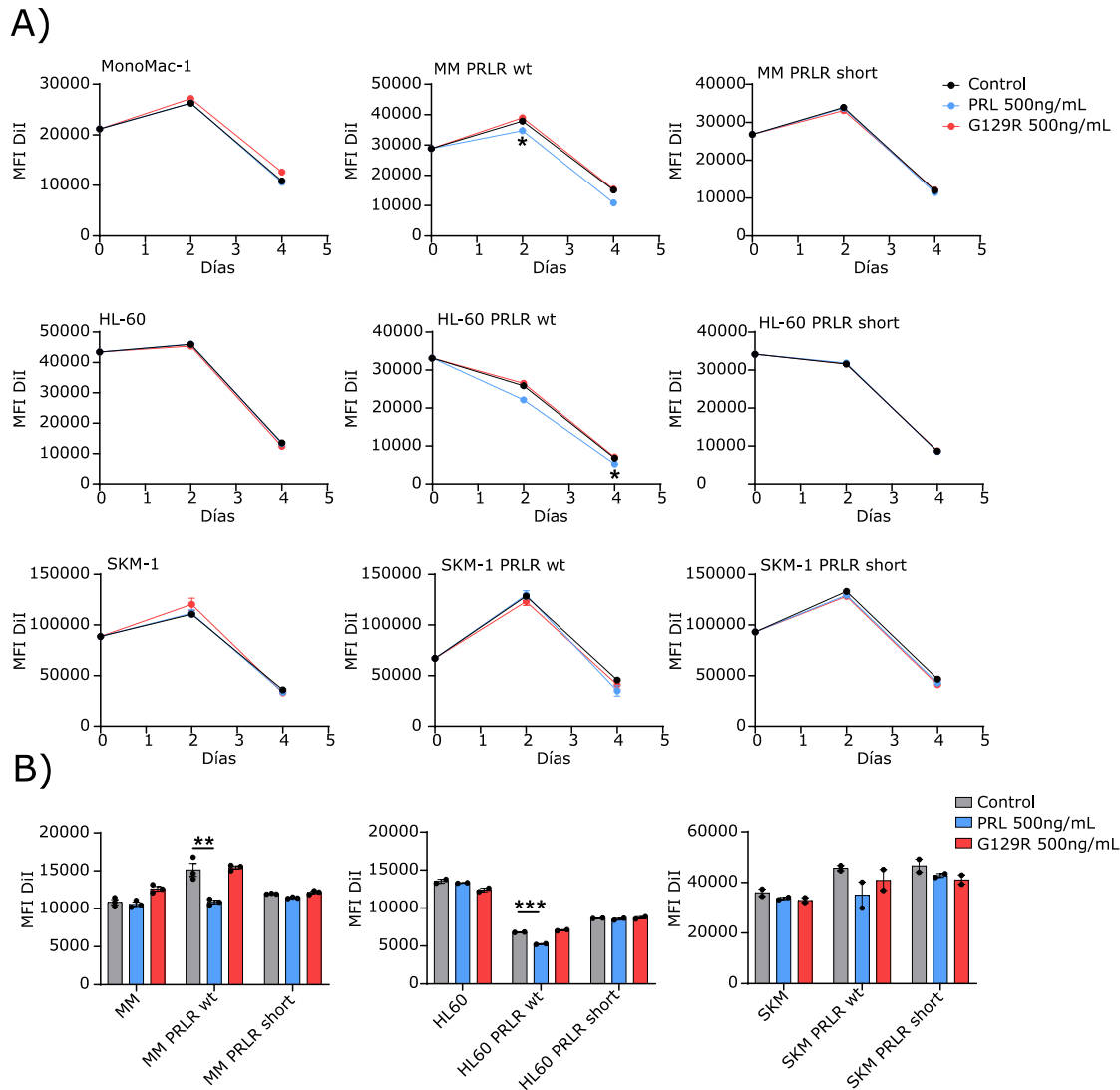


Figura 34. La PRL estimula la proliferación de las células de LMA transducidas con la PRLR wt, pero no se ven afectadas por el antagonista G129R, de forma sostenida en el tiempo. Las células MonoMac-1 (MM), HL-60 y SKM-1 no transducidas y transducidas con PRLR wt y PRLR short se trataron con un vehículo, PRL o G129R 500ng/mL durante 4 días. La viabilidad se analizó mediante citometría de flujo gracias a la tinción de DiI y está representada como **A)** el valor de la MFI a día 0, 2 y 4; y como **B)** el valor de la MFI a día 4. Los puntos y las barras representan la media de triplicados \pm SEM de tres experimentos independientes para MonoMac-1 y dos experimentos independientes para HL-60 y SKM-1. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Una vez demostrado que la PRL es capaz de incrementar la capacidad proliferativa de las células, se analizó si estos efectos se podían ver reflejados en las fases del ciclo celular. Las células MonoMac-1 y HL-60 no transducidas y transducidas con PRLR wt y PRLR short se trataron 24h con un vehículo, PRL o G129R, después de haber sincronizado los ciclos celulares manteniéndolas 18h en un medio sin suero, se fijaron y se analizó el ciclo celular mediante citometría de flujo. No se observaron cambios

significativos entre la proporción de células en cada fase del ciclo celular (**Figura 35A**) ni en el perfil obtenido mediante el análisis de citometría de flujo (**Figura 35B**). Estos resultados indican que la PRL incrementa la proliferación celular sin modificar el progreso del ciclo celular.

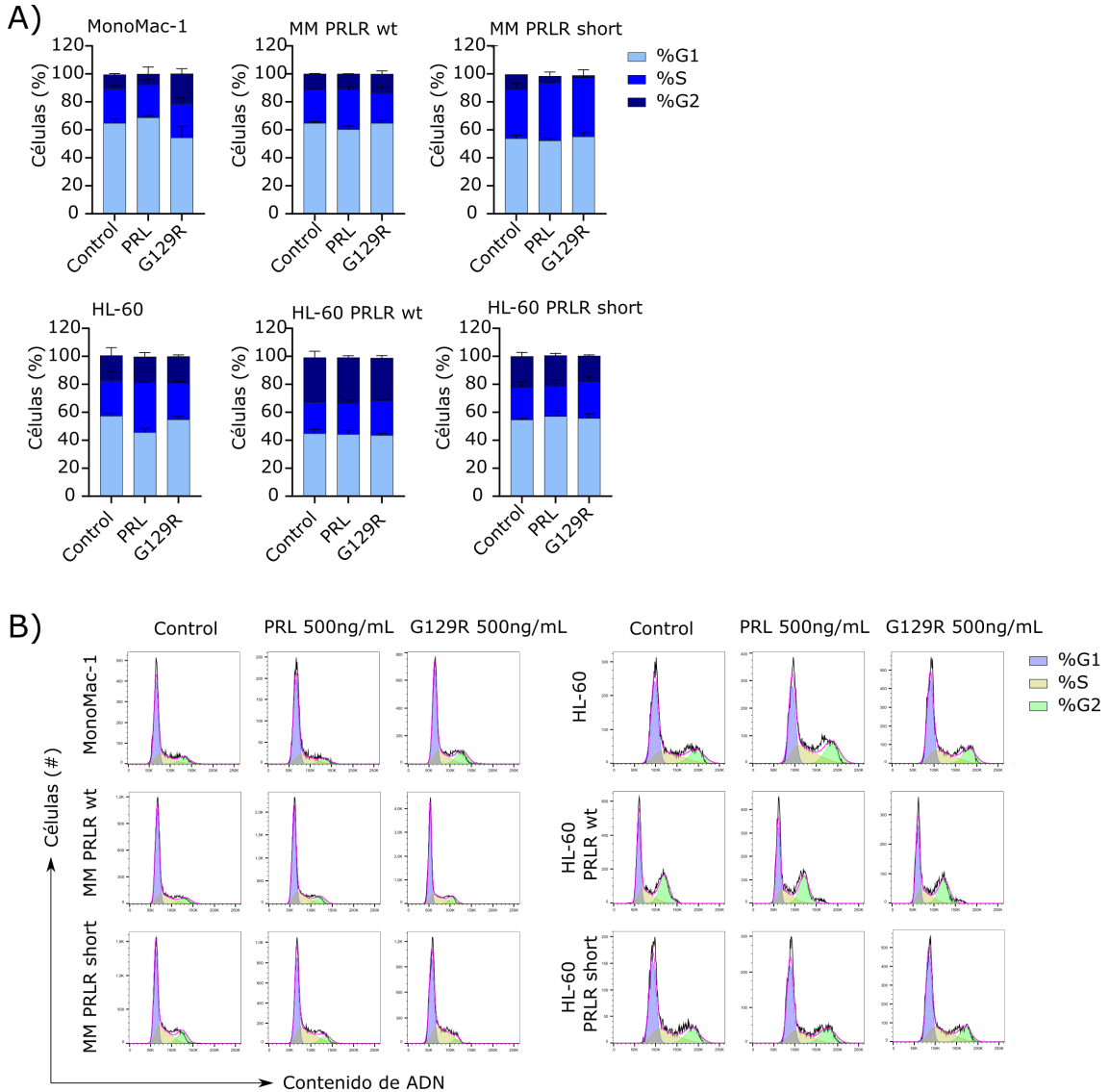


Figura 35. La PRL o su antagonista no modifican las fases del ciclo celular en las células leucémicas transducidas con PRLR. Las células MonoMac-1 y HL-60 no transducidas y transducidas con PRLR wt y PRLR short se cultivaron 18h en medio sin suero para sincronizar los ciclos celulares, se trataron 24h con un vehículo, PRL y G129R 500ng/mL y se fijaron en etanol frío. El ciclo celular se analizó por citometría de flujo y se representa como **A)** el porcentaje de células de cada fase del ciclo celular y **B)** el perfil de cada fase del ciclo celular. Las barras indican la media de triplicados de dos experimentos independientes \pm SEM. Se muestra una imagen representativa de cada ciclo celular.

Actualmente, no existe consenso sobre el fenotipo de las LSCs, de manera que aislarlas de la población hematopoyética total para poder cultivarlas *in vitro* es

prácticamente imposible. Aun así, dado que la definición de las LSCs es funcional y se basa en que es una célula capaz de regenerar y mantener la leucemia, se ha desarrollado una metodología comúnmente usada conocida como ensayos de clonogenicidad, donde se cultivan células con potencial de autorrenovación y diferenciación, convirtiéndose en la muestra experimental más próxima para estudiar el comportamiento de las LSCs. Células MonoMac-1 y HL-60 no transducidas y transducidas con PRLR wt y PRLR short se trataron 24h con un vehículo, PRL o G129R y se sembraron en un medio semisólido en presencia de citoquinas instructivas. Pasados 7 días, se contaron las colonias formadas por las células y se observó que ninguno de los tratamientos afectaba a la clonogenicidad (**Figura 36**), ni se observaban cambios morfológicos en las colonias.

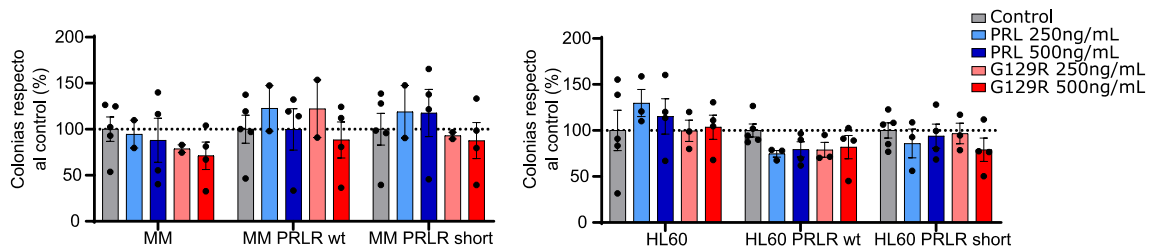


Figura 36. La clonogenicidad de las células de LMA no se ve afectada por los tratamientos con PRL o su antagonista. Células MonoMac-1 (MM) y HL-60 no transducidas y transducidas con PRLR wt y PRLR short se trataron 24h con un vehículo, PRL y G129R 250ng/mL y 500ng/mL, se sembraron en un medio semisólido en presencia de citoquinas instructivas y se contaron manualmente pasados 7 días. Las barras indican la media de colonias de duplicados de cinco experimentos independientes respecto al control \pm SEM. Cada punto representa la media de un experimento.

Hasta el momento, hemos observado que la PRL es capaz de promover la proliferación celular, sin afectar el ciclo celular, más notablemente en las células que expresan PRLR wt. Por otro lado, el antagonista, aunque inhiba la señalización, no presenta efectos ni en la viabilidad ni en la proliferación. Además, tampoco se observan cambios a nivel de clonogenicidad por efecto del agonista y antagonista del PRLR. La capacidad clonogénica, como se ha comentado anteriormente, mide la tasa de autorrenovación y el potencial de diferenciación de las células; en cambio, la proliferación se relaciona directamente con la capacidad de división celular. Hasta el momento, se ha observado que la PRL es capaz de incrementar la capacidad de división de las células, sin modificar la capacidad de autorrenovación y diferenciación. A sabiendas de estos resultados y debido a la elevada heterogeneidad observada, se

han utilizado muestras primarias hematopoyéticas sanas y de pacientes de LMA correspondientes a los grandes subgrupos de la enfermedad, excepto APL, para complementar los resultados (**Tabla 11**). Las muestras primarias de LMA y las muestras procedentes de capas leucocitarias de pacientes sanos se trataron 72h con un vehículo, PRL o G129R y la viabilidad se analizó por citometría de flujo mediante selección de las células vivas CD45⁺ en el caso de las células de pacientes de LMA y las diferentes poblaciones mieloide y linfoide en el caso de las células de donantes sanos, siempre con el perfil FSC-SSC adecuado. No se observaron efectos en la viabilidad después del tratamiento en las células de LMA ni en las células hematopoyéticas sanas (**Figura 37A**). Por otro lado, se estudió la clonogenicidad de las muestras primarias de LMA y se comparó con células de la fracción lin- de sangre de cordón umbilical enriquecida en células primitivas de donantes sanos como control. Estas células se trataron 24h con un vehículo, PRL o G129R, se sembraron en un medio semisólido en presencia de citoquinas instructivas, se contaron pasados 14 días y se clasificaron según criterios morfológicos. Aunque la PRL no tuvo ningún efecto sobre la clonogenicidad, sí que se observó una disminución de ésta al tratar con G129R siendo, además, dosis-dependiente. Las muestras sanas no se vieron afectadas, limitando el efecto a las células procedentes de neoplasias hematológicas (**Figura 37B**). Una vez analizado el efecto sobre la clonogenicidad de la PRL y su antagonista en las muestras primarias, se ha observado que los efectos proliferativos de la PRL están limitados a células leucémicas más maduras, mientras que el G129R permite eliminar diferencialmente las células leucémicas primitivas, dejando las células sanas intactas y presentando una ventana terapéutica para el tratamiento de la LMA.

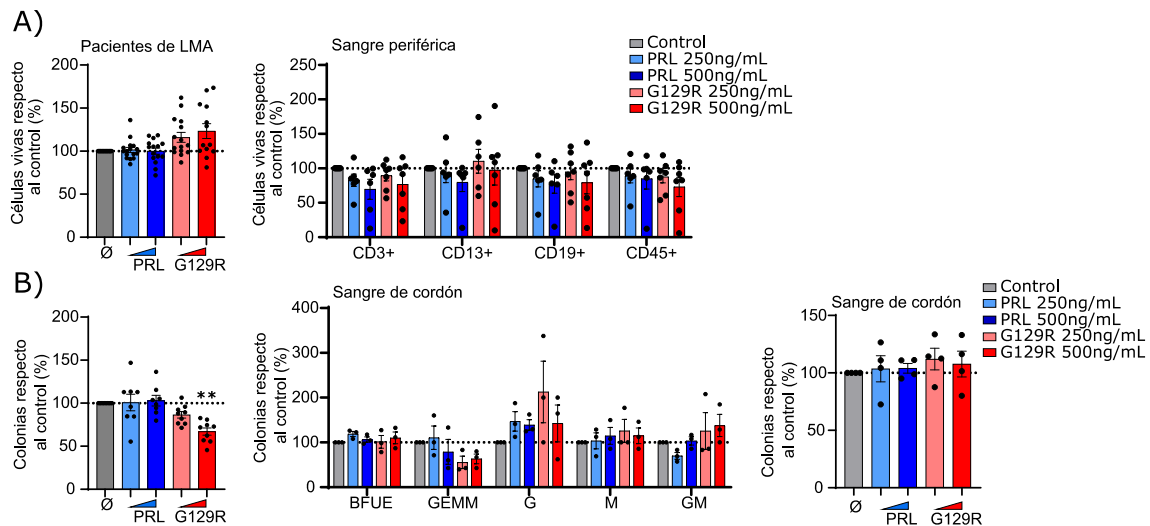


Figura 37. El antagonista de PRLR disminuye la clonogenicidad celular de muestras primarias de LMA sin afectar las células hematopoyéticas sanas. A) Las células procedentes de muestras de pacientes de LMA (n=19) y las células procedentes de capas leucocitarias de donantes sanos (n=7) se trataron 72h con un vehículo, PRL o G129R 250ng/mL y 500ng/mL. La viabilidad se analizó por citometría de flujo dentro de la población CD45⁺ y en las distintas poblaciones mieloides y linfoides (CD3⁺, CD13⁺, CD19⁺ y CD45⁺), respectivamente. **B)** Las células procedentes de pacientes de LMA (n=10) y la fracción de lin- aisladas de las muestras de cordón umbilical (n=4) se trataron 24h con un vehículo, PRL o G129R 250ng/mL y 500ng/mL y se sembraron en un medio semisólido enriquecido en citoquinas instructivas. Las barras indican la media del número de células vivas dentro de la población CD45⁺ o la media del número de colonias respecto al control. Las barras de error representan la SEM. **p<0,01.

4.2.3.2. Estudios *in vivo*

En este punto, podemos afirmar que, en el contexto leucémico, la PRL tiene un papel proliferativo, mientras que su antagonista disminuye la clonogenicidad de las células. Para comprender mejor dicho mecanismo en el contexto fisiológico, se trabajó con modelos animales de xenotrasplante de células humanas en ratones inmunodeficientes adultos NSG (NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ) condicionados farmacológicamente con busulfán para la aceptación del injerto.

Primero de todo, la línea celular MonoMac-1 se transdujo con el vector pLL-EF1 α -rFLuc-T2A-GFP (MM rLuc), que permite la expresión de luciferasa, encargada de oxidar la luciferina y pudiendo ser detectada por luminiscencia. De esta manera podemos tener un seguimiento constante del injerto celular que tiene cada ratón a lo largo del experimento. Una vez transducidas y los ratones condicionados con busulfán, las células se inyectaron por vía intravenosa y dejaron 4 días para que las células leucémicas empezasen a proliferar. Pasado este tiempo, los tratamientos se

realizaron en días alternos con el vehículo, PRL o G129R 0,2mg/kg, intraperitonealmente (las concentraciones usadas correspondían a las mencionadas en la información de los compuestos). El día del tratamiento se realizaron las imágenes de seguimiento de los ratones y se cuantificó la luminiscencia obtenida para tener resultados sobre el efecto de los tratamientos (**Figura 38A**). El tratamiento con PRL induce una mayor proliferación celular, incrementando la capacidad de injerto de las células leucémicas tanto en machos como en hembras, observándose sobre todo a día 13 y 14, respectivamente. El antagonista del PRLR también tiene un efecto diferencial entre machos y hembras inhibiendo la expansión de la leucemia en las hembras más notablemente que en machos (**Figura 38 B y C**). La PRL de ratón (mPRL, del inglés *mouse Prolactin*) posee cierta actividad antagónica hacia el PRLR humano (hPRLR, del inglés *human Prolactin Receptor*) (Utama et al., 2009) que, junto con la mayor cantidad de PRL circulante en el suero de las hembras, hasta 10 veces superior que en machos (Patil et al., 2013), concuerdan con los datos obtenidos. En resumen, en las hembras se ha descrito una mayor concentración de mPRL, que podría tener efectos saturantes sobre el PRLR, por lo que los efectos de la PRL exógena (hPRL) no se observarían. Sin embargo, al añadir el antagonista, sí que observamos una disminución de la leucemia, ya que hay una activación potencialmente máxima de todos los receptores. Por otro lado, los machos prácticamente no tienen mPRL, haciendo que el aporte de PRL exógeno sea significativo, traducándose en un aumento de la proliferación y de la leucemia. La escasa activación del receptor debido a la poca mPRL circulante hace que el antagonista no tenga ningún efecto.

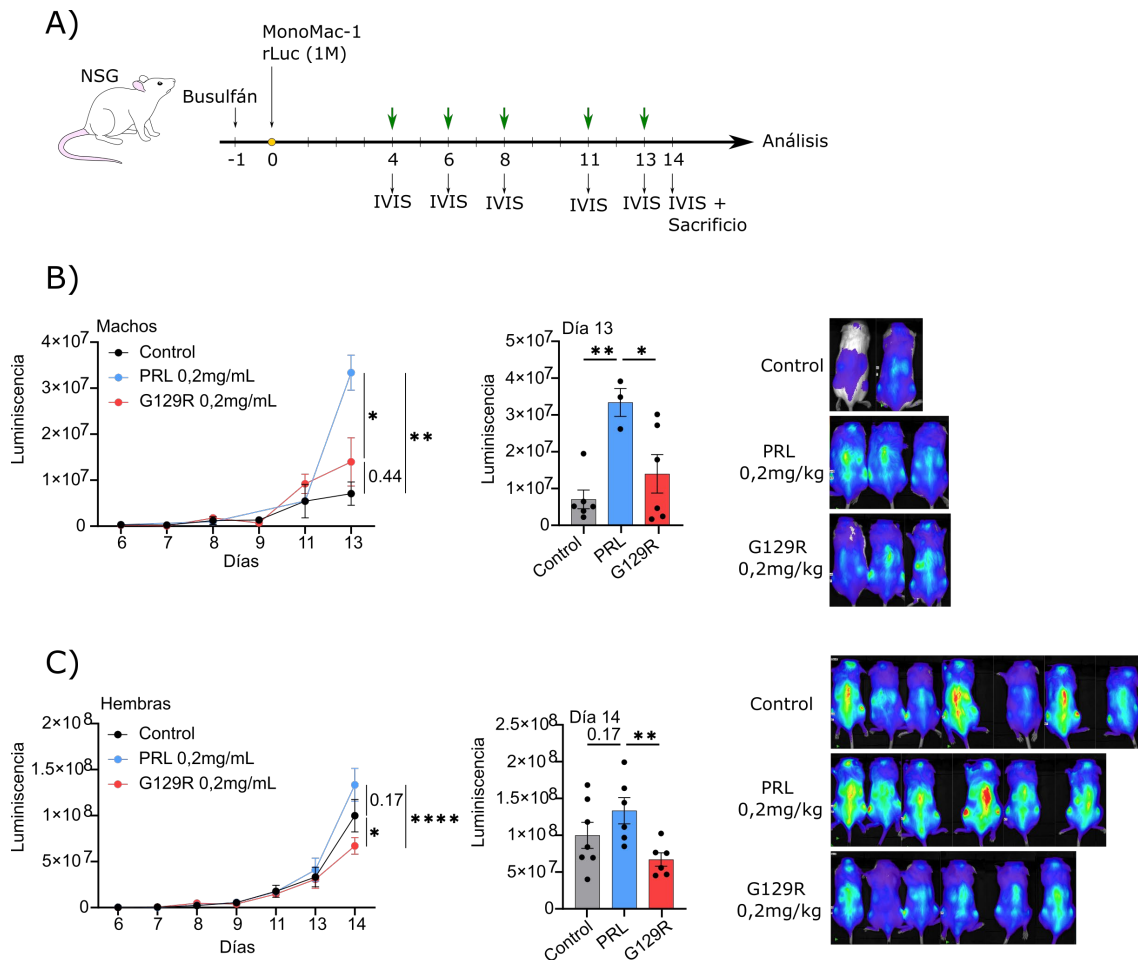


Figura 38. La PRL incrementa la proliferación de las células de LMA, mientras que el antagonista G129R disminuye la capacidad de injerto. A) Se inyectaron vía intravenosa células MonoMac-1 rLuc (MM rLuc, n=34) a ratones NSG previamente condicionados con busulfán y, pasados 4 días, se empezaron los tratamientos intraperitoneales en días alternos con un vehículo, PRL o G219R 0,2mg/kg, días en los que se analizó el injerto de las células por luminiscencia hasta día 13 o 14, cuando se sacrificaron los ratones machos y hembras, respectivamente. **B,C)** la capacidad de injerto de las células inyectadas se representan como la luminiscencia detectada a lo largo del experimento (izquierda) y a día final (derecha). Los puntos y las barras representan la media de los valores de luminiscencia, los puntos en el gráfico de barras representan la luminiscencia de cada ratón \pm SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$; los números son el p valor.

4.2.4. Efecto diferencial de las células PRL wt y PRL mut

Como se han observado diferencias entre la ganancia y pérdida de función del receptor mediada por un ligando y por un antagonista, se decidió estudiar esta misma función, pero con las células transducidas con las formas de PRL wt y PRL mut para poder evaluar también su potencial efecto autocrino y paracrino. Las células MonoMac-1, HL-60 y SKM-1 no transducidas y transducidas con PRL wt y PRL mut se cultivaron durante 4 días, previamente marcadas con la sonda DiI, que permite cuantificar la proliferación mediante la detección de fluorescencia por citometría de

flujo. Los resultados obtenidos en las tres líneas de LMA son muy diferentes; las líneas celulares MonoMac-1 y SKM-1, que expresan niveles superiores de PRLR en superficie (12% y 38%, respectivamente), tienen una proliferación inferior cuando se transducen con PRL mut, mientras que no hay diferencias cuando se expresa ectópicamente PRL wt. En cambio, en las células HL-60, que poseen una expresión de PRLR inferior en superficie (4%) y, por lo tanto, se espera una respuesta modesta, la presencia de ambas isoformas induce un aumento significativo de la proliferación (**Figura 39A**). Seguidamente, se estudiaron los posibles cambios en el ciclo celular debido a la producción diferencial de PRL. Las células MonoMac-1, HL-60 y SKM-1 no transducidas y transducidas con PRL wt y PRL mut se fijaron y se analizaron las fases del ciclo celular mediante citometría de flujo y, sólo en el caso de las células HL-60, se observó una parada de células en la fase S, produciendo una acumulación de células en S y una disminución en G2/M (**Figura 39B**). Por último, las células MonoMac-1 y HL-60 no transducidas y transducidas con PRL wt y PRL mut se sembraron en un medio semisólido en presencia de citoquinas instructivas y, pasados 7 días, se contaron las colonias que habían crecido para determinar la clonogenicidad de las diferentes líneas. Se observó una disminución de la capacidad clonogénica de las células transducidas con PRL mut y un aumento de ésta en las transducidas con PRL wt, siendo una tendencia en las MonoMac-1 y significativo en las HL-60, en concordancia con lo observado anteriormente y con la expresión diferencial de PRLR (**Figura 39C**). En conjunto, estos resultados sugieren que la transducción con PRL wt fomenta la capacidad proliferativa y clonogénica de las células, más notablemente en la línea HL-60, siendo independiente de la expresión de PRLR en superficie, mientras que la transducción con la forma dominante negativa del ligando disminuye tanto la proliferación, más moderadamente, como la clonogenicidad, de la misma forma que sucede cuando tratamos células de muestras primarias de LMA con el antagonista del PRLR.

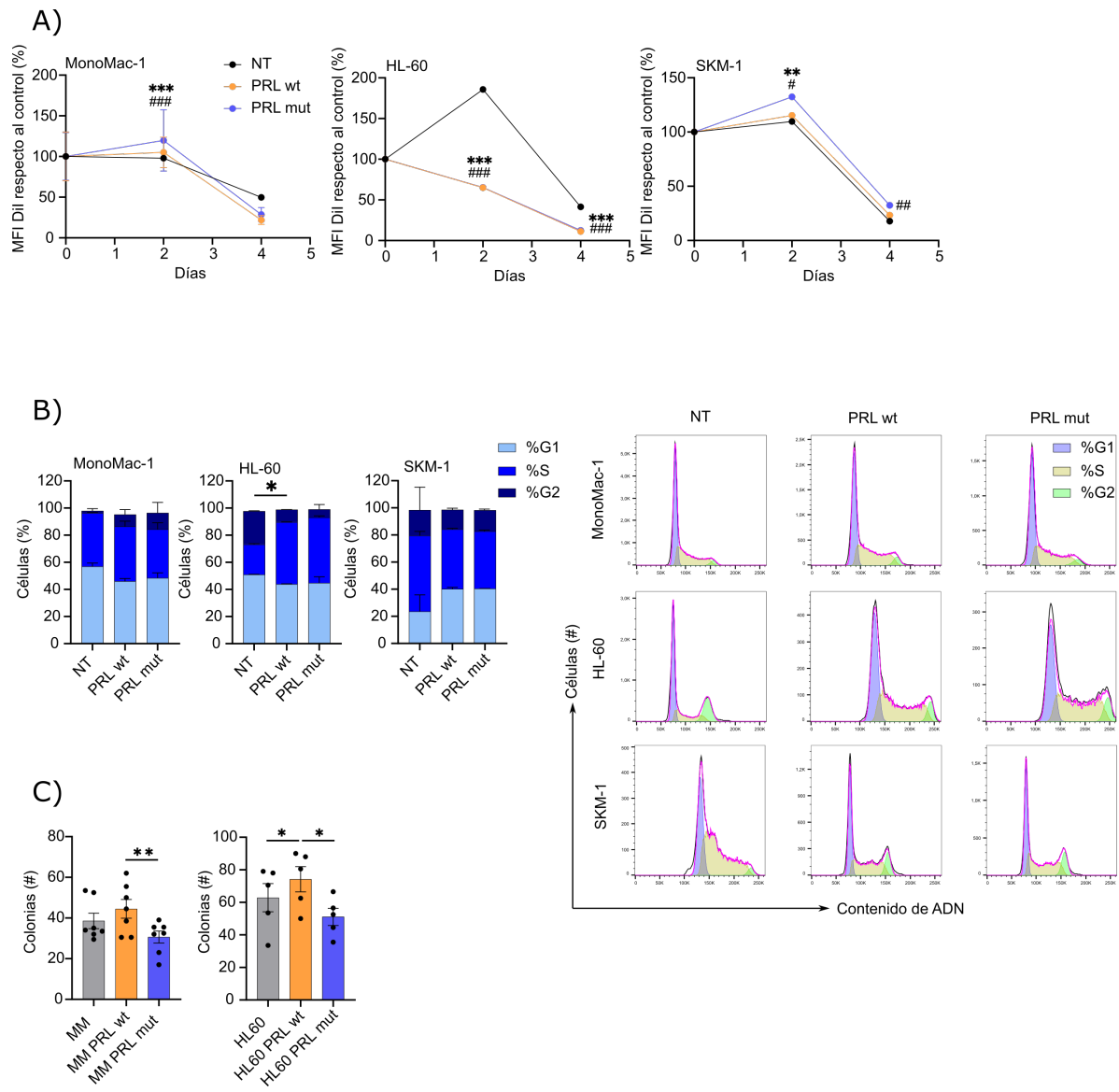


Figura 39. Las células de LMA transducidas con PRL wt tienen una capacidad proliferativa y clonogénica mayor que las transducidas con la forma dominante negativa. Las células MonoMac-1 (MM), HL-60 y SKM-1 no transducidas (NT) y transducidas con PRL wt y PRL mut se analizaron para identificar diferencias fisiológicas. **A)** Las células se marcaron con DiI y se cultivaron durante 4 días, analizando la fluorescencia de la sonda para determinar la proliferación. Los puntos indican la media de triplicados \pm SEM de dos experimentos independientes; la estadística NT vs PRL wt se representa con * y la estadística NT vs PRL mut se representa con #. **B)** Las células de LMA se fijaron y se analizó el ciclo celular mediante citometría de flujo; los datos se representan como porcentaje de células en cada fase representado como la media de triplicados \pm SEM de dos experimentos independientes (izquierda) y se muestra un histograma representativo de cada línea celular (derecha). **C)** Las células se sembraron en un medio semisólido en presencia de citoquinas instructivas y, pasados 7 días, se contabilizaron las colonias formadas. Las barras representan la media de duplicados de siete (MM) y cinco (HL-60) experimentos independientes \pm SEM y los puntos es la media de cada experimento. * o # $p < 0,05$; ** o ## $p < 0,01$; *** o ### $p < 0,001$.

Una vez observadas las diferencias presentes en la proliferación y, sobre todo, la clonogenicidad, se plantearon experimentos *in vivo* para determinar la capacidad leucemogénica de estas células. Para ello, se trabajó con modelos animales de xenotrasplante de células humanas en ratones inmunodeficientes NSG (NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ) condicionados con busulfán para la aceptación del injerto siguiendo un esquema similar a los experimentos *in vivo* anteriores (**Figura 40A**). Para poder tener un control interno de la capacidad de injerto de cada línea celular se realizaron ensayos de competición consistentes en la inyección de un número equivalente de células MonoMac-1 control (MM pULTRA-Smurf) y células MonoMac-1 de interés (MM pULTRA-vacío, -PRL wt o -PRL mut) y se dejaron proliferar 14 días hasta desarrollar leucemia. Previa inyección de células, se validó por citometría de flujo que las proporciones de células eran 50%-50% (**Figura 40B**). Una vez pasado el tiempo de injerto establecido, se extrajeron las células hematopoyéticas procedentes de la tibia y fémur y del bazo y, como los análisis de las células se realizaron por citometría de flujo y las células control y de interés presentan el marcador Smurf y GFP, respectivamente, las poblaciones celulares se pudieron separar y cuantificar. Los ratones control trasplantados con MonoMac-1 pSmurf y MonoMac-1 vacío presentan una capacidad de injerto igual para las dos poblaciones celulares, validando que la distinta transducción no tiene efectos a nivel de leucemogénia y puede ser usado como control interno de injerto. En cuanto a las células PRL wt, se ha observado el mismo resultado, ya que las proporciones entre poblaciones son similares, aunque ligeramente superiores en médula ósea. Por último, se ha observado una disminución de la capacidad de injerto en las células transducidas con PRL mut tanto en médula ósea como en bazo, indicando una menor capacidad leucemogénica y de migración a otros tejidos (**Figura 40C**). La menor capacidad de injerto de las células PRL wt se corresponde con el escaso efecto que tiene la isoforma en la proliferación y clonogenicidad, de igual manera que ocurre con los resultados obtenidos para la forma PRL mut, que se corresponden con una menor capacidad proliferativa y clonogénica observada en los experimentos *in vitro*. La forma dominante negativa del ligando proporciona buenos resultados para disminuir la malignidad de la leucemia.

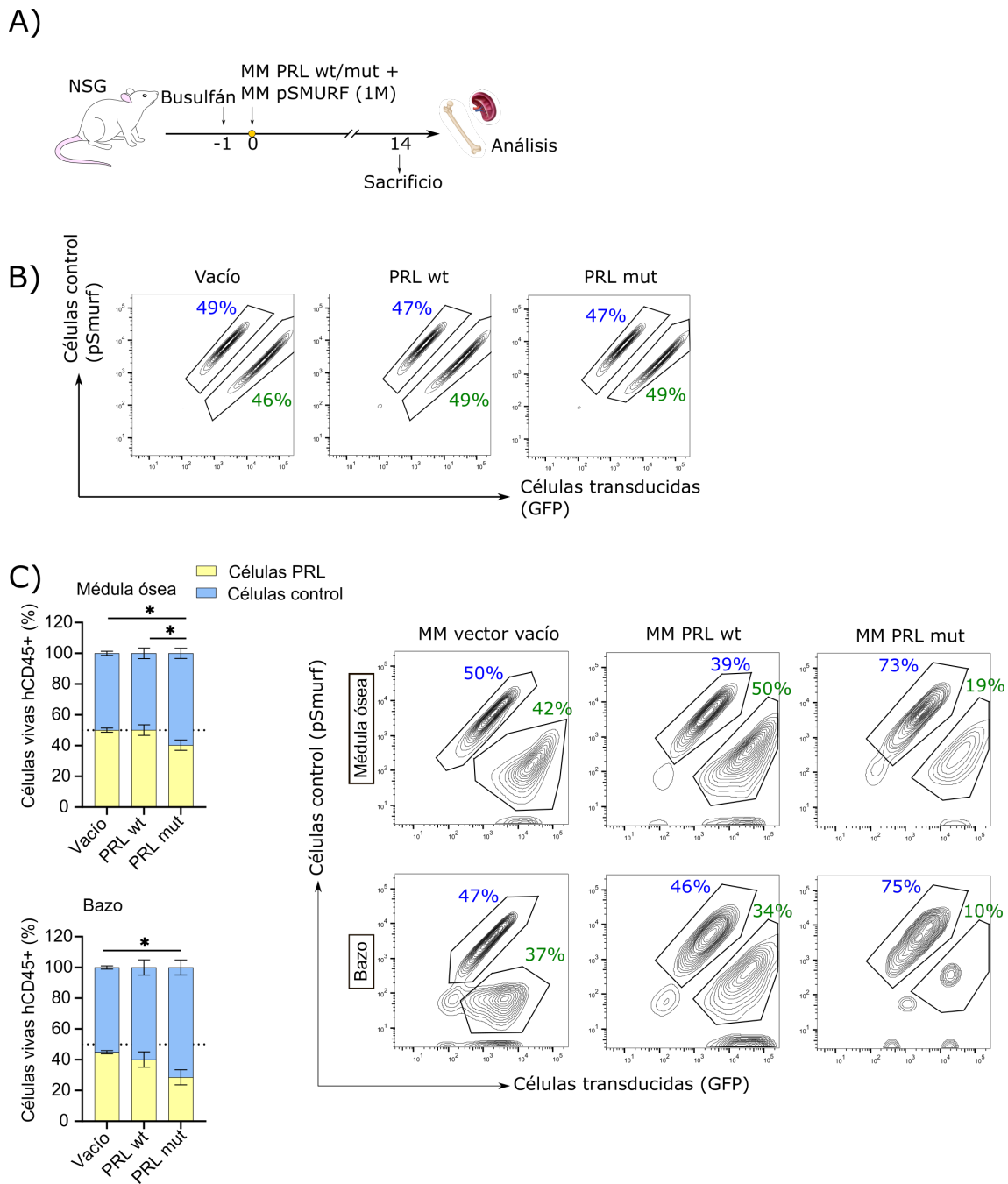


Figura 40. Las células transducidas con PRL mut tienen una capacidad leucemogénica inferior. A) Se inyectaron vía intravenosa un número equivalente de células MonoMac-1 pULTRA-Smurf y MonoMac-1 pULTRA-vacío, -PRL wt o -PRL short en ratones NSG previamente condicionados con busulfán y, pasados 14 días, se sacrificaron y se extrajeron las células de la tibia y fémur y del bazo (n=28). **B)** Histogramas representativos de las poblaciones de células antes de la inyección intravenosa. **C)** Los resultados se analizaron por citometría de flujo y se agruparon en función del marcador correspondiente. Los gráficos de barras representan la media del porcentaje de células de todos los ratones \pm SEM, corrigiendo los valores al 100%. Los histogramas de citometría de flujo muestran las poblaciones y el porcentaje de células en cada una de ellas. *p<0,05.

4.2.5. Efecto diferencial de las células PRLR wt y PRLR short

Una vez analizadas las diferencias entre la producción de PRL wt y PRL mut, se decidió estudiar los efectos de la ganancia y pérdida de función del PRLR con las isoformas transducidas PRLR wt y PRLR short, respectivamente.

Para estudiar el papel en la proliferación, células MonoMac-1, HL-60 y SKM-1 no transducidas y transducidas con las isoformas PRLR wt y PRLR short se marcaron con la sonda DiI, que permite marcar inespecíficamente lípidos de la membrana celular y se pierde a medida que las células proliferan, permitiendo la detección de la capacidad proliferativa por citometría de flujo a lo largo de 4 días. Los resultados obtenidos son variables dependiendo de la línea celular, mientras que en MonoMac-1 no existen diferencias entre las distintas isoformas del receptor, las células HL-60 transducidas tienen una capacidad proliferativa mayor, pero en las células SKM-1 los resultados son opuestos, las células transducidas tienen una capacidad proliferativa inferior, sobre todo la isoforma PRLR wt (**Figura 41A**). Para poder esclarecer estos resultados, se recolectaron células MonoMac-1 y HL-60 no transducidas y transducidas con PRLR wt y PRLR short, se fijaron y se analizó el ciclo celular mediante citometría de flujo. No se observaron diferencias significativas entre las distintas fases, pero en la línea celular MonoMac-1 PRLR short se observa una disminución de células en fase G1 y un incremento de células en fase S. En cambio, en lo que respecta a las HL-60, la isoforma PRLR wt presenta una disminución de células en fase G1, producida posiblemente por el arresto celular en fase G2/M, en concordancia con el aumento proliferativo observado en el ensayo de proliferación (**Figura 41B**). En resumen, aunque sí observamos efectos proliferativos y en el ciclo celular, éste es residual y específico de cada línea celular.

Dado que el grado de diferenciación celular puede verse modificado por la expresión de diferentes elementos y se han observado efectos en la capacidad clonogénica, indicativa de la capacidad de autorrenovación y diferenciación de las células, se decidió analizar la diferenciación mieloide basal de las células de LMA. Las células MonoMac-1, HL-60 y SKM-1 no transducidas y transducidas con PRLR wt y PRLR short por citometría de flujo en función de la expresión de CD11b (diferenciación granulocítica) y CD14 (diferenciación monocítica), pero se observó mucha variabilidad, dificultando

las conclusiones **(Figura 41C)**. Por último, para realizar estudios de capacidad clonogénica, células MonoMac-1 y HL-60 no transducidas y transducidas PRLR wt y PRLR short se sembraron en un medio semisólido enriquecido en citoquinas instructivas y, pasados 7 días, se contaron las colonias formadas. Una vez más, se obtuvieron resultados muy heterogéneos, aunque se observa una disminución significativa de la clonogenicidad en la isoforma PRLR wt en MonoMac-1 y una tendencia al aumento de esta en las células HL-60 transducidas con PRLR wt y short **(Figura 41D)**. Estos resultados nos sugieren que los efectos de la sobreexpresión del receptor son mínimos en MonoMac-1 y SKM-1, mientras que en las células HL-60 observamos que la proliferación, la acumulación de células en fase mitótica y el incremento de la capacidad clonogénica se ven incrementados por la sobreexpresión de las isoformas de PRLR, sobre todo la isoforma salvaje. Esto posiblemente es debido a la distinta expresión de PRLR en superficie de las distintas líneas celulares. Dado que las HL-60 expresan niveles inferiores (4%), la sobreexpresión del receptor modificaría en mayor medida el comportamiento fisiológico de las células.

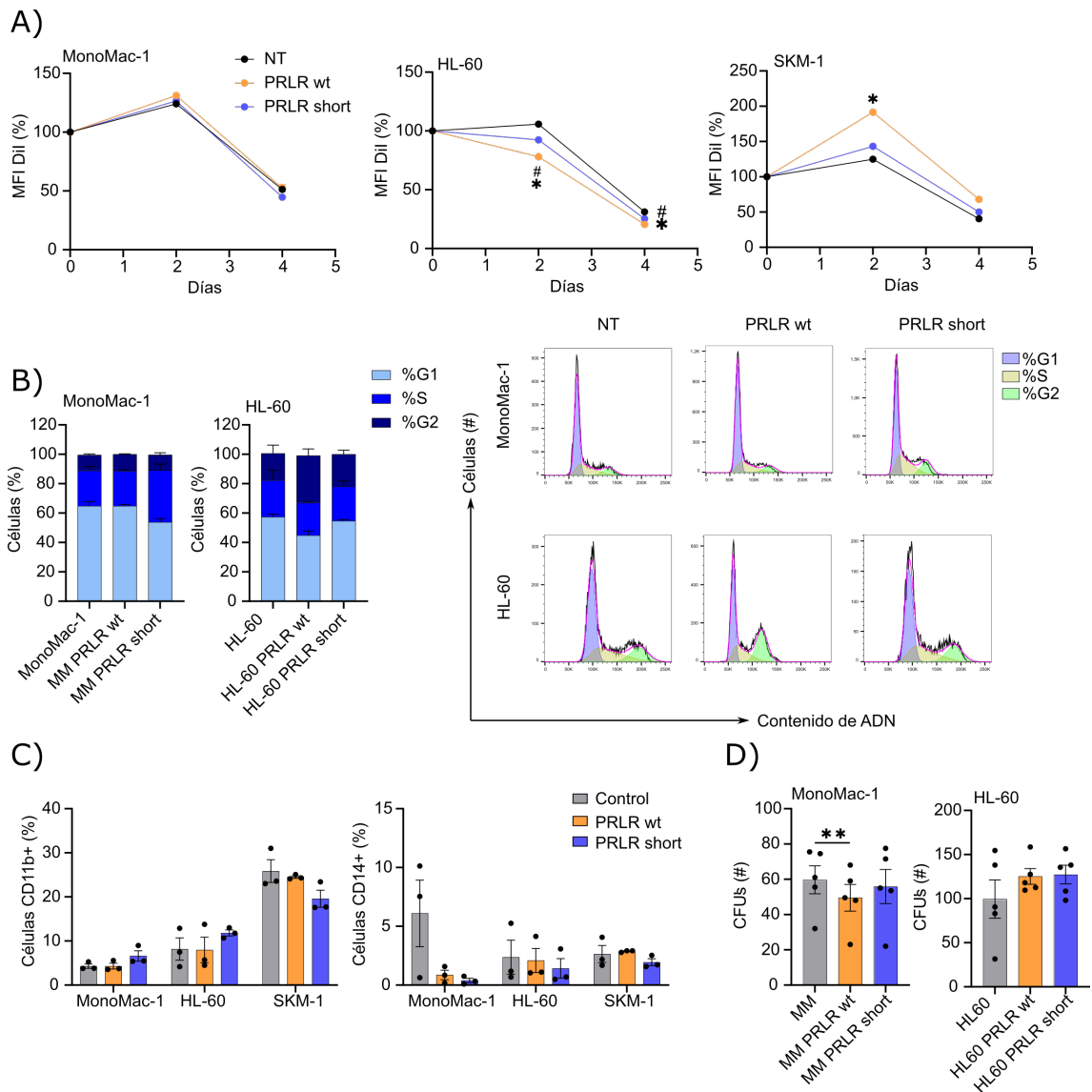


Figura 41. Las células transducidas con PRLR con una diferencia de expresión mayor respecto a la línea parental presentan un incremento en la proliferación, fase mitótica y clonogenicidad. Las células MonoMac-1 (MM), HL-60 y SKM-1 no transducidas (NT) y transducidas con PRLR wt y PRLR short se analizaron para identificar diferencias fisiológicas. **A)** Las células se marcaron con DiI y se cultivaron durante 4 días, analizando la fluorescencia de la sonda para determinar la viabilidad a día 0, 2 y 4. * indica la estadística NT vs PRLR wt y # indica la estadística de NT vs PRLR short. **B)** Las células se fijaron y se analizó el ciclo celular por citometría de flujo; las barras representan la media de triplicados del porcentaje de células en cada fase \pm SEM de dos experimentos independientes (izquierda) y un histograma representativo de cada línea celular (derecha). **C)** Se analizó la expresión en superficie de CD11b y CD14 por citometría de flujo; las barras representan la media de tres experimentos independientes del porcentaje de células CD11b⁺ y CD14⁺ \pm SEM; cada punto indica la media de cada experimento. **D)** Las células se sembraron en un medio semisólido enriquecido en citoquinas instructivas y, pasados 7 días, se contabilizaron las colonias formadas. Las barras indican la media de triplicados de cinco experimentos independientes \pm SEM; cada punto indica la media de cada experimento. * o #p<0,05; **p<0,01.

Aunque se han observado ligeras diferencias fisiológicas entre las isoformas del receptor *in vitro*, estas no son consistentes en todas las líneas celulares. Aun así,

sabemos que las condiciones *in vivo* están afectadas por muchos más factores que pueden alterar las acciones del receptor, por lo que se trabajó con modelos de animales de xenotrasplante de células humanas en ratones inmunodeficientes NSG (NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ) condicionados con busulfán para la aceptación del injerto. Una vez más, se realizó un ensayo de competición entre células MonoMac-1 control (MM pULTRA-pSmurf) y células MonoMac-1 transducidas con las isoformas de PRLR (pULTRA-vacío, -PRLR wt y -PRLR short) para tener un control interno. Se inyectó un número equivalente de células a cada ratón y se dejaron proliferar hasta desarrollar leucemia 14 días. Pasado este tiempo, se extrajeron las células de la tibia y fémur y del bazo, se seleccionó la población CD45⁺ para determinar las células hematopoyéticas humanas y se usó el marcador Smurf y GFP para diferenciar la población control y transducida por citometría de flujo (**Figura 42A**). En lo que respecta a las células control junto con el vector vacío, se observa una capacidad de injerto igual en las dos poblaciones, como era esperable. En cuanto a las células transducidas con la isoforma PRLR wt, se observa que la proporción respecto a las células control es 50/50, indicando que no hay efectos debido a la expresión del receptor, de la misma manera que ocurre en los experimentos *in vitro* en las células MonoMac-1. Por último, se observa una disminución de la capacidad leucemogénica de las células transducidas con el dominante negativo PRLR short tanto en médula ósea como en el bazo, puesto que el porcentaje de injerto de estas células es significativamente menor con respecto al control (**Figura 42B**). La sobreexpresión de PRLR wt no tiene ningún efecto a nivel proliferativo *in vitro* y, en concordancia, no tiene efectos sobre la capacidad leucemogénica de las células *in vivo*. En cambio, sí que observamos que la imposibilidad de transducción de señal característica de la forma PRLR short disminuye la capacidad de injerto de las células, de igual manera que ocurre con la forma dominante negativa del ligando. Además, la disminución de células PRLR short en el bazo respecto al control o a las células transducidas con PRLR wt nos indica una incapacidad de las células para colonizar otros tejidos, hecho interesante a nivel de terapia relacionada con el PRLR.

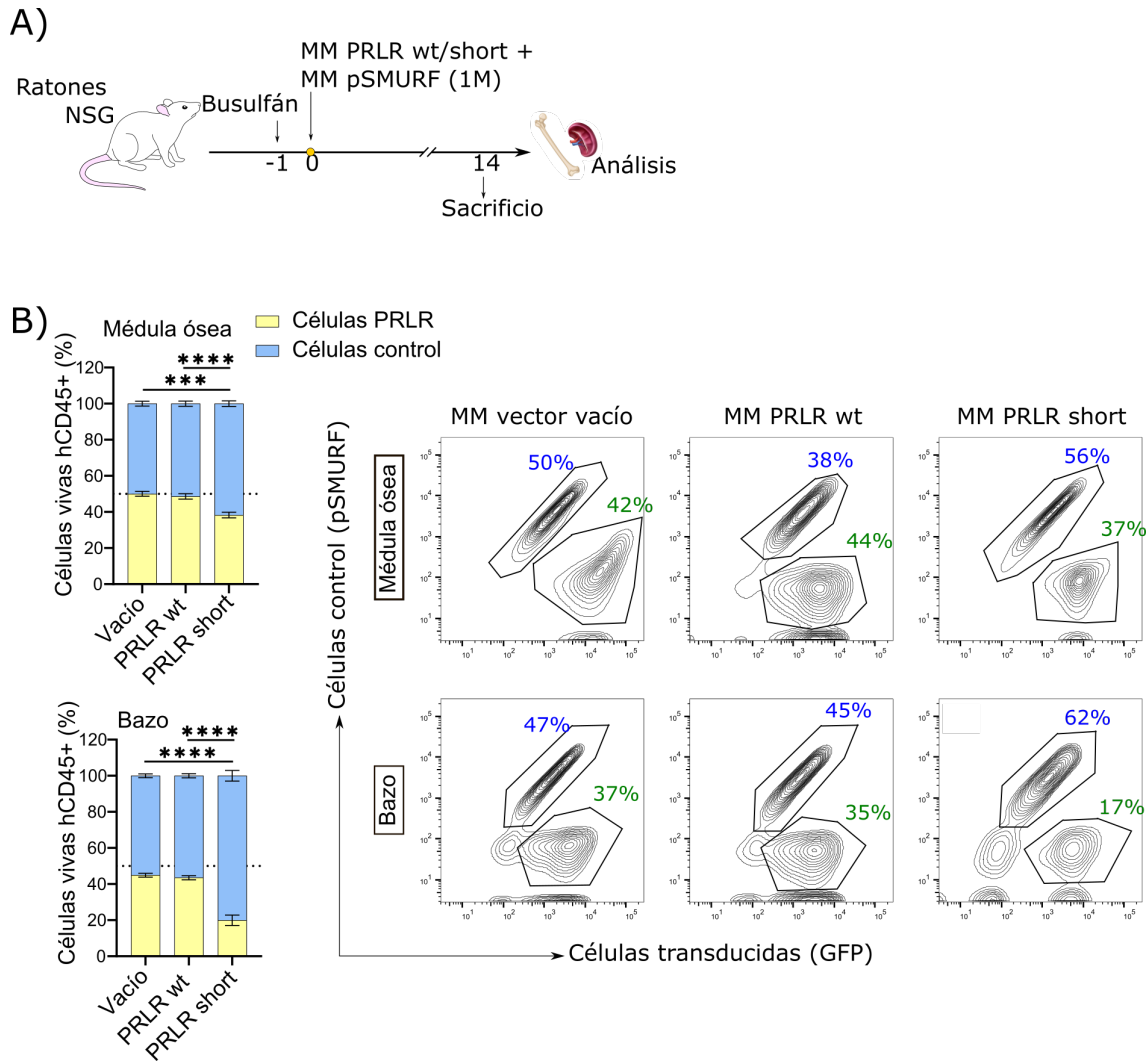


Figura 42. Las células transducidas con PRLR short tienen una capacidad leucemogénica inferior en médula ósea, mucho más pronunciada en bazo, relacionándose posiblemente con una capacidad migratoria inferior. A) Se inyectaron vía intravenosa un número equivalente de células MonoMac-1 (MM) pULTRA-Smurf y MonoMac-1 pULTRA-vacío, -PRLR wt y -PRLR short en ratones NSG previamente condicionados con busulfán y, pasados 14 días, se sacrificaron y extrajeron las células de la tibia y fémur y del bazo (n=31). **B)** Los resultados se analizaron por citometría de flujo y se agruparon en función del marcador correspondiente. Los gráficos de barras representan la media del porcentaje de células de todos los ratones \pm SEM, corrigiendo los valores al 100%. Los histogramas de citometría de flujo muestran las poblaciones y el porcentaje de células en cada una de ellas. ***p<0,001: ****p<0,0001.

4.2.5.1. Estudio de la capacidad migratoria

Los experimentos de competición *in vivo* realizados con las células PRLR wt y PRLR short han demostrado que las últimas tienen una capacidad leucemogénica y migratoria inferior, ya que su presencia en médula ósea y en bazo es menor en comparación con las células control y las PRLR wt. Por ese motivo, se decidió estudiar la implicación de CXCR4 (CD184), un receptor de membrana presente en las células

leucémicas y relacionado con la capacidad de migración (Teicher & Fricker, 2010). En condiciones normales, CXCR4 se encuentra activo, estimulado por CXCL12, su ligando, permitiendo que las células permanezcan en el nicho del estroma medular. Cuando el receptor es farmacológicamente inhibido, las señales de supervivencia se ven inhibidas y, además, permite a las células migrar fuera de la médula ósea y colonizar otros tejidos, como podría ser el bazo (Cancilla et al., 2020; Tavor et al., 2004) (**Figura 43**).

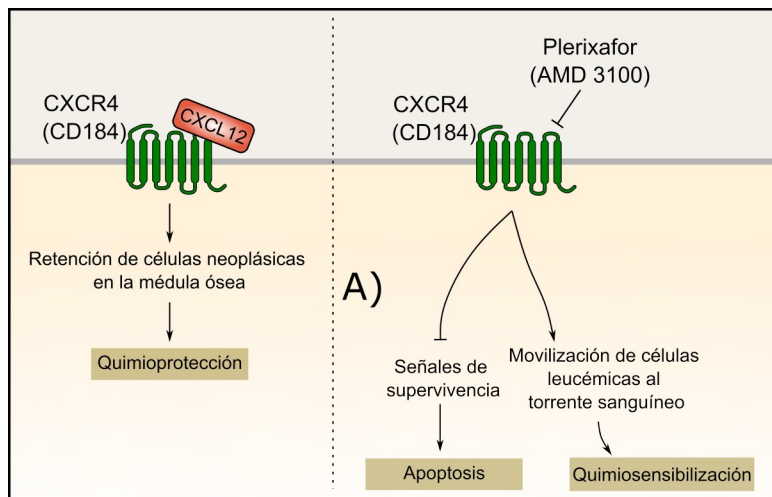


Figura 43. Modulación de CXCR4 (CD184) sobre las células leucémicas. Adaptación de Cancilla *et al.* (Cancilla et al., 2020).

Primero de todo, se analizó la expresión de CD184 por citometría de flujo en las células MonoMac-1, HL-60 y SKM-1 no transducidas y transducidas con PRLR wt y PRLR short en estado basal. Aunque no se observaron diferencias entre las distintas isoformas, sí se observó que en la línea celular HL-60 sólo el 50% de las células expresan el receptor en superficie, mientras que el 100% de las células MonoMac-1 y SKM-1 lo expresaban (**Figura 44A**). Las líneas celulares de LMA con la mayor expresión de CD184 pertenecen al subtipo M4 y M5 según la clasificación FAB (Bennett et al., 1976), asociadas a una mayor expresión del receptor en superficie (Cancilla et al., 2020). Seguidamente, para determinar qué papel tenía la vía de señalización de PRLR sobre el CD184, las células MonoMac-1 no transducidas y transducidas con PRLR wt y PRLR short se trataron 24h, 48h y 72h con un vehículo, PRL o G129R y se determinó la expresión de CD184 por citometría de flujo. El estímulo de PRLR con el ligando disminuye la expresión de CD184 en superficie,

siendo más notable a 48h y 72h, mientras que el G129R no tiene ningún efecto **(Figura 44B)**. Con la idea de validar estos resultados en otras líneas de LMA y viendo que la mayor disminución de CD184 tenía lugar a las 72h, células MonoMac-1, HL-60 y SKM-1 no transducidas y transducidas con PRLR wt y PRLR short se trataron 72h con un vehículo, PRL o G129R y se analizó la expresión de CD184 por citometría de flujo de nuevo. La línea HL-60 transducida con PRLR wt presenta una tendencia a la disminución de CD184 bajo tratamiento con el ligando, mientras que la disminución del receptor en la línea SKM-1 PRLR wt es significativa y más pronunciada, emulando los resultados obtenidos en MonoMac-1 también expresando ectópicamente PRLR wt y con quien comparte subtipo en la clasificación FAB (Bennett et al., 1976). Por otro lado, el antagonista de PRLR no tienen ningún efecto sobre la expresión de CD184 **(Figura 44C)**. Por último, se analizó si la PRL podía tener un efecto sinérgico con un inhibidor de CD184, AMD3100, así que células MonoMac-1 no transducidas y transducidas con PRLR wt y PRLR short se trataron 48h con un vehículo, PRL, G129R sólo o en combinación con AMD3100 y se analizó la expresión de CD184 por citometría de flujo. Se observó que la PRL tenía un efecto mayor en la disminución de CD184 que el inhibidor AMD3100, aunque sólo observable cuando había una sobreexpresión de PRLR wt. No se observó ningún efecto al combinar AMD3100 y el antagonista del PRLR **(Figura 44D)**. Hasta el momento, se ha observado que en las células con mayor diferenciación (MonoMac-1 y SKM-1) y con una mayor expresión de PRLR y de CD184, el estímulo de la vía de PRLR disminuye los niveles de CD184, mientras que en células más indiferenciadas y con niveles de PRLR inferior (HL-60), los niveles de CD184 son inferiores y, además, la vía del PRLR afecta sus niveles de manera residual.

El receptor CXCR4 (CD184) tiene un papel crucial en el mantenimiento de la leucemia, pero cabe destacar las señales que permiten el secuestro de las células leucémicas en la médula ósea, donde reciben estímulos de supervivencia y anti-apoptóticos (Cancilla et al., 2020). Una vez observada la regulación negativa que ejerce la vía de señalización de PRLR sobre la expresión de CD184, se decidió estudiar la capacidad migratoria de las células mediante experimentos de migración a través de una membrana, que permiten la separación del pocillo de cultivo en dos cámaras, una

superior y una inferior, con una membrana. Células MonoMac-1 no transducidas y transducidas con PRLR wt y PRLR short se trataron con un vehículo, PRL o G129R durante 72h y se sembraron en la cámara superior con medio completo suplementado con un 5% de FBS. La cámara inferior contenía el estímulo atrayente, consistente en medio completo con 20% de FBS (gradiente de suero). Se analizó la cantidad de células que migraron hacia el estímulo del suero por citometría de flujo. La estimulación del PRLR afecta significativamente las células no transducidas y se traduce en una mayor capacidad de migración, siendo sólo una tendencia en las células transducidas con PRLR wt y PRLR short. Por otro lado, el antagonista no ejerce ningún efecto en la movilización de las células **(Figura 44E)**.

Todos los resultados explicados previamente nos muestran que las líneas celulares de LMA más diferenciadas (MonoMac-1 y SKM-1) tienen una mayor expresión de CD184 y, además, ese marcador es reprimido en mayor medida por la activación de la vía de señalización mediada por PRLR. Estos datos sugieren que la activación del PRLR regula negativamente la expresión de CD184 en superficie de las células leucémicas y, además, está relacionado directamente con la capacidad de migración de éstas.

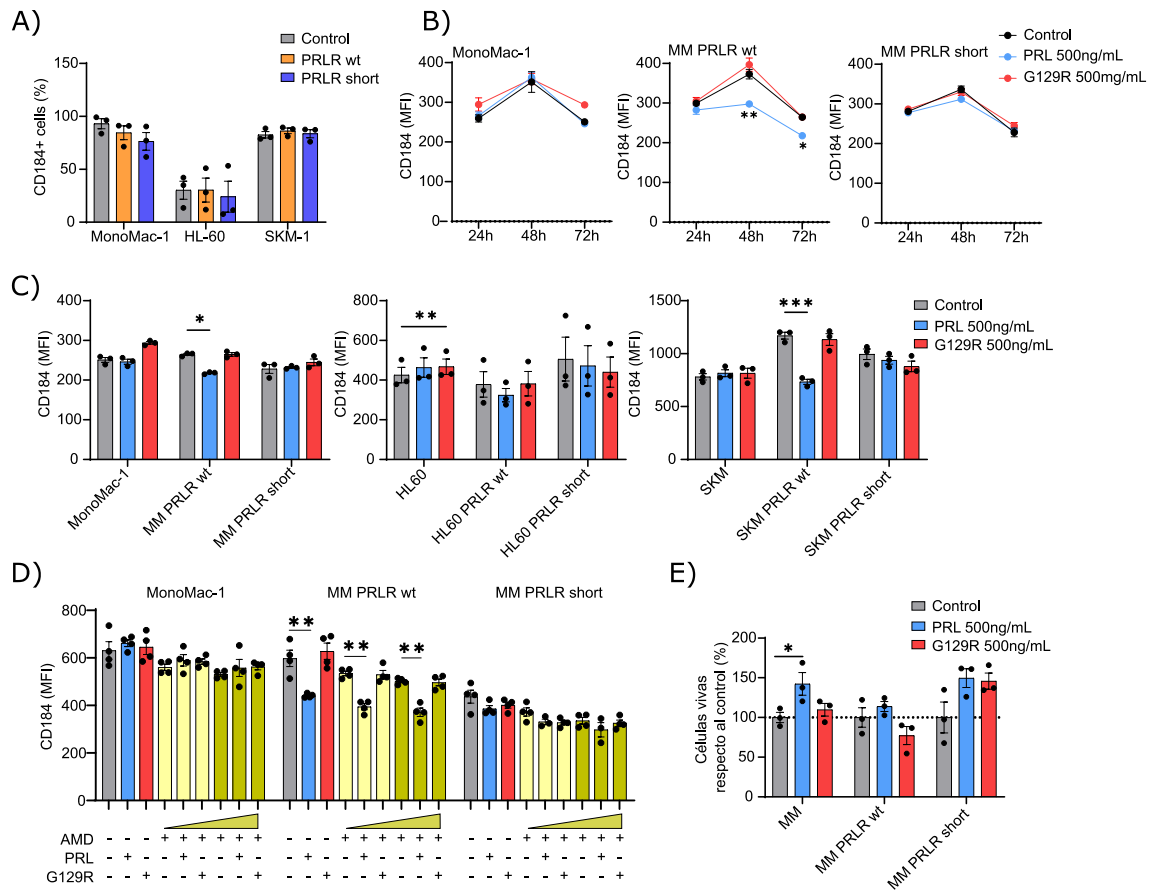


Figura 44. La vía de señalización PRL-PRLR regula negativamente la expresión de CD184 y promueve la movilización de las células leucémicas. La expresión de CD184 se analizó por citometría de flujo en células MonoMac-1 (MM), HL-60 y SKM-1 no transducidas (NT) y transducidas con PRLR wt y PRLR short en **A)** condiciones basales (n=3) y **B)** tratadas 24h, 48h y 72 (n=3) o **C)** sólo 72h con un vehículo, PRL o G129R 500ng/mL (n=3). **D)** Las células MonoMac-1 no transducidas (NT) y transducidas con PRLR wt y PRLR short se trataron 48h con un vehículo, PRL o G129R 500ng/mL junto con AMD3100 y se analizó la expresión de CD184 por citometría de flujo (n=4). **E)** Las células MonoMac-1 no transducidas (NT) y transducidas con PRLR wt y PRLR short se sembraron en un transpocillo y se trataron 72h con un vehículo, PRL o G129R 500ng/mL (n=3). Se analizó el número de células que migraron hacia un estímulo proporcionado por una concentración mayor de suero por citometría de flujo. Las barras indican la media de triplicados de los experimentos independientes \pm SEM y los puntos son la media de cada experimento. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

4.3. Papel de la PRL y del PRLR en la quimiorresistencia

4.3.1. Sensibilidad a quimioterapia en líneas celulares de LMA

La quimiorresistencia es uno de los problemas clínicos más importantes a la hora de combatir la LMA. Se ha observado que el 80% de los pacientes mayores de 65 años sucumben a la enfermedad en el lapso de un año desde el diagnóstico debido a procesos de quimiorresistencia (Shallis et al., 2019). Además, la principal causa de los procesos de recaída está asociado a la resistencia a fármacos (Marin et al., 2016). Por lo tanto, entender los mecanismos de resistencia y saber qué vías de señalización están implicadas es crucial para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas (Fajardo-Orduña et al., 2021). Por ello, se ha estudiado el papel de la señalización del PRLR en los procesos de quimiorresistencia.

Las líneas celulares de LMA MonoMac-1, HL-60, SKM-1, U-937 y KG-1 se han tratado 72h con los tres compuestos utilizados en clínica para combatir la LMA: azacitidina (Aza), daunorubicina (Dauno) y citarabina (AraC). Se ha analizado la viabilidad celular por citometría de flujo y se ha determinado el valor de la EC50 (**Figura 45A**). Los valores obtenidos para daunorubicina no muestran grandes diferencias entre líneas, pero sí lo hacen en el caso de la azacitidina y la citarabina, por lo que se ha decidido hacer una correlación con la expresión de PRLR de cada línea, que también es ligeramente distinta (**Figura 45B**). Sorprendentemente, se observa que el incremento de expresión de PRLR en las líneas celulares deriva en una mayor resistencia a la citarabina, traducida en un valor de la EC50 superior, por lo que la expresión de PRLR se correlaciona positivamente con la resistencia a citarabina (**Figura 45C**). Estos datos corroboran los obtenidos en el análisis de muestras de pacientes de LMA, donde se observa una tendencia al incremento en la expresión de PRLR en pacientes refractarios a quimioterapia (50% de expresión de PRLR respecto a 35% en pacientes que responden a los tratamientos) (**Figura 18D**). Por lo tanto, en este punto del trabajo, se ha demostrado la implicación del PRLR no sólo en la proliferación y avance de la LMA, sino también en la respuesta a los tratamientos quimioterapéuticos comúnmente usados en clínica.

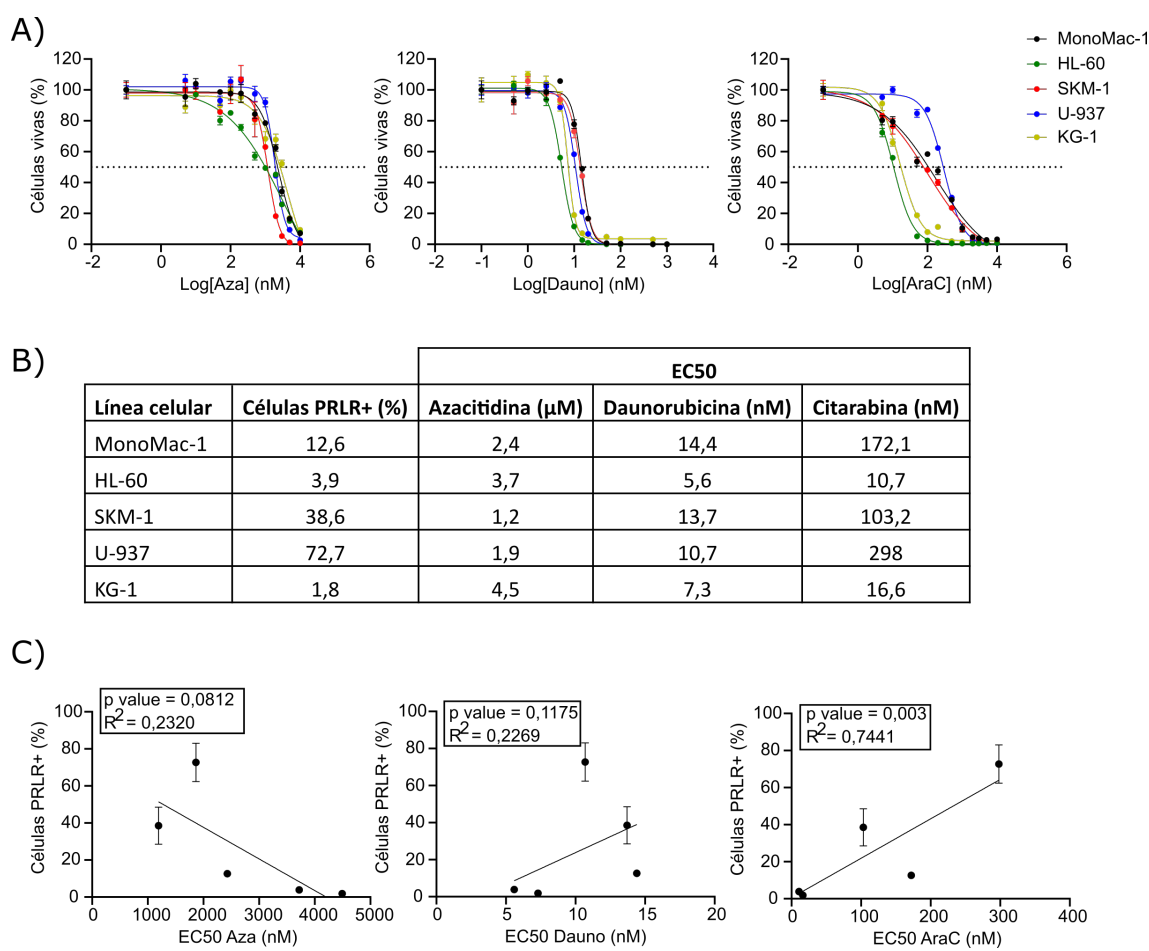


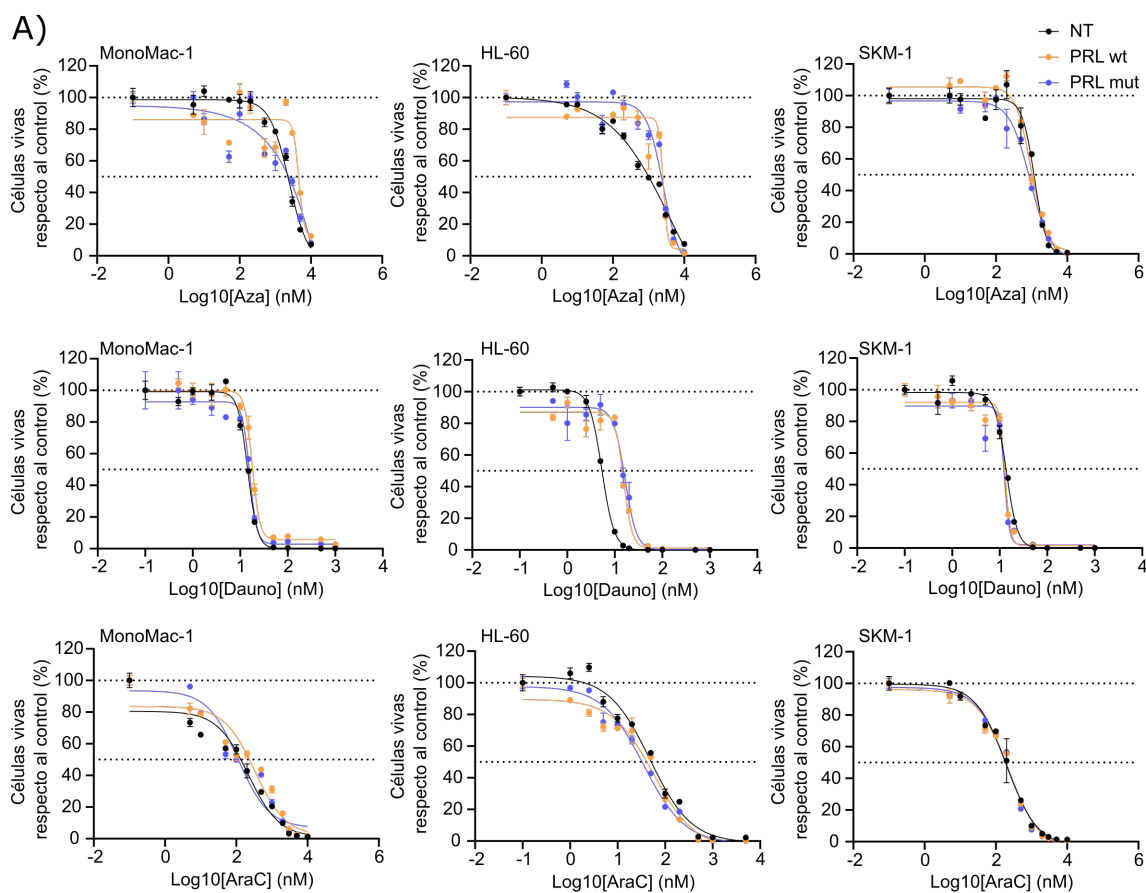
Figura 45. La expresión de PRLR correlaciona positivamente con una mayor resistencia a citarabina. A) Las células de LMA MonoMac-1 (MM), HL-60, SKM-1, U-937 y KG-1 se trataron 72h con concentraciones crecientes de azacitidina (Aza), daunorubicina (Dauno) y citarabina (AraC) y la viabilidad se analizó por citometría de flujo. Las gráficas son réplicas representativas donde cada punto es la media de triplicados \pm SEM ($n=3$). **B)** Se calculó el valor de la EC50 y la expresión de PRLR en superficie (representado en porcentaje de células PRLR+) por citometría de flujo. **C)** El valor de expresión de PRLR en superficie se correlacionó con la EC50 de cada fármaco. Cada punto representa el valor de una línea celular \pm SEM. $p < 0,05$ se consideró significativo.

4.3.2. Sensibilidad a quimioterapia en células de LMA transducidas con PRL wt y PRL mut

La observación de la implicación de la expresión de PRLR en la sensibilidad a citarabina, nos llevó a estudiar si este mecanismo estaba regulado por el papel del ligando o bien por la expresión de receptor. Para ello, se utilizaron las transducciones de las líneas celulares de LMA de PRL wt y mut y PRLR wt y short.

Las células MonoMac-1, HL-60 y SKM-1 no transducidas y transducidas con PRL wt y PRL mut se trataron 72h a dosis crecientes de azacitidina, daunorubicina y citarabina

y se determinó la viabilidad celular por citometría de flujo. La citotoxicidad ejercida por azacitidina no presenta diferencias en función de la isoforma de PRLR expresada, pero, en cambio, la línea HL-60 transducida con cualquiera de las dos formas del ligando sí que presenta una mayor resistencia a daunorubicina. Aun así, dado que no es consistente con las otras líneas celulares de LMA, no se estudió más. Por último, la sensibilidad a citarabina tampoco se ve afectada por las diferentes formas del ligando PRL (**Figura 46**). Esto nos sugiere que los mecanismos de resistencia asociados a citarabina en LMA residen en la expresión del PRLR y su funcionalidad, sin estar afectados por la abundancia o presencia de ligando.



B)

		EC50		
		Azacitidina (μM)	Daunorubicina (nM)	Citarabina (nM)
MonoMac-1	NT	2,4	14	215
	PRL wt	4,6	18	334
	PRL mut	2,6	16	112
HL-60	NT	3,7	5	48
	PRL wt	2,6	15	57
	PRL mut	2,6	16	35
SKM-1	NT	1,2	14	102
	PRL wt	1	13	100
	PRL mut	1	12	102

Figura 46. La PRL no afecta a la resistencia a citarabina asociada a la vía PRLR-PRL.

Las células MonoMac-1 (MM), HL-60 y SKM-1 no transducidas (NT) y transducidas con PRL wt y PRL mut se trataron 72h a dosis crecientes de azacitidina (Aza), daunorubicina (Dauno) y citarabina (AraC). **A)** La viabilidad se analizó por citometría de flujo y se muestra una gráfica representativa donde cada punto es la media de triplicados de un experimento independiente \pm SEM ($n=3$). **B)** Se calcularon los valores de la EC50.

Con tal de confirmar que la PRL no tiene ninguna implicación en la sensibilidad a citarabina, las células MonoMac-1, HL-60 y SKM-1 no transducidas y transducidas con PRLR wt se trataron 72h con un vehículo o PRL junto con citarabina a distintas dosis. La viabilidad se analizó por citometría de flujo y no se observó que la PRL fuese

capaz de revertir los efectos citotóxicos del fármaco (**Figura 47**). Por lo tanto, queda corroborado que el ligando no tiene ningún papel significativo en la resistencia a citarabina asociada con la vía de señalización del PRLR.

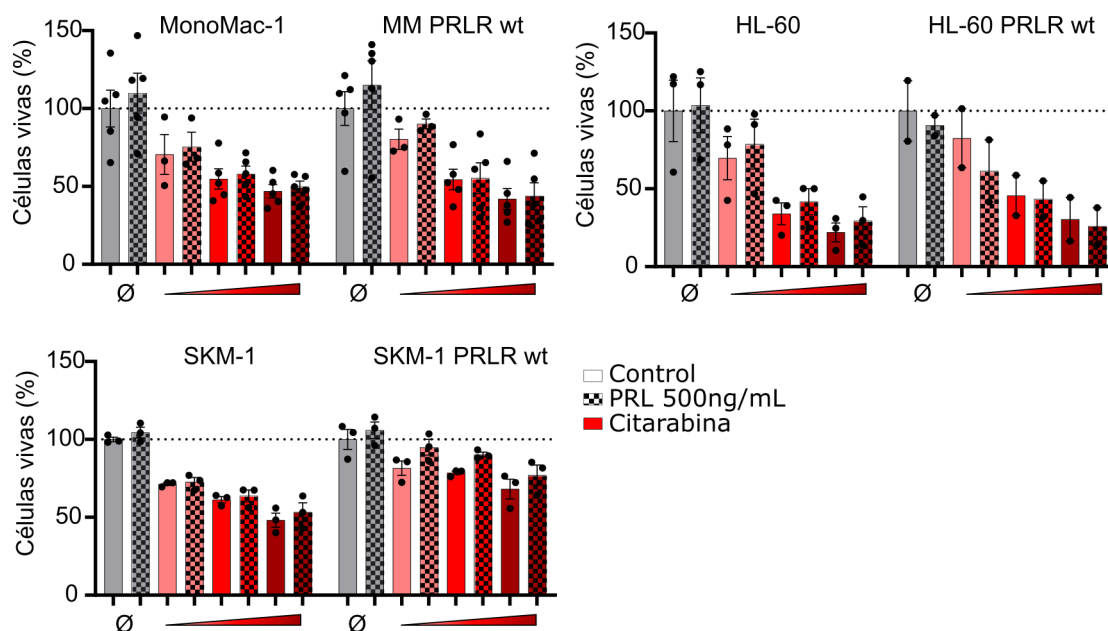
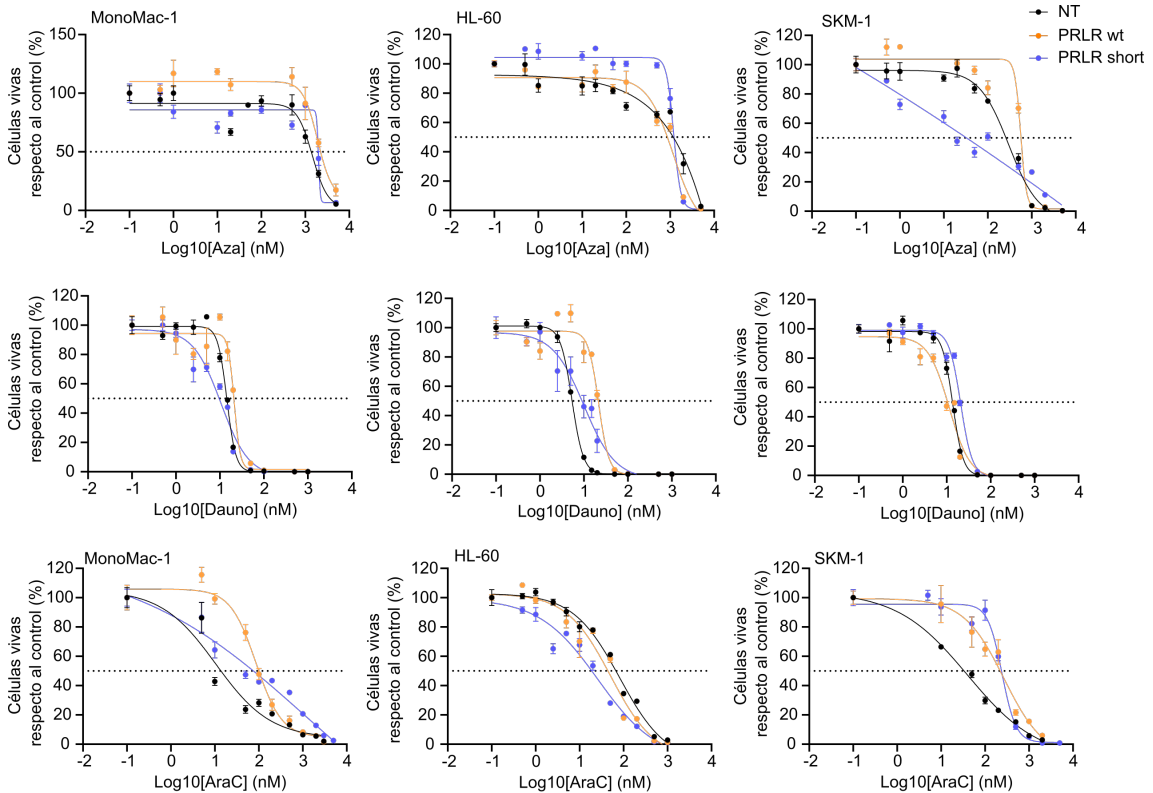


Figura 47. La PRL no es capaz de revertir los efectos citotóxicos de citarabina. Las células MonoMac-1 (MM), HL-60 y SKM-1 no transducidas (NT) y transducidas con PRLR wt se trataron 72h con un vehículo o PRL 500ng/mL, junto con citarabina 50nM, 250nM y 500nM para MonoMac-1, 5nM, 50nM y 100nM para HL-60 y 50nM, 100nM y 250nM para SKM-1. La viabilidad se analizó por citometría de flujo. Las barras representan la media de triplicados de cinco experimentos independientes en el caso de las MonoMac-1 y tres experimentos independientes para HL-60 y SKM-1 \pm SEM. Los colores más intensos del rojo corresponden a dosis más altas de citarabina y los cuadros el cotratamiento con PRL.

4.3.3. Sensibilidad a quimioterapia en células de LMA transducidas con PRLR

Los mecanismos que confieren resistencia a las células leucémicas se desconocen, pero son un gran reto a superar para encontrar tratamientos farmacológicos adecuados que erradiquen la LMA y prevengan las recaídas (Vosberg & Greif, 2019). En este trabajo se ha demostrado que una mayor expresión de PRLR en superficie afecta a la sensibilidad a citarabina, uno de los fármacos clásicos para el tratamiento de la LMA en clínica, sugiriendo que la señalización por el receptor está implicada en procesos de resistencia al fármaco. Las células MonoMac-1, HL-60 y SKM-1 no transducidas y transducidas con PRLR wt y PRLR short se trataron 72h a dosis crecientes de azacitidina, daunorubicina y citarabina y se observó que las líneas

celulares MonoMac-1 y SKM-1 transducidas presentaban un incremento en la resistencia a la citarabina (**Figura 48**). Las líneas celulares MonoMac-1 y SKM-1 parentales son las que presentan una mayor resistencia a citarabina, sensibilidad que se ve incrementada al sobreexpresar las dos isoformas del PRLR, posiblemente debido a interacciones entre ellas. En cambio, la menor expresión de la línea HL-60 parental dificulta la observación de este efecto.



		EC50		
		Azacitidina (μM)	Daunorubicina (nM)	Citarabina (nM)
MonoMac-1	NT	1,5	14,4	133
	PRLR wt	1,8	21,1	1100
	PRLR short	2	10,6	1195
HL-60	NT	0,6	5,4	63
	PRLR wt	0,7	21,5	51
	PRLR short	1,3	10,1	26
SKM-1	NT	0,6	13,7	40
	PRLR wt	0,4	11,4	270
	PRLR short	0,2	20,8	241

Figura 48. Las células MonoMac-1 y SKM-1 transducidas con PRLR presentan una mayor resistencia a los tratamientos con citarabina. Las células MonoMac-1, HL-60 y SKM-1 no transducidas (NT) y transducidas con PRLR wt y PRLR short se trataron 72h a dosis crecientes de azacitidina (Aza), daunorubicina (Dauno) y citarabina (AraC). La viabilidad se analizó por citometría de flujo y se calculó el valor de la EC50. Las gráficas

muestran una réplica representativa de tres experimentos independientes, donde cada punto es la media de triplicados de un experimento independiente \pm SEM.

4.3.4. Implicación del PRLR en la resistencia a citarabina

Para validar que los cambios relacionados con la resistencia a la citarabina son debidos al incremento de la PRLR, se escogieron las líneas de LMA HL-60, SKM-1 y KG-1, por tener una sensibilidad mayor al tratamiento, y se trataron hasta conseguir líneas resistentes que duplicaron los valores de las EC50 (**Figura 49**).

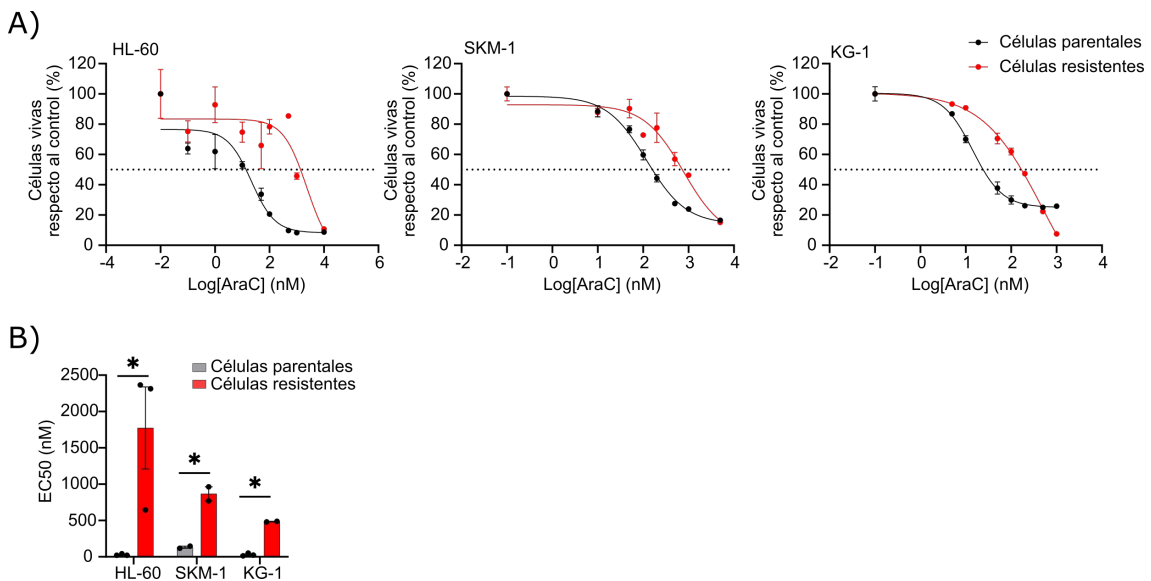


Figura 49. Las células de LMA resistentes generadas tienen una menor sensibilidad a la citarabina e incrementan el valor de su EC50. Las células HL-60, SKM-1 y KG-1 se trataron con citarabina 15nM, 50nM y 20nM, respectivamente, hasta que las células adquirieron resistencia. **A)** Las líneas parentales y resistentes se trataron con dosis crecientes de citarabina y la viabilidad se determinó por citometría de flujo. **B)** Los valores de las EC50 se calcularon y se observó que estaban incrementados en las líneas resistentes generadas. Los gráficos de las EC50 son una réplica representativa de tres experimentos individuales, donde cada punto es la media de triplicados de un experimento \pm SEM. Las barras representan la media del valor de la EC50 de tres experimentos independientes para HL-60 y dos para SKM-1 y KG-1. *p<0,05.

La implicación del PRLR en la quimiorresistencia se determinó mediante el análisis de la expresión en superficie del receptor por citometría de flujo y la cantidad de proteína por western blot de las células HL-60, SKM-1 y KG-1 parentales y resistentes. Todas las líneas celulares resistentes generadas presentan un incremento en la expresión en superficie de PRLR respecto a la línea celular parental (**Figura 50A**), mientras que el análisis de la proteína total revela que sólo HL-60 y SKM-1 incrementan la cantidad de PRLR, permaneciendo sin cambios en KG-1 (**Figura**

50B). Aunque se esperaría un aumento de PRLR en el análisis mediante las dos técnicas, es importante mencionar que el receptor funcional es el que se expresa en superficie, siendo el de interés. El receptor puede ser internalizado para regular su señalización y dejaría de transducir señales (Bouilly et al., 2012), por lo que el detectado en la proteína total podría estar parcialmente inactivo.

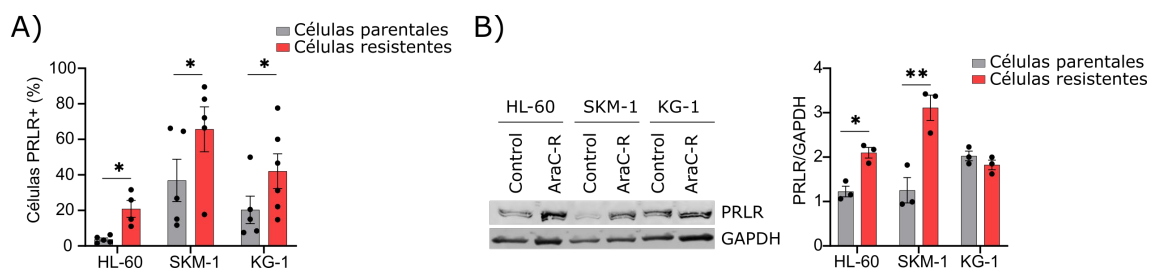


Figura 50. La expresión del PRLR está incrementada en superficie en las líneas de LMA resistentes a citarabina. Se analizó la expresión de PRLR de las células HL-60, SKM-1 y KG-1 parentales y resistentes a citarabina por **A)** citometría de flujo (HL-60 n=4; SKM-1 n=5; y KG-1 n=6) y **B)** western blot hibridando con el anticuerpo de PRLR y de GAPDH como control de carga (n=3). Las barras representan la media de triplicados de experimentos independientes \pm SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Una vez validada la relación entre el aumento de expresión del PRLR y la resistencia a citarabina, se decidió estudiar la implicación de la expresión de PRLR en la activación del fármaco. La citarabina se internaliza en la célula por difusión pasiva o mediante transportadores y, una vez llega al dominio intracitoplasmático, será activada por tres fosforilaciones distintas llevadas a cabo por diferentes enzimas. Finalmente, se internalizará en el núcleo, donde llevará a cabo sus efectos citotóxicos. Paralelamente, existen otras moléculas encargadas de inactivar la citarabina, impidiendo que los efectos citotóxicos se lleven a cabo (Cros et al., 2004; Fajardo-Orduña et al., 2021; Negoro et al., 2011) (**Figura 3**).

Para determinar los cambios que produce la sobreexpresión de PRLR en la internalización y activación de la citarabina, se realizaron RT-PCR semi-cuantitativas para estudiar la expresión génica de diferentes genes implicados en células MonoMac-1, HL-60 y SKM-1 no transducidas y transducidas con PRLR wt y PRLR short. Se estudiaron los transportadores internalizadores hENT1-3 y el externalizador MRP4, los activadores dCK y NDK y los inactivadores PN-I, CDA y NT5E. Aunque los resultados presentan variación y las líneas celulares no se comportan exactamente igual, sí que observamos una disminución de hENT1-3 en la mayoría de líneas y un

incremento en MRP4, únicamente en MonoMac-1 cuando sobreexpresa PRLR wt. A grandes rasgos, los activadores también se encuentran disminuidos en células HL-60 y SKM-1, pero no en la línea celular MonoMac-1 y, finalmente, los inactivadores se encuentran sobreexpresados en su mayoría en todas las líneas celulares (**Figura 51**). En resumen, tenemos una internalización menor de citarabina, siendo mayormente inactivada y/o expulsada, disminuyendo los efectos citotóxicos cuando se sobreexpresa PRLR en el contexto leucémico (**Figura 52**).

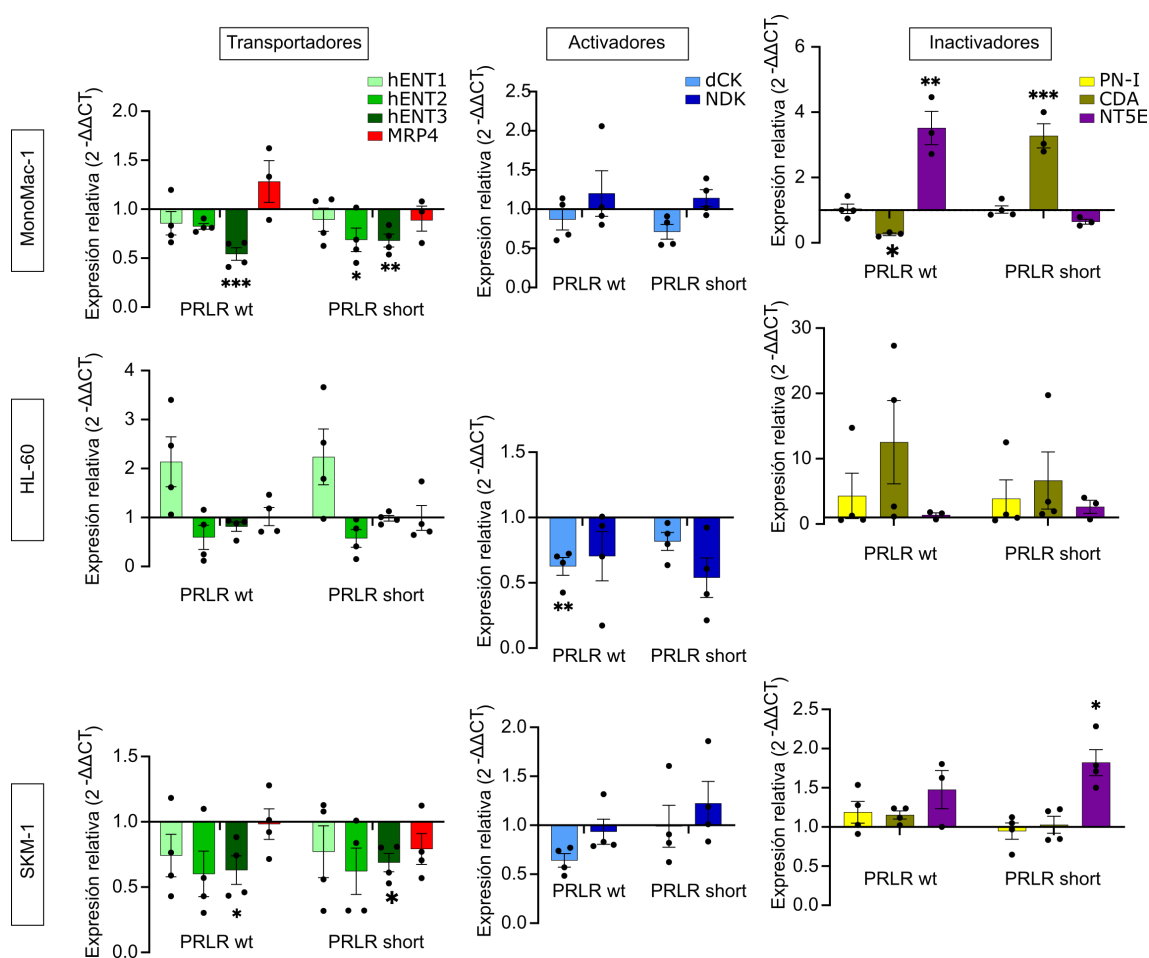


Figura 51. La sobreexpresión de PRLR promueve cambios génicos que favorecen la resistencia a citarabina. La expresión génica de transportadores (hENT1-3 y MRP4), activadores (dCK y NDK) e inactivadores (PN-I, CDA y NT5E) de citarabina, así como el gen de referencia GAPDH se analizó en las líneas MonoMac-1 (MM), HL-60 y SKM-1 no transducidas (NT) y transducidas con PRLR wt y PRLR short. Las barras representan la media de triplicados de cuatro experimentos independientes \pm SEM y cada punto es la media de un experimento. Los datos se representan como el nivel de expresión de cada gen después de normalizar con el gen de referencia GAPDH y con las células no transducidas. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

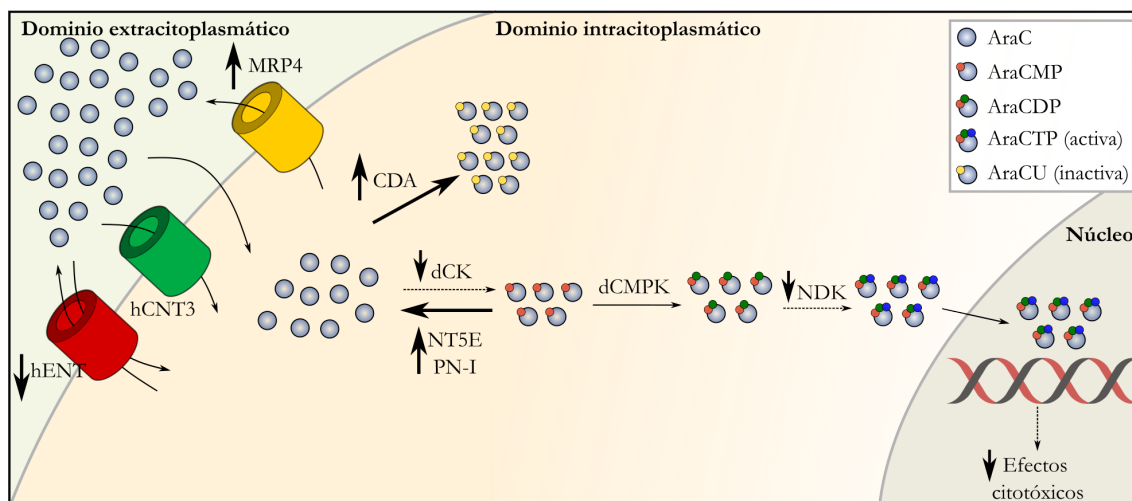


Figura 52. Cambios en la expresión génica en el metabolismo de la citarabina debido al incremento de expresión de PRLR.

4.3.5. Sensibilidad a quimioterapia y senescencia

En cuanto a la resistencia, en este punto hemos observado que el incremento de expresión de PRLR confiere resistencia a las células mediante cambios en la expresión génica de genes relacionados con el metabolismo de la citarabina. Aun así, debido a la variabilidad observada en estos datos, es posible que haya otros mecanismos celulares implicados. Uno de los mecanismos utilizados por las células oncogénicas para evitar la destrucción de éstas por fármacos consiste en procesos que promueven la parada del ciclo celular y la consecuente entrada en senescencia (Di Micco et al., 2006). De esta manera, la célula permanecerá en un estado quiescente y esperará el momento oportuno para salir de este estado y volver a proliferar (Duy et al., 2021). La elevada tasa de proliferación de los blastos, la presencia de oncogenes y los tratamientos citotóxicos producen daños en el ADN (DDR), caracterizado principalmente por la activación de ATM y ATR, que producirán la activación de p53 y una subsecuente parada del ciclo celular y entrada en senescencia (Di Micco et al., 2021). Las células permanecerán en este estado hasta que las condiciones sean óptimas de nuevo y puedan volver a replicarse. Las células en estado senescente secretan SA- β -gal, que puede ser detectada y nos permite determinar el estado senescente de las células (Di Micco et al., 2021). Las células HL-60, SKM-1, MonoMac-1 y U-937 se han marcado para observar la cantidad de SA- β -gal (**Figura 53A**) y se ha observado que a mayor expresión de PRLR, las células presentan un estado senescente incrementado (**Figura 53B**). Por lo tanto, un aumento de la expresión del receptor

se relacionaría con un estado senescente más elevado y la consecuente resistencia a fármacos.

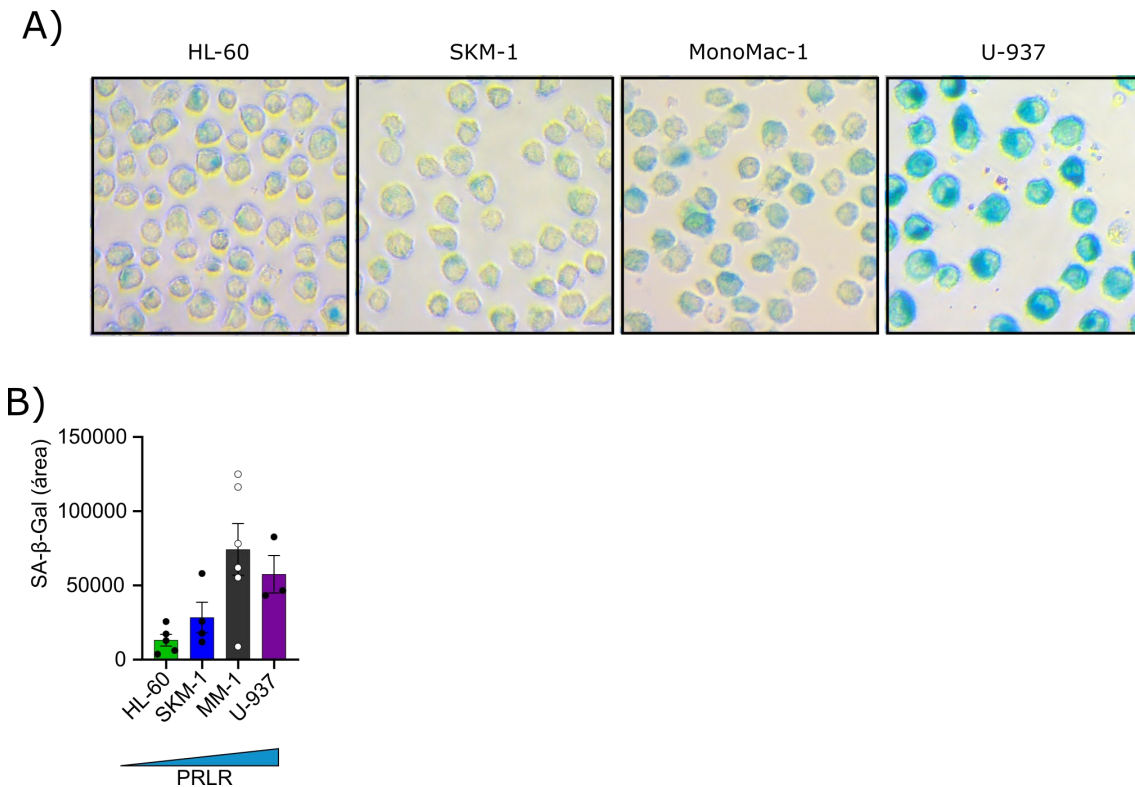


Figura 53. Las células de LMA con una expresión mayor de PRLR son más senescentes y, por lo tanto, más resistentes a tratamientos farmacológicos. Las células HL-60 (n=4), SKM-1 (n=4), MonoMac-1 (MM, n=6) y U-937 (n=3) se fijaron y se tiñeron para poder observar la SA-β-gal. **A)** Las imágenes se observaron en un microscopio invertido y se muestra un campo representativo a 40x aumentos. **B)** Las imágenes se cuantificaron con el software ImageJ y se ha representado el área teñida. Las barras representan la media de tres cuantificaciones de experimentos independientes \pm SEM, donde cada punto es la media de cada experimento.

Para corroborar estos resultados, se decidió seleccionar células MonoMac-1, HL-60 y SKM-1 no transducidas y transducidas con PRLR wt y PRLR short, fijarlas y marcarlas para detectar la SA-β-Gal. Se han observado resultados dispares entre las líneas celulares de LMA. Por un lado, se observa un estado senescente menor en todas las líneas celulares en comparación con las células U-937 analizadas anteriormente (**Figura 53**). En lo que respecta a las transducciones con PRLR, en la línea celular MonoMac-1 no se observan diferencias en cuanto a la cantidad de SA-β-Gal en función de la expresión de PRLR. En cambio, en las líneas células HL-60 y SKM-1 que sobreexpresan PRLR wt se observa un incremento del estado senescente, volviendo a los niveles de las células parentales cuando la transducción sobreexpresa

la isoforma dominante negativa del receptor (**Figura 54**). La línea celular MonoMac-1 está considerada un modelo de resistencia a citarabina, motivo por el cual no se intentó generar resistencia previamente en estas células. Posiblemente, la resistencia farmacológica está relacionada con el estado senescente, que no puede verse incrementado o, si no, las células entrarían en estado quiescente y dejarían de replicarse, fenómeno que no observamos *in vitro* al cultivarlas. En cambio, las células HL-60 y SKM-1 son sensibles a citarabina, así que la sobreexpresión de PRLR wt promueve una entrada parcial a la senescencia, confiriéndoles más resistencia farmacológica.

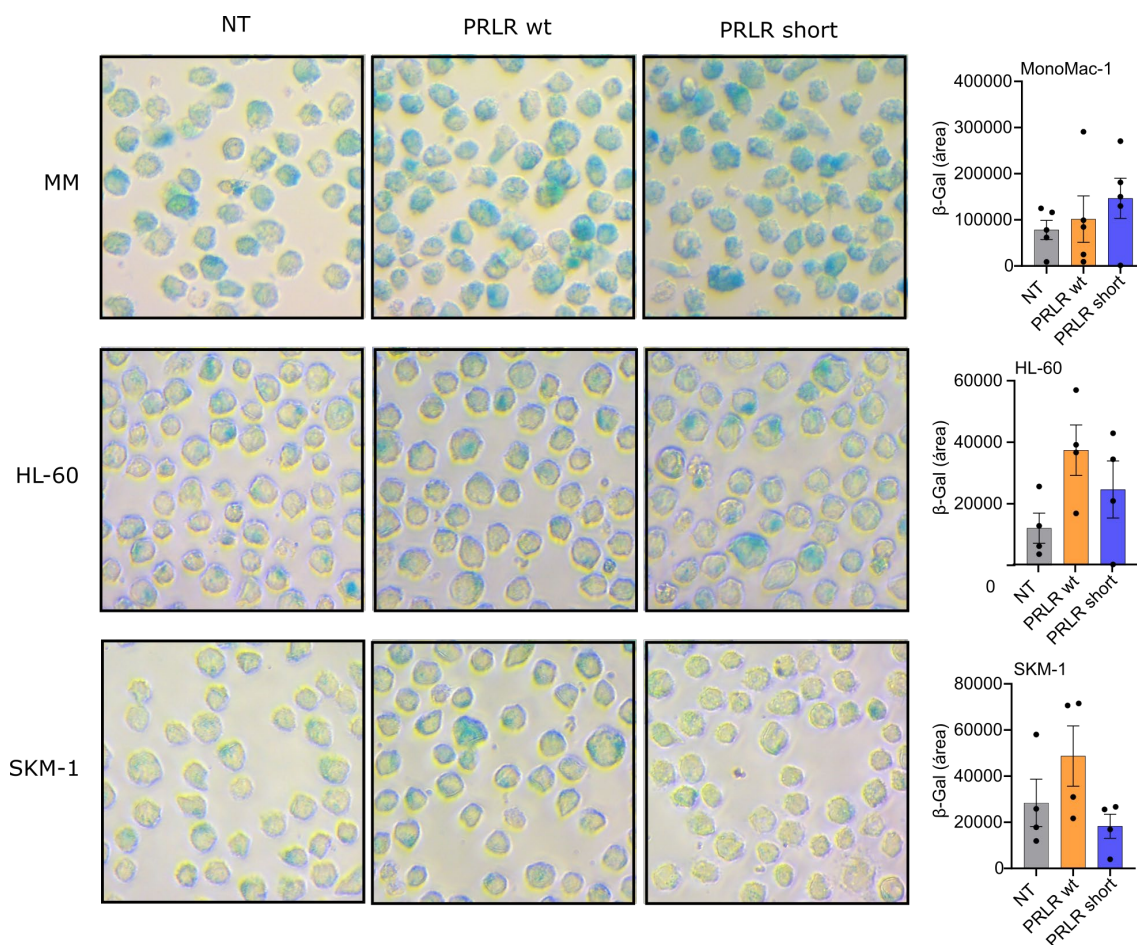


Figura 54. Las células de LMA sensibles a citarabina y transducidas con PRLR wt son más senescentes que la línea parental. Las células MonoMac-1 (MM, n=5), HL-60 (n=4), SKM-1 (n=4) no transducidas (NT) y transducidas con PRLR wt y PRLR short se fijaron y se tiñeron para poder observar la SA-β-gal. Las imágenes se observaron en un microscopio invertido y se muestra un campo representativo a 40x aumentos. La tinción se cuantificó con el software ImageJ. Las barras representan la media de la cuantificación de tres imágenes de experimentos independientes \pm SEM.

Hemos observado que el incremento de expresión de PRLR tanto de líneas de LMA, como el incremento de su expresión por transducción incrementa el estado senescente de las células sensibles a citarabina. Para poder relacionarlo con la resistencia a quimioterapia, las células MonoMac-1, HL-60 y SKM-1 no transducidas y transducidas con PRLR wt y PRLR short se trataron 24h con citarabina, se fijaron y se marcaron para poder analizar la presencia de SA- β -Gal. Los cambios observados en la línea celular MonoMac-1 no transducida y transducida con PRLR son insignificantes, posiblemente debido a la resistencia inherente de las células. En las células HL-60 y SKM-1 parentales, así como en las transducidas con PRLR short, se observa un incremento de la senescencia relacionada con el tratamiento con citarabina, pero mayor que el observado en las líneas transducidas con PRLR wt. Estas diferencias se deben, posiblemente, al mismo mecanismo que ocurre en la línea celular MonoMac-1: una línea celular con resistencia notoria al tratamiento ya tendrá niveles senescentes incrementados, que no podrán aumentar (**Figura 55**). Estos resultados nos sugieren que, aunque el tratamiento con el agente citotóxico citarabina incrementa el estado senescente de las células, si estas de forma basal ya presentan resistencia y son senescentes, el grado de senescencia no se podrá incrementar. Esto se relaciona con la mayor expresión de PRLR en superficie, que permite a la célula permanecer en un grado de senescencia elevado y, por lo tanto, no podrá verse incrementado al tratar con citarabina.

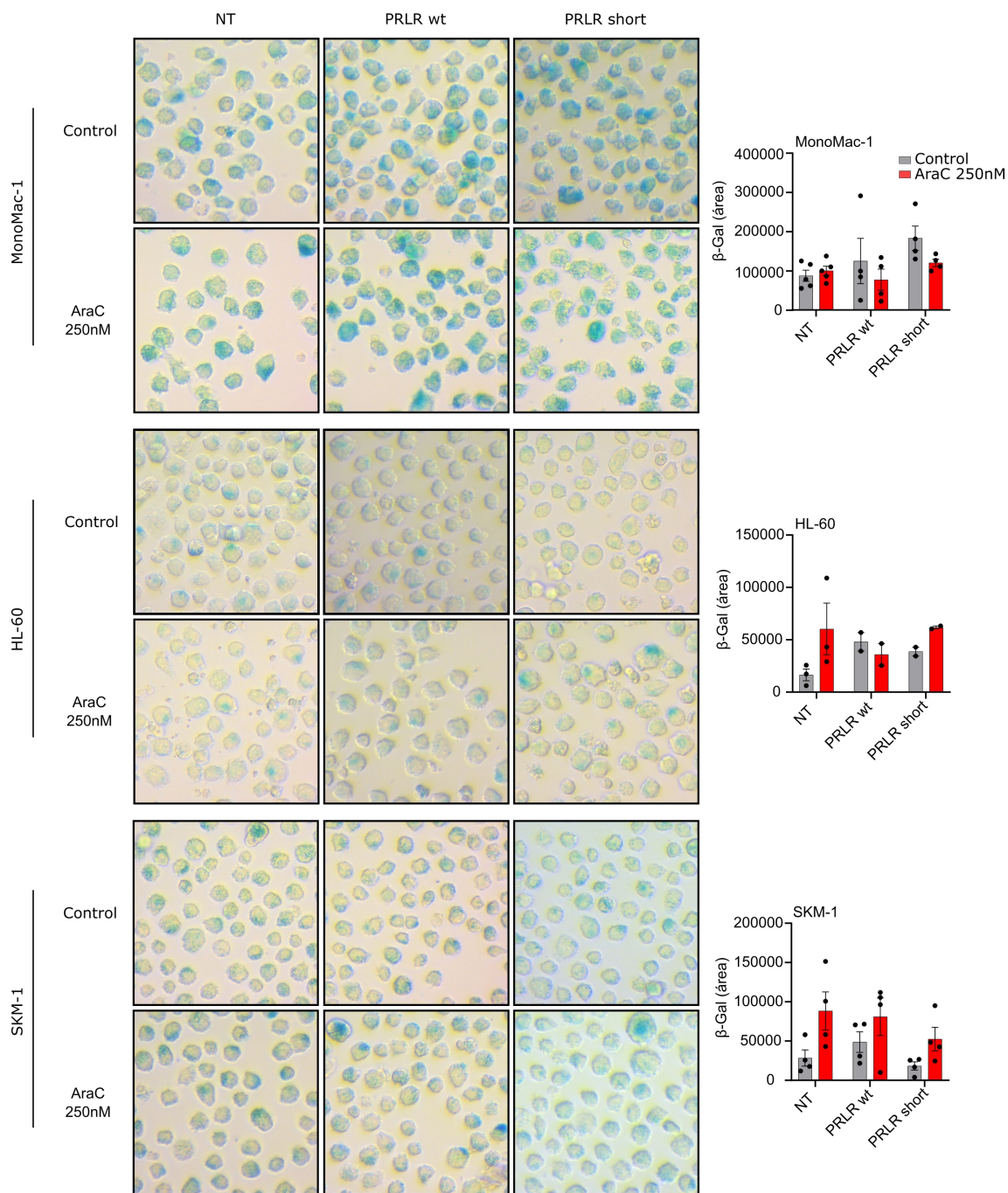


Figura 55. El estado senescente se relaciona con una mayor expresión de PRLR y una mayor resistencia a citarabina. Las células MonoMac-1 (MM, n=5), HL-60 (n=3) y SKM-1 (n=4) no transducidas (NT) y transducidas con PRLR wt y PRLR short se trataron 24h con citarabina 250nM, se fijaron y se tiñeron para poder observar la SA-β-gal. Las imágenes se observaron en un microscopio invertido y se muestra un campo representativo a 40x aumentos (izquierda), así como la cuantificación con el software ImageJ (derecha). Las barras representan la media de tres imágenes cuantificadas de experimentos independientes ± SEM.

Como se ha comentado anteriormente, las células pueden entrar en senescencia debido a diversos mecanismos. Aun así, todos ellos convergen en daños en el ADN. Los daños citotóxicos producidos por la citarabina, por ejemplo, se resumen en daños

a nivel de ADN, lo que genera una respuesta en la célula que activa ATM y ATR y, finalmente, promueve la activación de p53, la parada del ciclo celular y la entrada en senescencia (Di Micco et al., 2021). Se ha observado que la inhibición farmacológica de ATR impide la entrada en senescencia y, por lo tanto, sensibiliza las células frente a tratamientos quimioterapéuticos (Duy et al., 2021) **(Figura 56)**. Para poder determinar si este proceso también ocurre cuando tenemos sobreexpresión de PRLR, las células MonoMac-1, HL-60 y SKM-1 no transducidas y transducidas con PRLR wt y PRLR short se trataron 72h con elimusertib, un inhibidor de ATR, y con citarabina a diferentes dosis para determinar si existía sensibilización al tratamiento analizando la viabilidad celular por citometría de flujo. Como era esperable, el tratamiento con elimusertib, el inhibidor de ATR, sensibiliza todas las líneas celulares de LMA estudiadas para citarabina, disminuyendo el valor de la EC50 **(Figura 57A)**. Una vez cuantificado y comparado el valor obtenido de la EC50 de citarabina y con el tratamiento conjunto, se ha observado que el aumento de la sensibilidad es similar en todas las isoformas transducidas con PRLR **(Figura 57B)**. Aun así, el cálculo del *Fold Change* (cambio relativo) en la sensibilidad revela que no todas las líneas celulares se comportan igual. Las líneas celulares MonoMac-1 y SKM-1, notoriamente más resistentes a citarabina en condiciones parentales, no presentan grandes diferencias en cuanto a sensibilización debido a la sobreexpresión de las isoformas de PRLR. En cambio, la línea celular HL-60 transducida con la isoforma PRLR short, pero sobre todo con la isoforma PRLR wt, presenta un aumento en la sensibilidad a citarabina mayor al tratar conjuntamente con el inhibidor de ATR **(Figura 57C)**. En resumen, se ha corroborado el efecto quimiosensibilizador del inhibidor de ATR, pero, más interesante, se ha demostrado que la vía de señalización del PRLR juega un papel importante en la senescencia relacionada con la quimiorresistencia. En este punto, encontramos una relación directa con la señalización PRLR/Jak2/Stat, ATR y la quimiorresistencia derivada de la senescencia, ya que la señalización vía Jak2/Stat incrementa el SASP (fenotipo secretor asociado a senescencia), permitiendo el mantenimiento del estado senescente de las células e incrementando su resistencia a quimioterapia (Toso et al., 2014). Paralelamente, la inhibición de ATR tiene efectos más notorios cuando tenemos sobreexpresión de PRLR, sobre todo la isoforma salvaje.

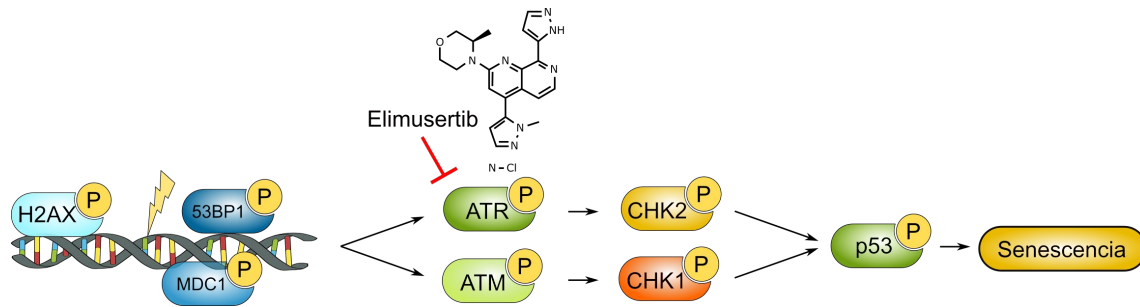


Figura 56. Modelo de señalización de entrada en la senescencia por el estímulo de daño en el ADN, así como la diana de elimusertib, un inhibidor de ATR. Las flechas negras indican progresión de la señalización y las rojas inhibición; las P indican fosforilación y activación de proteína.

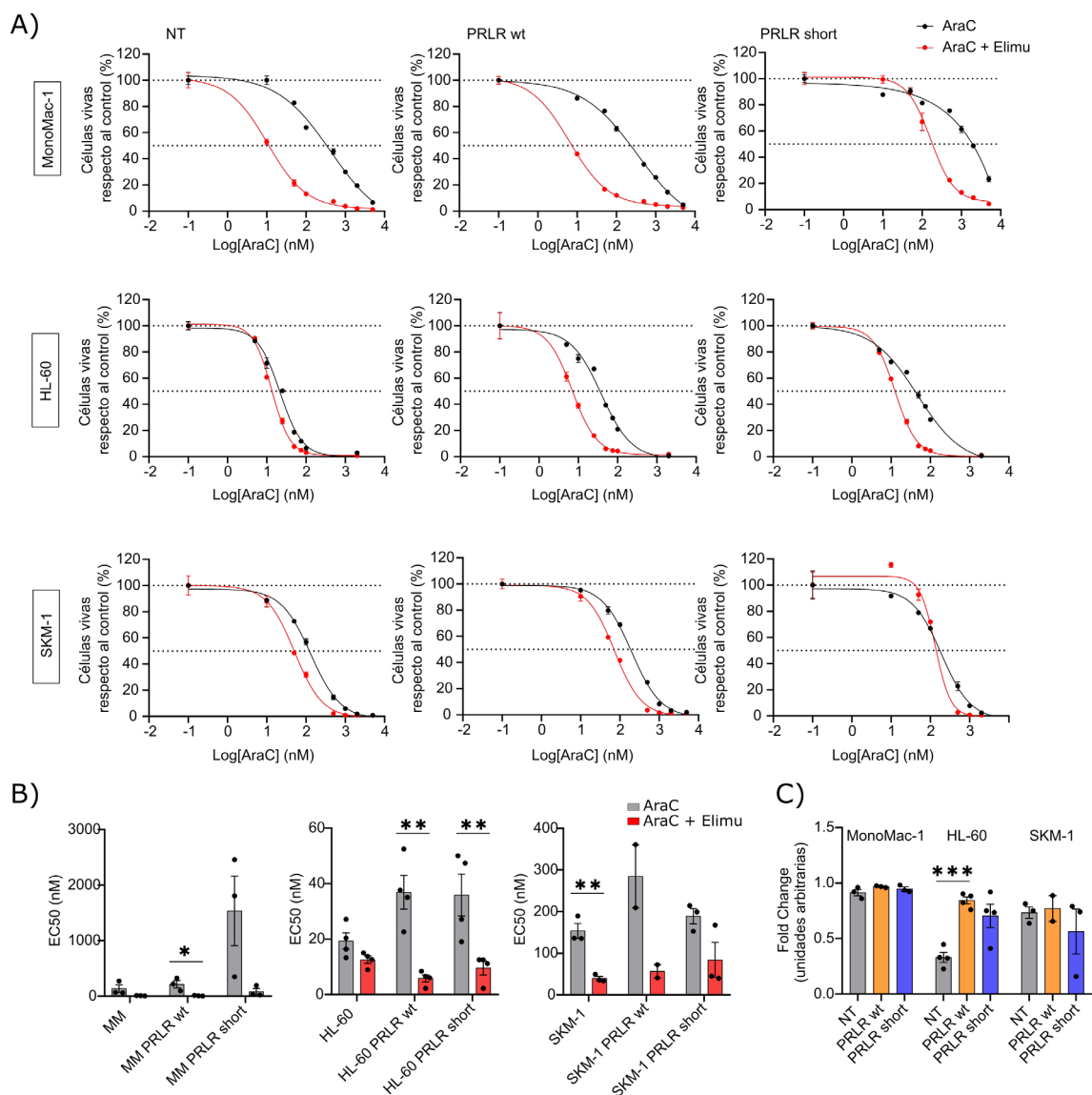


Figura 57. El inhibidor de ATR (elimusertib) sensibiliza las células a citarabina, sobre todo a las células transducidas con PRLR. Las células MonoMac-1 (MM), HL-60 y SKM-1 no transducidas (NT) y transducidas con PRLR wt y PRLR short se trataron 72h con elimusertib y con un vehículo o dosis crecientes de citarabina para determinar la viabilidad por citometría de flujo y calcular el valor de la EC50. Los resultados se presentan como **A)** una réplica representativa de las EC50 en las distintas líneas, donde cada punto representa la media de triplicados de un experimento independiente \pm SEM (n=3) y **B)** los valores numéricos de las EC50 calculadas \pm SEM (n=4). **C)** *Fold Change* relativo (1-(EC50 AraC/EC50 cotratamiento) para representar el incremento en la sensibilidad. Cada barra indica la media del *fold change* de tres experimentos independientes \pm SEM; cada punto indica el valor de un experimento. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

4.4. Papel de la PRL y PRLR en la diferenciación

Los blastos leucémicos están caracterizados, entre otras muchas propiedades, por tener un bloqueo en la diferenciación que les aporta ventajas frente a los tratamientos citotóxicos convencionales y de proliferación, ya que la tasa proliferativa de las células inmaduras es mayor que en las células diferenciadas terminalmente (Dick & Bonnet, 1997; Estey & Döhner, 2006; D. Thomas & Majeti, 2017). Por otro lado, en el cribado *in silico* inicial, se ha observado que la PRL y sus vías de señalización a través del PRLR están relacionadas con los procesos de diferenciación mieloide.

4.4.1. Papel de la PRL y su antagonista en la diferenciación

Para estudiar el papel de la vía de señalización del PRLR respecto la diferenciación celular, se han utilizado células MonoMac-1, HL-60 y SKM-1 no transducidas y transducidas con PRLR wt y PRLR short y se han tratado 72h con agentes diferenciadores (ácido holotransretinoico, ATRA, y vitamina D3) junto con PRL o G129R y se ha determinado la diferenciación mieloide por citometría de flujo analizando la expresión en superficie de los antígenos CD11b y CD14, asociados a la diferenciación granulocítica y monocítica, respectivamente. El análisis del marcador en superficie CD11b ha revelado que la PRL por sí sola es capaz de inducir un aumento de su expresión, aunque sólo observable en la línea celular SKM-1. Además, las células leucémicas transducidas con la isoforma PRLR wt y tratadas con PRL y ATRA o vitamina D3 presentan un aumento en la diferenciación granulocítica respecto al tratamiento con el agente diferenciador únicamente, resultados no observados en las células transducidas con la isoforma dominante negativa (**Figura 58A**). El tratamiento con el antagonista del PRLR no tiene ningún efecto por sí solo ni en combinación con los agentes diferenciadores en ninguna de las líneas celulares estudiadas (**Figura 58B**). Es decir, la estimulación de la vía de PRLR incrementa la predisposición de las células leucémicas a diferenciarse a linajes granulocíticos bajo tratamiento con ATRA y vitamina D3 y, en el caso concreto de las células SKM-1, la sobreexpresión de PRLR y su estimulación con el ligando es suficiente para diferenciarse, sin necesidad de agentes diferenciadores.

A diferencia de los resultados observados respecto a la expresión en superficie de CD11b, el marcador CD14 no muestra cambios tan notorios. Cabe destacar que la

diferenciación hacia linajes monocíticos (CD14) está fomentada por la vitamina D3 de manera específica, mientras que ATRA no tendría un efecto tan elevado. Se ha observado que el tratamiento conjunto de PRL y ATRA no promueve la diferenciación mediada por CD14, como era esperable, mientras que la vitamina D3 incrementa la expresión de CD14 en todas las líneas, aunque independientemente de la expresión de PRLR o del tratamiento conjunto con PRL. Aun así, la sobreexpresión de la isoforma PRLR salvaje muestra una cierta tendencia al incremento de la diferenciación monocítica (**Figura 59A**). Por otro lado, el antagonista del receptor no ejerce ningún efecto sobre la diferenciación mediada por CD14 sólo o en combinación con agentes diferenciadores (**Figura 59B**).

Estos resultados indican que la sobreexpresión de PRLR y el estímulo de su vía de señalización predisponen las células a diferenciación granulocítica, mientras que la inhibición farmacológica del receptor no tiene ningún efecto. Finalmente, es importante mencionar que, en algunos casos, el efecto diferenciador de la vitamina D3 consigue diferenciar aproximadamente el 100% de las células, de manera que observar sinergia con el ligando de PRLR es prácticamente imposible.

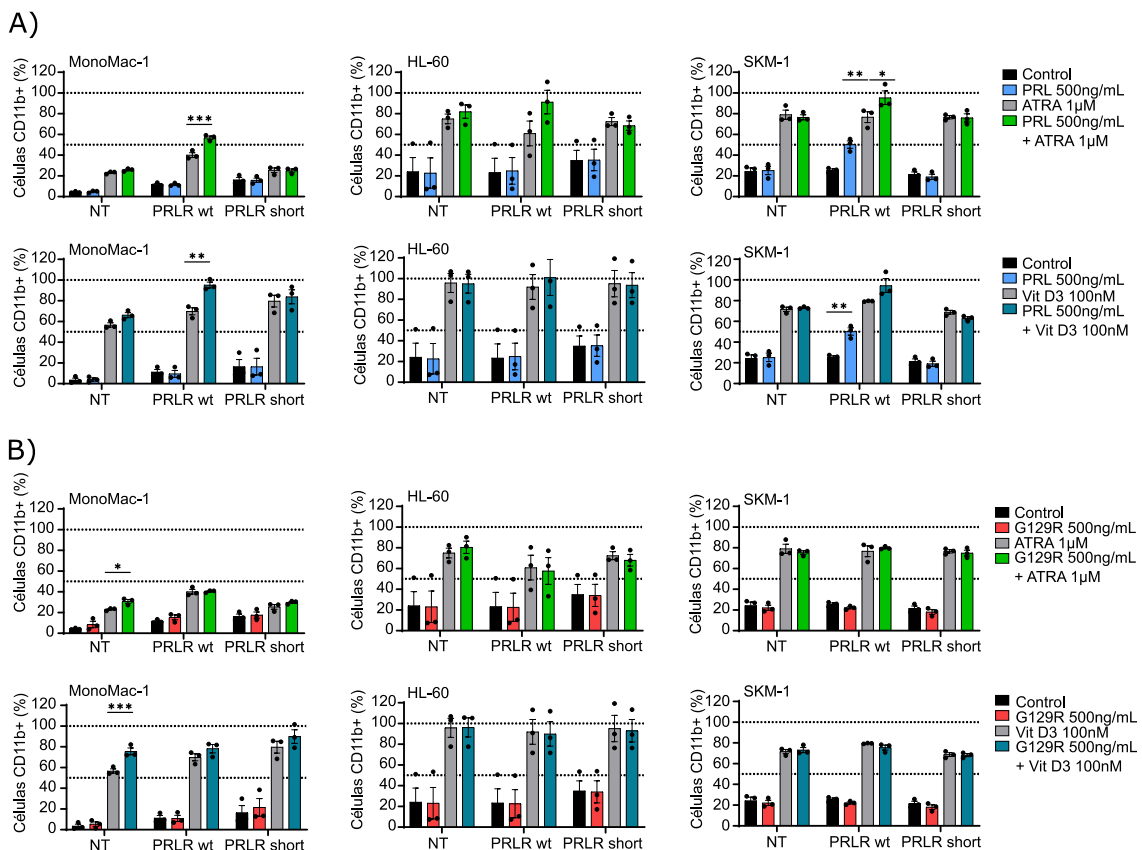


Figura 58. La PRL incrementa la diferenciación granulocítica (CD11b) en las células SKM-1 transducidas con PRLR wt, de igual manera que lo incrementa el cotratamiento con PRL y agentes diferenciadores en todas las líneas celulares estudiadas. Las células MonoMac-1 (MM), HL-60 y SKM-1 no transducidas (NT) y transducidas con PRLR wt y PRLR short se trataron 72h con ácido holotransretinoico (ATRA) 1 μ M o vitamina D3 100nM junto con **A)** un vehículo o PRL 500ng/mL o **B)** un vehículo o G129R 500ng/mL. La expresión de CD11b se analizó por citometría de flujo. Las barras representan la media de triplicados de tres experimentos independientes \pm SEM del porcentaje de células PRLR positivas, donde cada punto representa la media de cada experimento. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

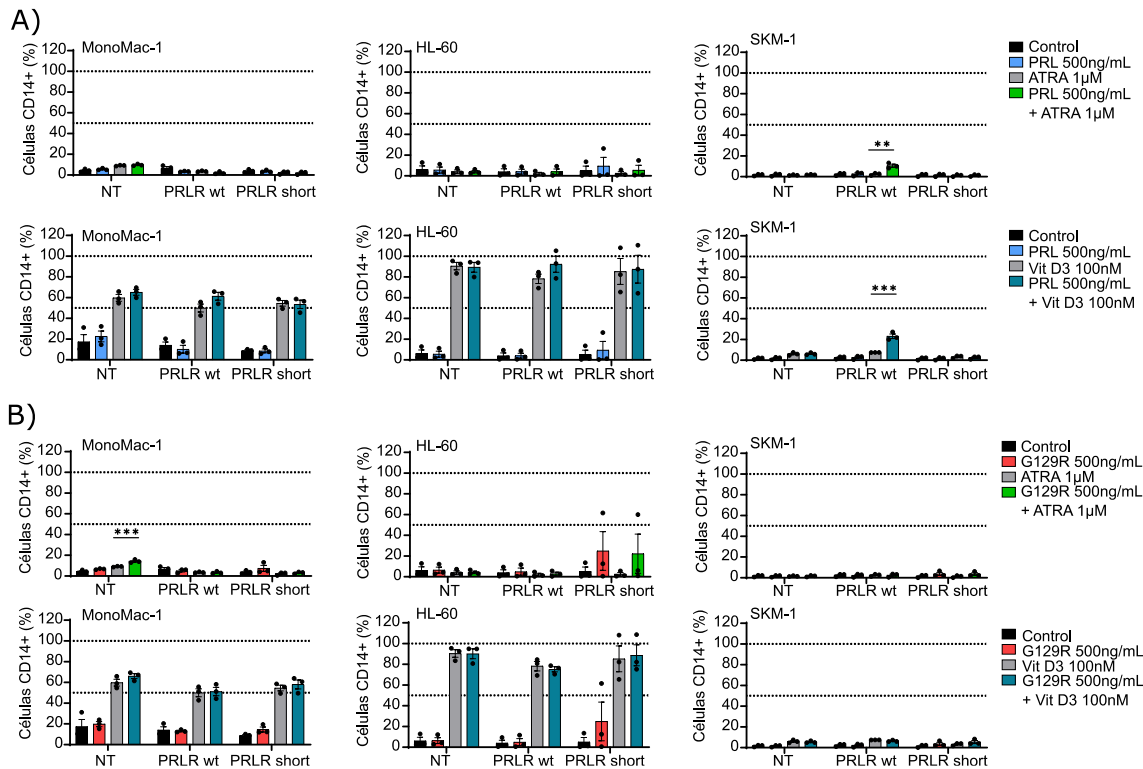


Figura 59. El cotratamiento de PRL y agentes diferenciadores no genera grandes cambios en la diferenciación monocítica (CD14). Las células MonoMac-1 (MM), HL-60 y SKM-1 no transducidas (NT) y transducidas con PRLR wt y PRLR short se trataron 72h con ATRA 1 μ M o vitamina D3 100nM junto con **A)** un vehículo o PRL 500ng/mL o **B)** un vehículo o G129R 500ng/mL. La expresión de CD14 se analizó por citometría de flujo. Las barras representan la media de triplicados de tres experimentos independientes \pm SEM del porcentaje de células positivas para el PRLR, donde cada punto representa la media de cada experimento. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Dado que parece que hay cierta interacción entre agentes diferenciadores y la PRL, se decidió centrar el estudio en la vitamina D3. La vitamina D3 puede ser internalizada sola o una vez unida a su receptor transmembrana VDR y, finalmente, será transportada al núcleo celular, donde se unirá a RXR α y activará la transcripción de genes que fomentarán la producción de CD14 y su expresión en membrana, produciendo diferenciación mieloide monocítica (Gocek et al., 2012) (Figura 60).

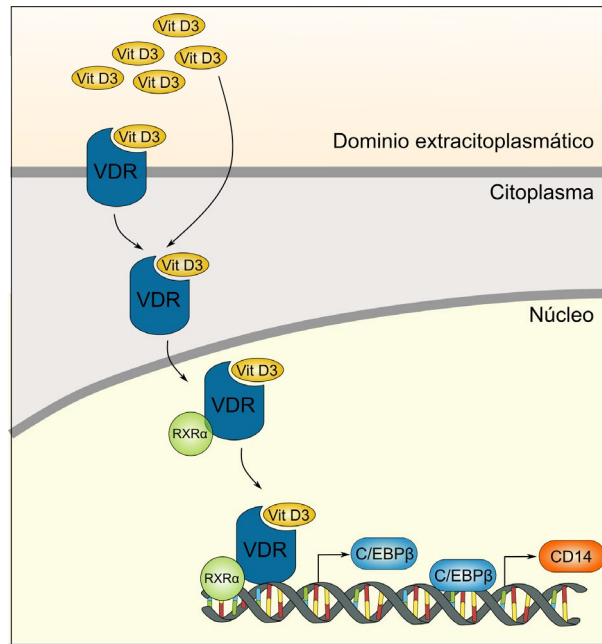


Figura 60. Acciones de la vitamina D3 en las células relacionadas con la diferenciación. Vit D3, vitamina D3; VDR, receptor de vitamina D3.

Las células MonoMac-1 y SKM-1 no transducidas y transducidas con PRLR wt y PRLR short se trataron 2h con un vehículo y PRL, junto con vitamina D3, y se extrajo la fracción de proteína nuclear para detectar VDR y RXR α con anticuerpos específicos, así como Lámina B1 como control de carga. La línea celular MonoMac-1 no transducida y transducida con las diferentes isoformas del PRLR presentan una translocación de VDR al núcleo celular en presencia de vitamina D3. Aun así, se observan diferencias entre las distintas transducciones. En las células transducidas con la isoforma salvaje del receptor no se ven afectados los niveles de VDR al tratar con el ligando del PRLR, pero el tratamiento conjunto de vitamina D3 y PRL incrementan la expresión nuclear de VDR en mayor medida que el agente diferenciador por sí solo. En cambio, la isoforma dominante negativa, sólo ve modificados los niveles de VDR cuando existe cotratamiento de los dos compuestos. Por otro lado, los niveles de RXR α no se ven modificados en las células MonoMac-1 parentales o transducidas con la isoforma PRLR short, sólo se observa un incremento cuando tratamos conjuntamente con PRL y vitamina D3 respecto a los tratamientos unitarios (**Figura 61A y B, izquierda**). En resumen, se ha validado la internalización de VDR al núcleo mediada por el estímulo promovido por la vitamina D3 y se ha observado que la PRL tiene acciones similares, sólo en contextos donde el PRLR está sobreexpresado, siempre que sea en presencia de vitamina D3.

Las células SKM-1 no transducidas y transducidas con las isoformas del PRLR también presentan translocación nuclear de VDR bajo el estímulo de la vitamina D3, validando una vez más los controles. Aunque hemos observado que las células no transducidas y transducidas con PRLR wt se comportan de manera similar, la internalización de VDR al núcleo es mayor en las células que expresan PRLR salvaje, respecto a las células parentales, posiblemente debido a la interacción entre las dos vías observada en las células MonoMac-1. Por último, la isoforma dominante negativa no tiene cambios notorios respecto a los niveles de VDR nucleares en relación con la señalización de PRLR. En lo que respecta al RXR α , no se observan diferencias bajo ninguno de los tratamientos (**Figura 61A y B, derecha**). Aunque en la línea celular SKM-1 los resultados difieren ligeramente de los comentados respecto a las células MonoMac-1, sí que se observa una mayor translocación nuclear de VDR bajo el mismo tratamiento, pero con la sobreexpresión de PRLR, respecto a las células parentales. Todos estos datos validan la internalización nuclear de VDR bajo el tratamiento con vitamina D3 y la interacción entre la vía de señalización del PRLR y la vitamina D3, ya que bajo tratamiento conjunto o con sobreexpresión de PRLR, se observa una mayor movilización de VDR al núcleo.

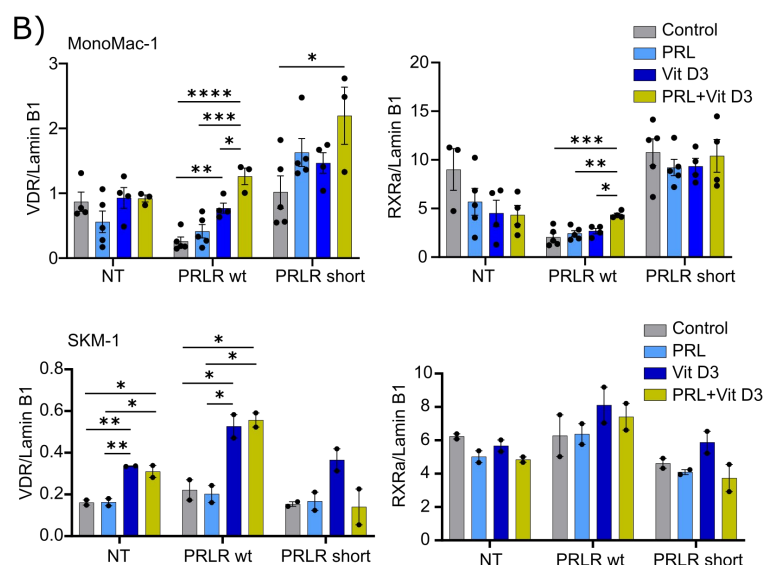
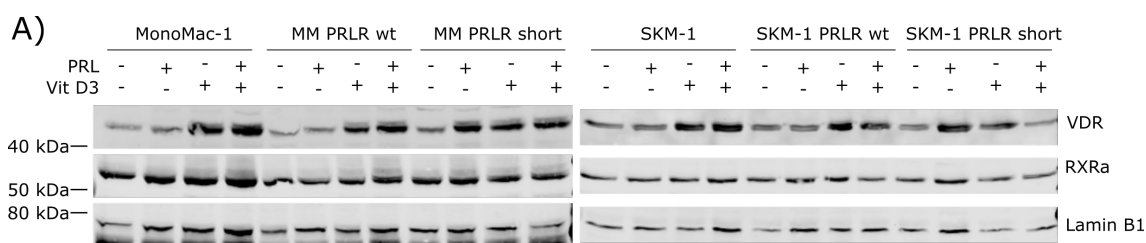


Figura 61. La PRL junto con la vitamina D3 estimulan la translocación nuclear de VDR. Las células MonoMac-1 (MM, n=4) y SKM-1 (n=2) no transducidas y transducidas con PRLR wt y PRLR short se trataron 2h con un vehículo, PRL 500ng/mL y/o vitamina D3 100nM. Se extrajo la fracción de proteína nuclear y se realizó un western blot donde se hibridó con anticuerpos específicos de RXR α y VDR, así como Lamin B1 como control de carga. Los resultados se representan como **A)** una imagen representativa de la proteína analizada y **B)** la representación graficada de la cuantificación de la proteína en relación con el control de carga. Cada barra indica la media del valor de la cuantificación de las bandas de los experimentos \pm SEM y cada punto el valor de un experimento. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

4.4.2. Papel de los inhibidores de PRLR:PRL en la diferenciación

Como se ha observado que el estímulo del receptor con su ligando junto con tratamientos con agentes diferenciadores incrementa la diferenciación mieloide, se decidió estudiar qué efectos tendría el bloqueo de la vía de señalización y qué ruta de señalización está implicada.

Las células MonoMac-1, HL-60 y SKM-1 no transducidas y transducidas con PRLR wt y PRLR short se trataron 72h con agentes diferenciadores (ATRA y vitamina D3) junto con PD184352 (inhibidor de MEK-Erk), Ly294-002 (inhibidor de PI3K-Akt), ruxolitinib (inhibidor de Jak2) y un inhibidor de Stat3 y de Stat5. La diferenciación de las células se determinó mediante el análisis de CD11b (diferenciación granulocítica) y CD14 (diferenciación macromonocítica) por citometría de flujo, como se realizó anteriormente.

Se ha observado que el tratamiento con ATRA diferencia las líneas celulares estudiadas hacia linajes granulocíticos determinados por la expresión del marcador de superficie CD11b, como era esperable (Castaigne et al., 1990), mientras que no se observa diferenciación monocítica (CD14). La presencia del inhibidor de MEK-Erk no afecta al estado de diferenciación basal ni a la diferenciación inducida por ATRA (**Figura 62A**). Por otro lado, el tratamiento con vitamina D3 diferencia las tres líneas celulares a granulocitos (CD11b) y a monocitos (CD14). En este caso, tampoco se observan diferencias en la inducción de la diferenciación en presencia del inhibidor de MEK-Erk sin tratar con el agente diferenciador, ni en condiciones de cotratamiento (**Figura 62B**). Por tanto, estos resultados sugieren que la señalización por MEK-Erk no está influenciando la diferenciación mieloide.

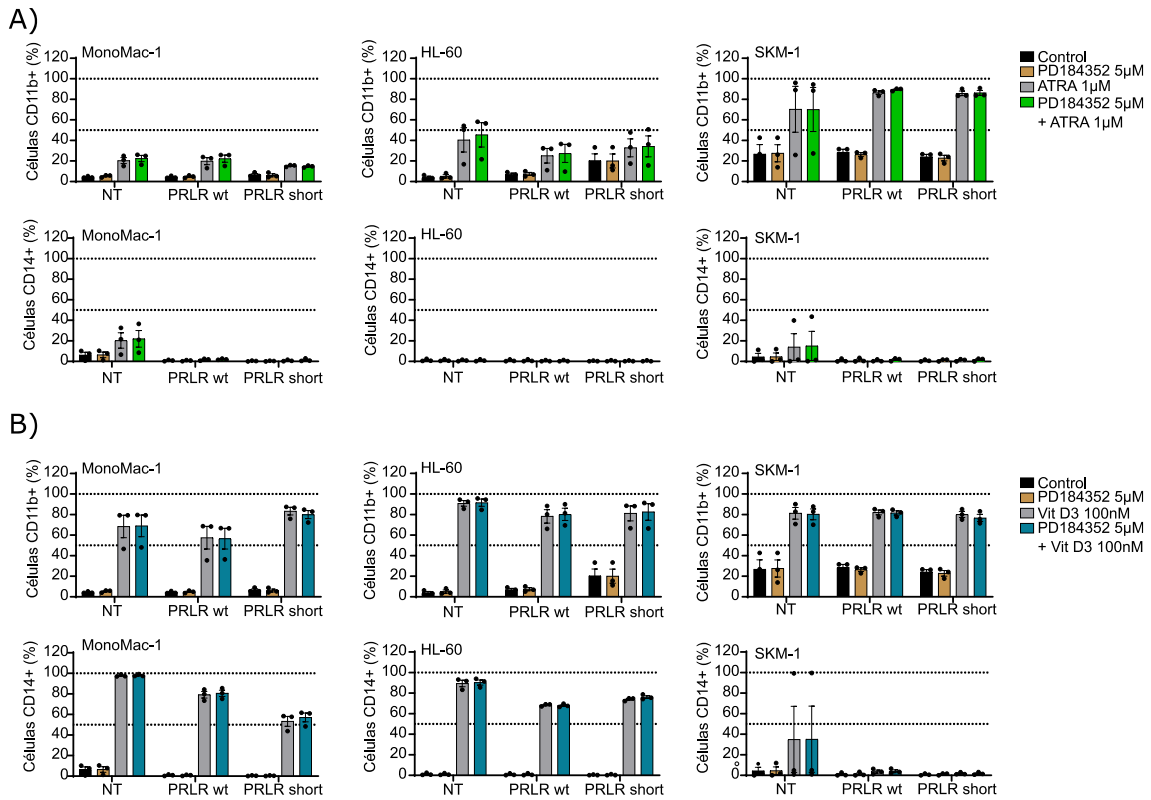


Figura 62. La señalización mediada por MEK-Erk no tiene ninguna influencia en la diferenciación mieloide. Las células MonoMac-1 (MM), HL-60 y SKM-1 no transducidas (NT) y transducidas con PRLR wt y PRLR short se trataron 72h con **A)** ATRA 1µM o **B)** vitamina D3 100nM junto con un vehículo o PD184352 5µM y se analizó la expresión de CD11b y CD14 por citometría de flujo. Las barras representan la media de triplicados del porcentaje de células CD11b⁺ o CD14⁺ de tres experimentos independientes ± SEM. Los puntos indican la media de triplicados de cada experimento.

Además de la señalización de MEK-Erk, también se bloqueó la de PI3K-Akt con el inhibidor Ly294-002 y al analizar los marcadores de superficie CD11b (diferenciación granulocítica) y CD14 (diferenciación monocítica) se observaron resultados interesantes. Una vez más, se ha observado que el tratamiento con ATRA incrementa la diferenciación granulocítica mediada por CD11b (Castaigne et al., 1990), mientras que la vitamina D3 estimula la diferenciación tanto granulocítica como monocítica. Se ha observado que la inhibición de PI3K-Akt disminuye la expresión en superficie de CD11b, independientemente de la expresión de PRLR, aunque sólo observable en las células SKM-1 y posiblemente debido a la baja diferenciación granulocítica basal de las células MonoMac-1 y HL-60, que imposibilitan ver los cambios. Por otro lado, y como es esperable, no se observa inducción de diferenciación monocítica (CD14) mediada por ATRA, ni cambios al tratar con el inhibidor de PI3K-Akt (**Figura 63A**). Por otro lado, el tratamiento con vitamina D3 fomenta la diferenciación tanto

granulocítica como monocítica, como se ha comentado anteriormente. Una vez más, observamos que el inhibidor de PI3K-Akt disminuye la diferenciación mediada por CD11b y, además, se observa que es capaz de disminuir la diferenciación tanto monocítica como granulocítica inducida por el tratamiento con vitamina D3. Aun así, sólo se observa en SKM-1 y HL-60, posiblemente debido al bajo nivel basal de diferenciación del resto de líneas celulares. Una vez más, la expresión del PRLR no tiene ningún rol en estos mecanismos (**Figura 63B**). Estos resultados ponen en evidencia una implicación de la vía PI3K-Akt en la diferenciación tanto granulocítica como monocítica, ya que la inhibición de la vía bloquea la diferenciación celular.

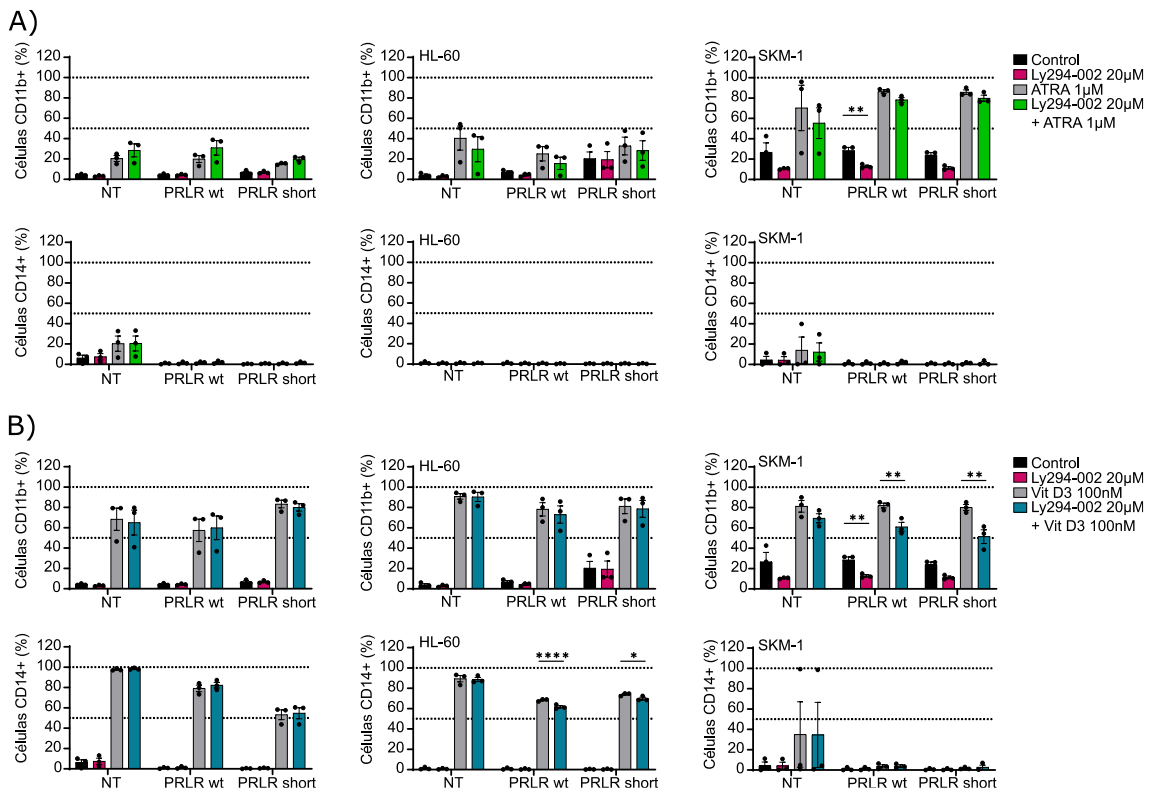


Figura 63. La vía de señalización de PI3K-Akt tiene un rol importante en los procesos de diferenciación granulocítica y monocítica. Las células MonoMac-1 (MM), HL-60 y SKM-1 no transducidas (NT) y transducidas con PRLR wt y PRLR short se trataron 72h con **A)** ATRA 1µM o **B)** vitamina D3 100nM junto con un vehículo o Ly294-002 20µM y se analizó la expresión de CD11b y CD14 por citometría de flujo. Las barras representan la media de triplicados del porcentaje de células CD11b⁺ o CD14⁺ de tres experimentos independientes ± SEM. Los puntos indican la media de triplicados de cada experimento. **p<0,01.

Dado que las vías más estudiadas en relación con el PRLR son las de Jak2/Stat3 y Jak2/Stat5 y, además, se ha visto cierta implicación de ellas en la leucemia, primero de todo el estudio se dirigió a Jak2, encargado de reclutar las dos moléculas para

continuar con la transducción de señal (Abramicheva & Smirnova, 2019). Se utilizó ruxolitinib como inhibidor de Jak2 y, una vez más, se observó la capacidad de ATRA para diferenciar las líneas celulares a linajes granulocíticos (CD11b), pero no monocíticos (CD14), mientras que la vitamina D3 fomenta los dos tipos de diferenciación celular. Aun así, se ha observado que la diferenciación mediada por ATRA no se ve afectada por la inhibición de ruxolitinib para ninguno de los dos linajes (**Figura 64A**). De igual manera, la diferenciación a linajes granulocíticos y monocíticos mediada por vitamina D3 tampoco se ve afectada por la inhibición de Jak2 (**Figura 64B**). En resumen, estos resultados sugieren que las acciones de Jak2 no tienen ningún papel en la diferenciación mieloide.

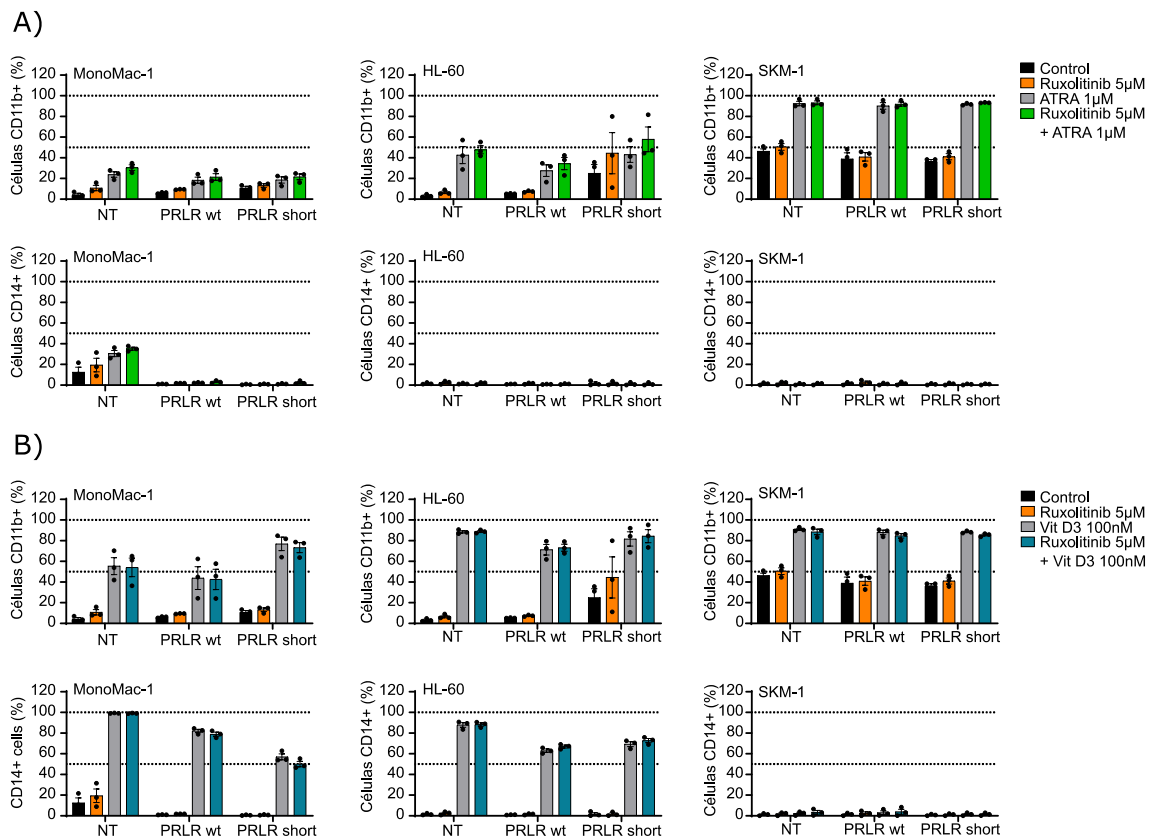


Figura 64. La inhibición de Jak2 no tiene ningún papel en la diferenciación mieloide. Las células MonoMac-1 (MM), HL-60 y SKM-1 no transducidas (NT) y transducidas con PRLR wt y PRLR short se trataron 72h con **A)** ATRA 1 μ M o **B)** vitamina D3 100nM junto con un vehículo o ruxolitinib 5 μ M y se analizó la expresión en superficie de CD11b y CD14 por citometría de flujo. Las barras representan la media de triplicados del porcentaje de células CD11b⁺ o CD14⁺ de tres experimentos independientes \pm SEM. Los puntos indican la media de triplicados de cada experimento.

Para seguir analizando el papel de la vía de PRLR en la diferenciación, se trabajó con el inhibidor de Stat3. Una vez más, se observó la capacidad de ATRA de inducir diferenciación granulocítica (CD11b) y la capacidad de vitamina D3 para inducir diferenciación tanto granulocítica (CD11b) como monocítica (CD14). Es importante destacar que la inhibición de Stat3 por sí sola induce diferenciación mieloide, tanto granulocítica como monocítica. Además, el tratamiento conjunto con ATRA denota una tendencia a incrementar los dos tipos de diferenciación (CD11b y CD14) en mayor medida que los tratamientos únicos (**Figura 65A**). En lo que respecta al tratamiento con vitamina D3, además de la diferenciación promovida por la inhibición de Stat3 hacia linajes granulocíticos y monocíticos, también observamos una tendencia al aumento de esta diferenciación al tratar conjuntamente con los dos compuestos hacia los dos linajes (**Figura 65B**). Estos resultados nos sugieren una clara implicación de la señalización de Stat3 en los procesos de bloqueo en la diferenciación, aunque independiente de la expresión de PRLR, ya que se observa en todas las isoformas de PRLR transducidas de igual manera. Además, el tratamiento conjunto con el inhibidor de Stat3 y agentes diferenciadores incrementa la diferenciación mediada por los marcadores CD11b y CD14 respecto a los tratamientos con únicamente un compuesto.

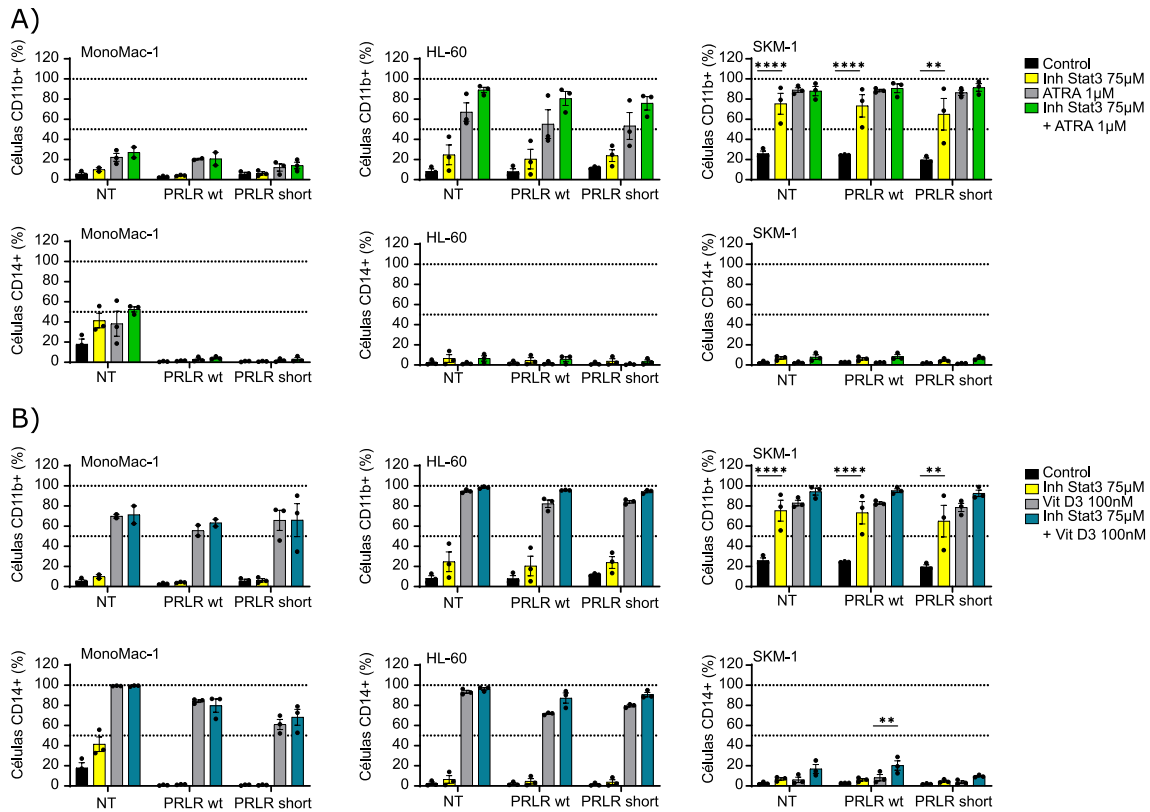


Figura 65. La señalización mediada por Stat3 promueve el bloqueo de la diferenciación, pero puede ser revertida con el uso de inhibidores y con el tratamiento conjunto de ellos con agentes diferenciadores. Las células MonoMac-1 (MM), HL-60 y SKM-1 no transducidas (NT) y transducidas con PRLR wt y PRLR short se trataron 72h con **A)** ATRA 1 μM o **B)** vitamina D3 100nM junto con un vehículo o el inhibidor de Stat3 75 μM y se analizó la expresión en superficie de CD11b y CD14 por citometría de flujo. Las barras representan la media de triplicados del porcentaje de células CD11b⁺ o CD14⁺ de tres experimentos independientes ± SEM. Los puntos indican la media de triplicados de cada experimento. **p<0,01; ****p<0,0001.

Por último, se analizó el papel de la inhibición de Stat5 en el proceso de diferenciación. Nuevamente, se observó que la acción de ATRA promueve la diferenciación granulocítica (CD11b), mientras que el tratamiento con vitamina D3 promueve tanto la diferenciación granulocítica (CD11b) como la monocítica (CD14). A grandes rasgos, se observa que la inhibición de Stat5 por sí sola genera cambios muy sutiles a nivel de diferenciación. Por un lado, disminuye la diferenciación mediada por la expresión de CD11b y aumenta la de CD14, sólo observable en líneas con una mayor diferenciación y siempre de manera muy residual. El tratamiento con ATRA en conjunto con el inhibidor de Stat5 no tiene ningún efecto diferenciador en comparación con el inducido por el agente diferenciador por sí solo respecto a la expresión de CD11b en superficie. En cambio, la diferenciación monocítica sí que

presenta un aumento al tratar con los dos compuestos (**Figura 66A**). Por otro lado, el tratamiento con vitamina D3 junto con el inhibidor de Stat5 disminuye muy ligeramente la diferenciación granulocítica, sin afectar la diferenciación monocítica (**Figura 66B**). En resumen, aunque los efectos de la inhibición de Stat5 son muy sutiles y sólo marcan tendencias, dado que es la vía de señalización canónica del PRLR, se les ha prestado cierto interés. Por un lado, la inhibición de Stat5 por sí sola disminuye la diferenciación granulocítica, igual que sucede al tratar conjuntamente con la vitamina D3. En cambio, la inhibición de Stat5 incrementa ligeramente la diferenciación monocítica, de la misma forma que sucede con el tratamiento conjunto con ATRA.

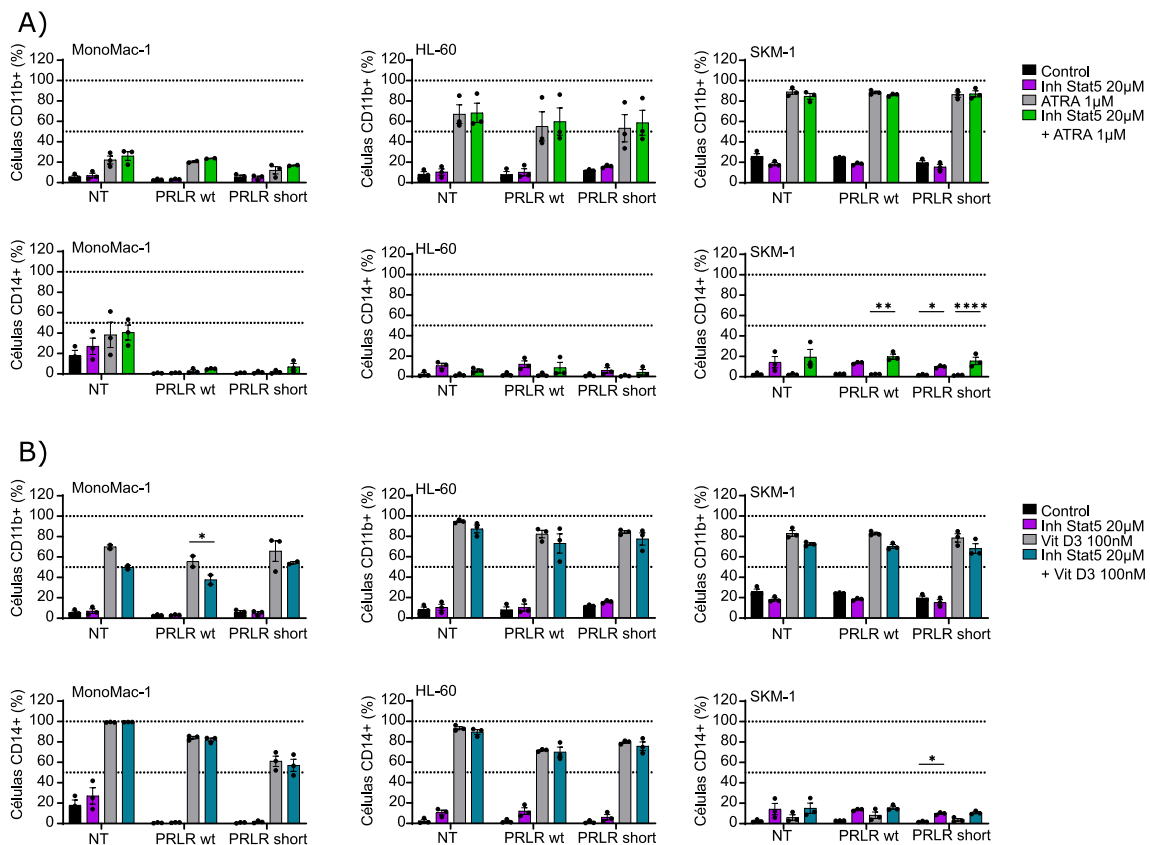


Figura 66. La inhibición de Stat5 disminuye la diferenciación granulocítica e incrementa ligeramente la monocítica. Las células MonoMac-1 (MM), HL-60 y SKM-1 no transducidas (NT) y transducidas con PRLR wt y PRLR short se trataron 72h con **A)** ATRA 1µM o **B)** vitamina D3 100nM junto con un vehículo o el inhibidor de Stat5 20µM y se analizó la expresión en superficie de CD11b y CD14 por citometría de flujo. Las barras representan la media de triplicados del porcentaje de células CD11b⁺ o CD14⁺ de tres experimentos independientes ± SEM. Los puntos indican la media de triplicados de cada experimento. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,0001.

El estudio del papel de la vía de señalización del PRLR mediante inhibidores de elementos efectores de la vía nos ha revelado diversos datos. Por un lado, la señalización de MEK-Erk y Jak2 no tienen ningún papel en el proceso de diferenciación mieloide, mientras que PI3K-Akt y Stat3/5 sí que juegan un rol importante. Las acciones de PI3K-Akt fomentan tanto la diferenciación granulocítica como monocítica, mientras que la señalización por Stat5 promueve únicamente la diferenciación granulocítica y bloquea la diferenciación hacia linajes monocíticos. Por último, las señales producidas por la activación de Stat3 inhiben mayormente la diferenciación hacia granulocitos y, en menor medida, a monocitos. Paralelamente a estos resultados, se ha observado que la línea celular MonoMac-1 se diferencia a linajes monocíticos, posiblemente debido a su fenotipo, pero cuando se transduce con las distintas isoformas del PRLR, las células pierden la capacidad de diferenciarse **(Figura 62A, Figura 63A, Figura 64A, Figura 65A, Figura 66A)**. También se ha observado que la capacidad de la vitamina D3 de diferenciar hacia linajes monocíticos se ve disminuida cuando las células sobreexpresan la isoforma salvaje de PRLR, estando más disminuida aun cuando se sobreexpresa la isoforma short o dominante negativa. Por último, las células SKM-1 son totalmente refractarias a la diferenciación monocítica promovida por vitamina D3 **(Figura 62B, Figura 63B, Figura 64B, Figura 65B, Figura 66B)**. Aunque son resultados aislados, observamos como en algunos casos, la sobreexpresión de PRLR confiere refractariedad parcial a la diferenciación monocítica debida a tratamiento con vitamina D3.

4.5. Efecto de la pérdida de función de PRLR en las células de LMA

Inicialmente, la isoforma PRLR short se utilizó como dominante negativa, ya que la estructura más corta del dominio intracitoplasmático genera una capacidad de señalización muy escasa o nula (Hu et al., 2001). Aun así, las células de LMA presentan expresión de PRLR endógena, de manera que tenemos una señalización constante del receptor (Clevenger et al., 1998). Además existe controversia sobre la dominancia negativa asociada a la isoforma PRLR short, ya que podría activar algunas vías de señalización del PRLR por sí solo o en combinación con la isoforma salvaje del receptor, formando un heterodímero (Hu et al., 2001; Sangeeta Devi & Halperin, 2014). Para poder estudiar los efectos que tendría la represión completa de PRLR, se plantearon diferentes estrategias para silenciar el gen y su expresión. Se intentó reprimir la expresión mediante shRNA (del inglés *short hairpin RNA*), ARNs de interferencia que permiten silenciar un gen de interés formando un lazo complementario a su secuencia de ARNm. Se generaron hasta dos construcciones con secuencias de shRNA específicas para silenciar el PRLR y un control, se transdujeron en células MonoMac-1, por ser una de las líneas de LMA con una expresión mayor de receptor en superficie, y se seleccionaron en base a un gen marcador del plásmido de resistencia al antibiótico puromicina. Aunque las células fueron seleccionadas positivamente, el análisis del PRLR en superficie por citometría de flujo y de la cantidad de proteína total por western blot no presentó cambios notorios en la expresión del receptor, por lo que se descartaron las células.

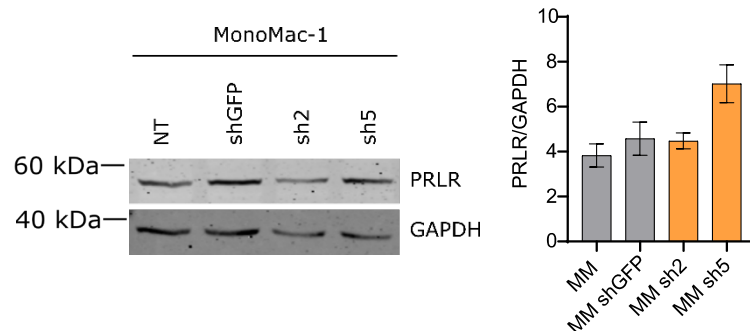


Figura 67. El uso de shRNA para silenciar el gen de PRLR no consiguió disminuir la expresión del receptor. Las células MonoMac-1 (MM) se transdujeron con dos shRNA (sh2 y sh5) y un control (shGFP), se extrajo la proteína total y se realizó un western blot para analizar la cantidad de receptor total. Se hibridó con el anticuerpo específico de PRLR y GAPDH como control de carga. Las bandas se cuantificaron con el software ImageJ. Las barras representan la media de dos experimentos independientes de la cuantificación de la banda en relación con el GAPDH \pm SEM.

Debido al fracaso al intentar silenciar el PRLR con shRNA, se decidió silenciar el receptor mediante la tecnología CRISPR, un sistema que permite la edición genómica con un nivel de silenciamiento más elevado. Se generaron hasta tres guías sgRNA para silenciar el receptor, pero sólo se consiguió introducir eficientemente una de ellas en el vector comercial pLentiGuide-Puro, la cual se transdujo junto con una guía control en células MonoMac-1, SKM-1 y U-937 transducidas previamente con la enzima endonucleasa Cas9. Se realizó una selección en base a un gen marcador del plásmido que confiere resistencia al antibiótico puromicina, pero sólo tres clones de las células U-937 transducidas sobrevivieron al tratamiento. Se analizó la expresión de PRLR en superficie por citometría de flujo, donde se observó una ligera disminución en la expresión en superficie del receptor (**Figura 68A**), y por western blot (**Figura 68B**), viéndose una disminución notable en uno de los clones. Aunque estos resultados no muestran una clara disminución de la proteína total de PRLR en todos los clones seleccionados, sí que se observa una disminución a nivel de superficie, indicando que la cantidad de receptor funcional es inferior respecto a las células parentales y, por lo tanto, el nivel de señalización también.

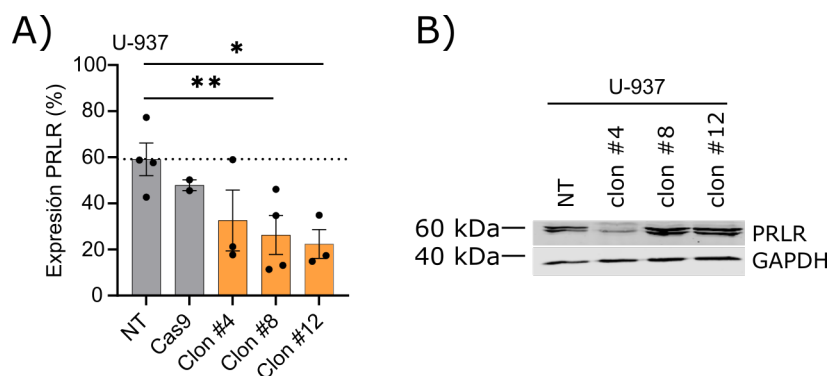


Figura 68. La expresión de PRLR está disminuida en los clones seleccionados. Se analizó la expresión de PRLR en las células U-937 no transducidas y transducidas con Cas9 y los clones #4, #8 y #12 en **A)** superficie por citometría de flujo y **B)** por western blot hibridando con el anticuerpo PRLR y GAPDH como control de carga. Las barras indican la media de triplicados del porcentaje de células que expresan PRLR de 4 experimentos independientes \pm SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

A lo largo de este trabajo se ha demostrado la implicación del PRLR en diferentes aspectos relacionados con la LMA, entre ellos la resistencia a tratamientos quimioterapéuticos, concretamente a citarabina, un tratamiento clave para combatir la LMA. Los resultados obtenidos sugieren que la resistencia a citarabina asociada al incremento de expresión del PRLR puede darse por dos mecanismos. En primer lugar, por la modificación de la expresión génica de elementos relacionados con la vía de activación de la citarabina, que conllevarán una disminución de su efecto citotóxico. En segundo lugar, por una mayor entrada en senescencia que permite a las células permanecer en un estado quiescente hasta que el estímulo citotóxico del fármaco desaparezca, momento en el que reactivarán su ciclo proliferativo (Fajardo-Orduña et al., 2021). Debido a estos resultados, se decidió estudiar qué papel tendría la represión del PRLR sobre el estado senescente de las células. Para ello, células U-937 no transducidas y los clones seleccionados se marcaron para detectar SA- β -Gal y determinar el estado de senescencia. Se observó que la represión del receptor disminuía el nivel de senescencia de las células en relación con la expresión del PRLR (**Figura 69A y B**). La disminución en la expresión de PRLR y, por lo tanto, de su señalización disminuye el estado senescente de las células respecto a las células parentales, sugiriendo que los mecanismos de quimiorresistencia relacionados con el incremento de PRLR se verían disminuidos.

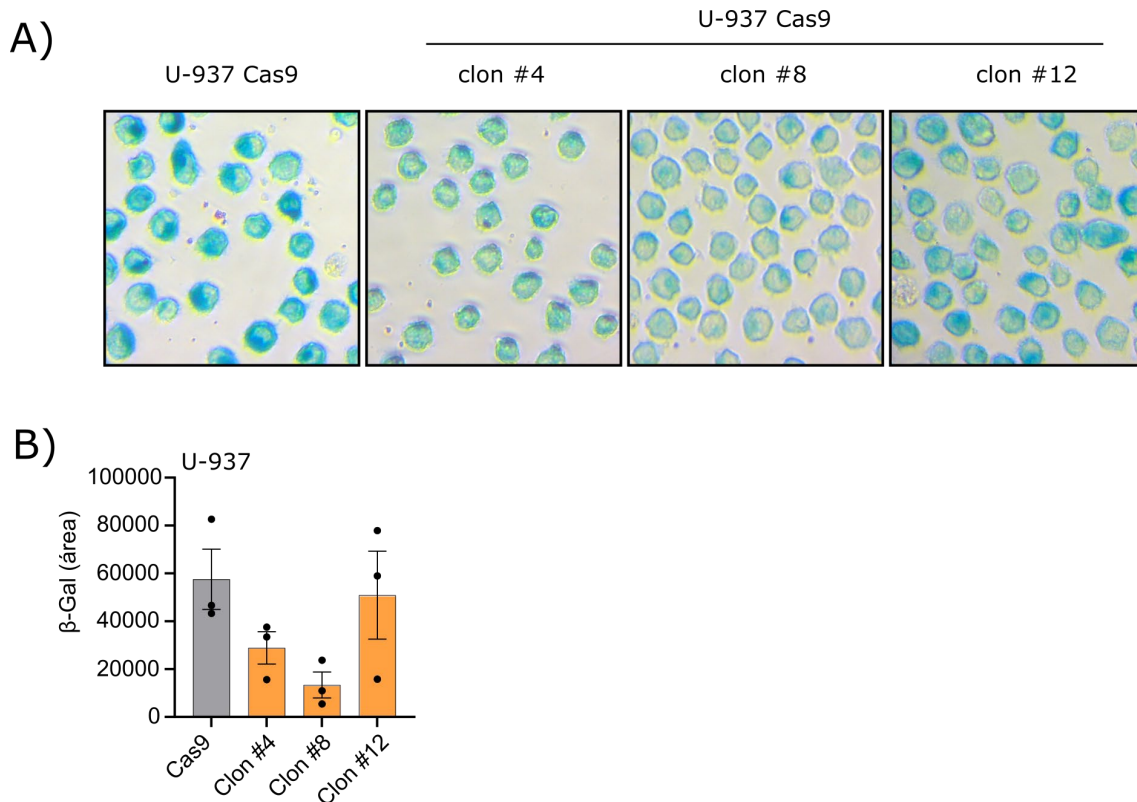


Figura 69. La represión de la expresión de PRLR induce una salida del estado de senescencia en las células. Las células U-937 Cas9 y los clones seleccionados se fijaron y se marcaron para detectar la SA-β-Gal. **A)** Imágenes representativas a 40x aumentos. **B)** Las imágenes se cuantificaron con el software ImageJ y se ha representado el área teñida. Las barras representan la media de tres cuantificaciones de experimentos independientes ± SEM, donde cada punto es la media de un experimento.

Anteriormente, se ha observado que la dominancia negativa por parte de la PRL (PRL mut) disminuye la clonogenicidad *in vitro* (**Figura 39C**) y, junto con la isoforma dominante negativa del PRLR (PRLR short) disminuyen la capacidad leucemogénica *in vivo* de las células leucémicas (**Figura 40C, Figura 42B**). Además, también se ha observado que la inhibición farmacológica del receptor con un antagonista afecta la viabilidad celular *ex vivo* de muestras primarias de LMA (**Figura 37B**) e *in vivo* en modelos experimentales de ratón (**Figura 38 B y C**). Estos resultados nos han llevado a realizar ensayos de clonogenicidad con células de LMA U-937 Cas9 control y con el PRLR silenciado, ya que es la evidencia más directa de la afectación en los procesos leucémicos y un indicativo de la capacidad de autorrenovación y diferenciación. Células U-937 no transducidas y los clones seleccionados se sembraron en un medio semisólido enriquecido con citoquinas instructivas y, pasados 7 días, se cuantificaron las colonias formadas. Se observó que la represión del receptor disminuía la

clonogenicidad de las células de manera significativa (**Figura 70**). Estos resultados van en concordancia con la menor capacidad proliferativa y leucemogénica de las células asociada a una menor expresión y señalización del PRLR, así como su inhibición, demostrando el rol del receptor en la LMA.

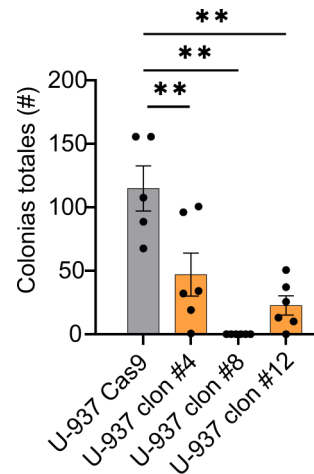


Figura 70. La represión de la expresión de PRLR genera una disminución en la capacidad clonogénica de las células. Las células U-937 Cas9 y los clones seleccionados se sembraron en un medio semisólido enriquecido con citoquinas instructivas y se dejaron crecer durante 7 días, momento en que se contaron las colonias formadas. Las barras representan la media de duplicados de 5 experimentos independientes, donde cada punto representa la media de cada experimento \pm SEM.

5. Discusión

A lo largo de esta tesis se ha descrito la implicación del PRLR en la LMA. No sólo se ha observado un incremento de la expresión del receptor en células transformadas, sino que los efectos de la vía de señalización activada por su ligando natural, la PRL, incrementan la malignidad de la neoplasia, ya que se relacionan directamente con procesos de proliferación, autorrenovación y quimiorresistencia. Paralelamente, se ha observado que el PRLR es una diana terapéutica idónea para combatir la LMA, ya que su inhibición presenta una ventana terapéutica y su expresión puede ser utilizada como biomarcador clínico, englobando el diagnóstico y el seguimiento de la enfermedad.

Implicación de la PRL en la LMA

La prolactina fue descrita el 1933 y se identificó como una hormona con efecto endocrino, con una mayor funcionalidad en el tejido mamario, e implicada principalmente en el proceso de la lactancia (Riddle et al., 1933). Los efectos de la PRL sobre el tejido mamario y su implicación en la producción de la leche materna hacen que sus acciones principales residan en el estímulo de la proliferación y en la diferenciación de las células lactotropas del tejido mamario (Bern & Nicoll, 1968). Los efectos proliferativos llevados a cabo por la PRL suscitaron interés en su papel en la carcinogénesis y se demostró que tenía una participación crucial en el inicio y mantenimiento de los tumores mamarios (Welsch & Nagasawa, 1976). Aun así, dada la actividad endocrina asociada a las hormonas, también se abarcó el cáncer de ovario y próstata, observándose una implicación similar y demostrando su importancia no sólo en tumores femeninos, sino también en masculinos, donde la PRL tiene un papel minoritario a nivel fisiológico (Levina et al., 2009; Sackmann-Sala et al., 2014). En concordancia con la implicación de la PRL en tumores de mama y próstata, la presencia de PRL *in vivo* en modelos de ratón de xenotrasplante de células de LMA fomenta la proliferación celular de los tumores, con diferencias notables entre hembras y machos, posiblemente debido a la saturación de los PRLR en las primeras (Patil et al., 2013; Utama et al., 2009). La elevada concentración de PRL circulante en hembras impide efectos notorios de la PRL exógena, mientras que, en machos, los PRLR siguen disponibles y la presencia de PRL exógena permite una activación de éstos, fomentando las señales mitogénicas y la migración de las células. Estos efectos

también se han observado en los casos de prolactinomas, donde las diferencias de incidencia entre mujeres y hombres están ampliamente descritas, pero la correlación entre la PRL circulante y el tamaño de los tumores es más significativa en hombres (Nishioka et al., 2002). Además, estos efectos proliferativos se han observado también cuando las células de LMA secretan endógenamente PRL activa, presentando los mismos problemas para detectarlos *in vivo* debido a los mecanismos regulatorios y compensatorios, comunes en citoquinas con efectos mitogénicos (Bole-Feysot et al., 1998). Estos datos correlacionan con los observados en estudios relativos a metástasis en hueso de tumores mamarios, donde la señalización iniciada por la PRL tiene un impacto sobre el microambiente metastásico, fomentando el crecimiento de las células (Sutherland et al., 2016). A nivel de expresión génica, no se observa un incremento de PRL en los pacientes de LMA. Aun así, sí que se observa un incremento de la expresión de PRL en pacientes con reordenamientos en el gen MLL (Arber et al., 2016) y los SMD con pronóstico intermedio y alto según el sistema IPSS-R (Greenberg et al., 2012); en ambos casos se observa una firma génica asociada a las LSCs y, por lo tanto, una mayor agresividad tumoral (Winters & Bernt, 2017). Estos datos sugieren que la presencia de PRL no sería un indicativo del riesgo de desarrollar una neoplasia hematológica, igual que sucede en los cánceres de próstata, donde los niveles de PRL circulante no son significativos (Stattin et al., 2001), de la misma manera que las hiperprolactinemias no se relacionan con el desarrollo de neoplasias (Soto-Pedre et al., 2017).

La búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas para combatir la LMA llevó al grupo de investigación a analizar los inhibidores de PRL, ya que permitirían la diferenciación terminal de las células leucémicas y las sensibilizarían frente a tratamientos citotóxicos (Sachlos et al., 2012). Actualmente destacan tres tratamientos encarados a la inhibición de la PRL. Primero, los inhibidores de la secreción de PRL, impidiendo que ésta entre en circulación y lleve a cabo sus acciones endocrinas (Gillam et al., 2006); segundo, los antagonistas competitivos, que compiten por el sitio de unión al receptor con la PRL activa (Goffin et al., 1996); y tercero, los anticuerpos bloqueantes, que bloquean la PRL impidiendo sus acciones sistémicas (Minami et al., 2020; Otto et al., 2015). La primera estrategia utilizada por el laboratorio se basaba en la inhibición de la secreción

de PRL mediante bromocriptina, un fármaco utilizado para el tratamiento de hiperprolactinemias (Gillam et al., 2006; Maurer, 1980; Neidhart, 1997), y, aunque eliminaba exclusivamente las células leucémicas e inducía la diferenciación de los blastos leucémicos (Lara-Castillo et al., 2016), su reposicionamiento para combatir la LMA se descartó, ya que sólo afecta la secreción de la PRL pituitaria (Johansen et al., 1986), dejando intacta toda la sintetizada y secretada fuera de estos tejidos. Además, el efecto de la bromocriptina no estaba mediado por la PRL y su receptor, ya que el tratamiento de células aisladas producía efecto citotóxico, no estando implicado ningún otro órgano (Lara-Castillo et al., 2016). Una vez observado que la inhibición total de la secreción de PRL es prácticamente imposible y el potencial clínico es muy limitado debido a los potenciales efectos secundarios, se decidió enfocar los tratamientos hacia el PRLR mediante el uso de antagonistas competitivos. Hasta el momento, el más estudiado y con resultados preclínicos más prometedores en cáncer de mama es el antagonista del-1-9-G129R (Bernichtein et al., 2003; Goffin et al., 1996; Ramamoorthy et al., 2001). El uso del antagonista G129R en el contexto leucémico ha permitido no sólo observar una disminución en la capacidad de injerto de las células leucémicas en modelos de xenotrasplante en modelos de ratón, sobre todo en machos debido a la expresión diferencial de PRL circulante entre sexos (Patil et al., 2013; Utama et al., 2009), sino que también se ha observado una ventana terapéutica en sus efectos, ya que la disminución de la capacidad de autorrenovación y diferenciación está limitada a las células transformadas, sin afectar a las células hematopoyéticas sanas. El interés de estos resultados reside en la nueva posible diana terapéutica y en los efectos secundarios limitados y posiblemente manejables, resultado no esperable debido a la amplia distribución y funcionalidad del PRLR (Bouilly et al., 2012). Sorprendentemente, la proliferación celular *in vitro* no se ve afectada por la el tratamiento con G129R, posiblemente debido al efecto agónico que también posee la molécula (Bernichtein et al., 2003; Goffin et al., 1996) y que se ve reflejada en la proliferación residual que presentan las células leucémicas al ser tratadas *ex vivo*. Paralelamente, la producción endógena del antagonista demostró efectos tanto *in vitro* como *in vivo*, reflejados en una disminución de la proliferación y del potencial de autorrenovación y de diferenciación, así como una menor capacidad de injerto en modelos de ratón de xenotrasplante y de migración, en concordancia con los datos

obtenidos en cáncer de mama, donde la producción de PRL endógena tiene efectos más significativos y reproducibles (Gutzman et al., 2004).

En conjunto, estos datos sugieren que la presencia de PRL en el contexto leucémico no tiene efectos en el inicio de la neoplasia, pero sí tiene un papel importante en el mantenimiento de ésta (**Figura 71**). Por este motivo, la inhibición del eje de señalización PRL-PRLR nos proporciona una ventana terapéutica más prometedora que la inhibición de la PRL ligando *per se*.

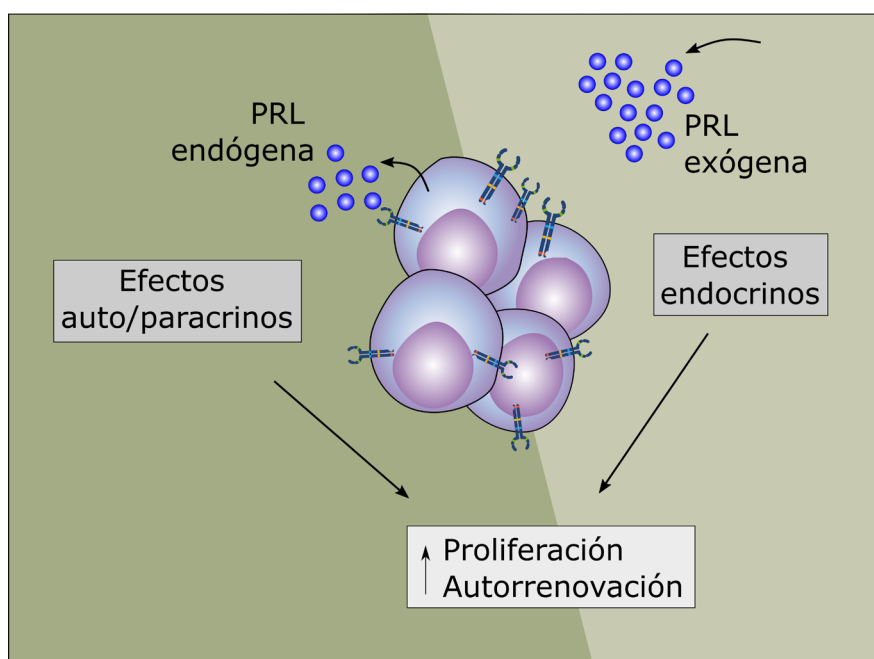


Figura 71. Acciones de la PRL en el contexto leucémico.

Implicación del PRLR en la LMA

Los estudios sobre el papel del PRLR en cáncer se centran en tumores asociados al sistema reproductivo femenino y masculino. Aun así, un estudio epidemiológico reciente ha puesto en evidencia la correlación entre la presencia y activación del eje de PRL:PRLR en neoplasias hematológicas, ya que son el segundo tipo de cáncer más prevalente entre los pacientes diagnosticados con hiperprolactinemias (Berinder et al., 2011). La expresión de PRLR está incrementada a nivel de expresión génica y de proteína en superficie en células leucémicas respecto a células hematopoyéticas sanas, sobre todo en linajes mieloides, igual que sucede en otras neoplasias (Arendt & Schuler, 2008), sugiriendo una importancia en el desarrollo de éstas. La mayor expresión de PRLR se encuentra en LMAs de cariotipo normal, que representa el

subtipo más prevalente (Arber et al., 2016; Eisfeld et al., 2017), y en los SMD de riesgo adverso (IPSS-R), que evoluciona a LMA en la mayoría de los casos (Greenberg et al., 2012). Esto sugiere que la expresión de PRLR no tiene valor pronóstico, pero sí podría ser utilizada como biomarcador. La expresión en superficie del receptor facilita su detección por citometría de flujo, validando su inclusión en el panel de *Euroflow* para el diagnóstico de neoplasias hematológicas, así como para el seguimiento de la enfermedad (Lhermitte et al., 2018).

El PRLR sufre modificaciones post-traduccionales que generan distintas isoformas, caracterizadas por tener funciones y distribución específicas (Clevenger & Kline, 2001). Los procesos tumorales se caracterizan por presentar una mayor expresión de la isoforma salvaje o larga, como es el caso del cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de próstata y cáncer de hígado, entre otros (Bogorad et al., 2006; Clevenger, 2003; Yonezawa et al., 2015). Sin embargo, en LMA no hay efectos significativamente distintos cuando se sobreexpresa diferencialmente una isoforma *in vitro*, posiblemente causado por las limitaciones a la hora de representar el sistema hematopoyético debido a la interacción de las HSCs y las LSCs con el estroma medular (Raaijmakers et al., 2010). La expresión ectópica de la isoforma corta *in vivo*, que posee una capacidad señalizadora inferior, tiene una capacidad de injerto y de migración hacia el torrente sanguíneo menor respecto a la expresión de la isoforma salvaje. Se ha observado que la activación de la vía de señalización del PRLR mediante el ligando disminuye la expresión en superficie de CXCR4, favoreciendo la capacidad migratoria de las células leucémicas. Estos datos se corresponden con los observados en modelos de ratón de xenotrasplante, donde las células leucémicas con el receptor dominante negativo sobreexpresado tienen una capacidad migratoria inferior, debido a la actividad señalizadora de CXCR4 que impide la salida de las células leucémicas al torrente sanguíneo, dificultando la colonización de tejidos (Cancilla et al., 2020). En conjunto, estos datos sugieren que la inhibición farmacológica de CXCR4 puede ser completada inhibiendo la señalización de PRLR, fomentando la supresión de las señales de supervivencia e inhibiendo la migración hacia otros tejidos.

En el contexto leucémico, la expresión ectópica del PRLR activa principalmente la vía de señalización de Jak2/Stat5, relacionándose con el incremento de expresión génica

de Stat5a en las células leucémicas. Estos resultados ya fueron sugeridos por el laboratorio de Alves, defendiendo una activación constitutiva de esta vía de señalización en LMA (Spiekermann et al., 2001) y por el laboratorio de Weissman, donde se observó que la expresión de genes relacionados con la señalización de PRLR estaba estimulada en las LSCs respecto a las células hematopoyéticas sanas (Majeti et al., 2009; Majeti & Weissman, 2011). Estos datos ponen en evidencia, una vez más, no sólo la importancia de la expresión del PRLR, sino también de su señalización. La inhibición farmacológica de la fosforilación de Stat5 en las células leucémicas presenta efectos citotóxicos, sobre todo en las células que expresan el PRLR salvaje y siendo prácticamente indetectables cuando la forma sobreexpresada es la dominante negativa. Estos datos van en concordancia con estudios preclínicos enfocados a la inhibición de la activación de Stat5 en LMA y otras neoplasias hematológicas con resultados prometedores (Page et al., 2012; Wingelhofer et al., 2018), aunque se ha detectado cierta citotoxicidad hacia las células sanas que se podría solventar dirigiendo los tratamientos hacia pacientes con niveles ectópicos de PRLR incrementados, donde los resultados son más prometedores. Aun así, las limitaciones de esta estrategia terapéutica siguen presentes debido al amplio abanico de acciones que abarca Stat5, sobre todo en las neoplasias hematológicas (Maurer et al., 2019). La inhibición de la fosforilación de Stat3 también tiene efectos citotóxicos sobre las células leucémicas debido a su elevada implicación fisiológica (Bole-Feysot et al., 1998), aunque en contraposición a que la isoforma PRLR salvaje no activa la vía de señalización de Stat3. Paralelamente, se ha observado que la inhibición de Jak2 no posee efectos citotóxicos, centrando la esencialidad de Stat3 y Stat5 en la transducción de señal de PRLR en el contexto leucémico, sugiriendo una relación directa con el receptor o mediante otros intermediarios. La implicación del eje PRL:PRLR queda finalmente evidenciada al observar que la PRL administrada exógenamente es capaz de revertir los efectos citotóxicos de los inhibidores de Stat3 y Stat5, sobre todo cuando tenemos expresión ectópica de la isoforma salvaje, pero no cuando la isoforma sobreexpresada es la dominante negativa. Es decir, el PRLR no sólo tiene implicación en el inicio y mantenimiento de la LMA, sino que podemos afirmar que la vía principalmente implicada es la de Jak2/Stat5 y, más secundariamente, la de Jak2/Stat3.

Una de las estrategias terapéuticas más interesantes actualmente para combatir la LMA consiste en la diferenciación terminal de las células leucémicas para incrementar su sensibilidad a tratamientos citotóxicos, fomentando la capacidad de éstos para erradicar completamente los blastos leucémicos (Sachlos et al., 2012). La activación del PRLR con su ligando incrementa la capacidad diferenciadora de dos agentes diferenciadores usados en clínica para leucemias promielocíticas agudas (LPA): ácido holotransretinoico (ATRA) y vitamina D3, sobre todo hacia linajes granulocíticos. Paralelamente, se ha observado que la señalización mediada por Stat3 bloquea la diferenciación hacia linajes granulocíticos, mientras que Stat5 favorece de manera residual la diferenciación granulomonocítica de células leucémicas. Aun así, las vías de señalización implicadas en el proceso de diferenciación están activadas por distintos receptores de citoquinas, no sólo por PRLR, de manera que este proceso podría no ser dependiente de la señalización del PRLR. Los efectos diferenciadores de ATRA y vitamina D3 se han descartado como estrategia terapéutica para LMA debido a la necesidad de su combinación con otros agentes citotóxicos o inhibidores de citoquinas para conseguir un efecto antiproliferativo en las células leucémicas, que presentan un amplio rango de efectos secundarios (Ramsingh et al., 2014). Además, las combinaciones con moduladores del PRLR presentan ciertas limitaciones, ya que son mensajeros secundarios comunes en otras vías de señalización y bloquear exclusivamente la vía PRL-PRLR supone una elevada complejidad.

Los tratamientos aplicados actualmente en clínica para combatir la LMA no han cambiado en las últimas cinco décadas y consiste en el “régimen 7+3”, basado en dosis altas de quimioterapia con citarabina, seguida de antraciclinas (Yates et al., 1973). Estos tratamientos, además de presentar efectos secundarios graves, no son capaces de erradicar completamente la LMA en muchos casos debido a la refractariedad adquirida o innata de las células leucémicas, lo que genera recaídas (Vosberg & Greif, 2019). Esto pone en evidencia la necesidad de entender los mecanismos de quimiorresistencia (MOC) para poder encontrar nuevas estrategias terapéuticas que eviten la refractariedad y las recaídas (Fajardo-Orduña et al., 2021). La expresión ectópica de PRLR está relacionada con la resistencia innata a citarabina y, además, una resistencia adquirida a citarabina también se relaciona con un incremento en la

expresión del receptor. Previamente, se habían observado los mismos resultados en cánceres ginecológicos, datos recogidos en una reciente revisión (Ramírez-de-Arellano et al., 2021), así como en cánceres de próstata (Damiano & Wasserman, 2013). Los MOC pueden clasificarse en varios grupos, donde destaca la quimiorresistencia debida a una disminución en los mecanismos de internalización y absorción de las moléculas y debida a la disminución de activadores e incremento de los desactivadores de las moléculas citotóxicas (Fajardo-Orduña et al., 2021). La sobreexpresión de PRLR afecta a estos dos grandes grupos de MOCs. Por un lado, la expresión de PRLR disminuye la cantidad de citarabina presente dentro de la célula debido a la disminución de los mecanismos de absorción (hENT) y al aumento de externalizadores (MRP4). Por otro lado, las enzimas encargadas de la activación de la citarabina están disminuidas (dCK y NDK), mientras que las desactivadoras están incrementadas (NT5E, PN-I y CDA). En conjunto, estos cambios a nivel de expresión génica generan una disminución en las acciones citotóxicas de la citarabina a nivel nuclear. Aunque el proceso de quimiorresistencia relacionado con la expresión de PRLR ha revelado resultados claros, no son consistentes en las líneas celulares de LMA estudiadas y, además, presentan una elevada heterogeneidad. Existe un tercer MOC que se basa en la reducción de la efectividad de los fármacos citotóxicos debido al incremento en la habilidad para reparar daños en el ADN y la disminución de la expresión de factores proapoptóticos e incremento de los antiapoptóticos, dos características asociadas al estado quiescente que presentan las células cuando entran en senescencia (Fajardo-Orduña et al., 2021; Lytle et al., 2018).

La senescencia está inducida por procesos de envejecimiento celular (Hayflick, 1965) y por daños en el ADN producidos por una replicación celular excesiva debido a procesos oncológicos o a agentes citotóxicos, siendo un proceso reversible (Di Micco et al., 2021; Serrano et al., 1997) y relacionado con los mecanismos de quimiorresistencia característicos de la LMA (Duy et al., 2021). La expresión de PRLR está relacionada con un incremento del estado senescente de las células leucémicas, mientras que una represión génica de su expresión disminuye la senescencia, sugiriendo una relación intrínseca entre la expresión del receptor, el estado senescente y la resistencia a quimioterapia. La importancia del PRLR en la senescencia en el

contexto leucémico ha permitido establecer un modelo que posibilita el inicio de señales que determinan la entrada en senescencia y el mantenimiento de este estado. La entrada en senescencia siempre va precedida por daños producidos en el ADN (DDR), que convergen en la activación de la enzima ATR, activando una cascada de señales que permiten la parada del ciclo celular y la consecuente entrada en estado senescente, siendo ATR un marcador claro de este estado. En concordancia con estos datos, se ha observado que la inhibición farmacológica de ATR incrementa la sensibilidad a citarabina (Duy et al., 2021; Fordham et al., 2018), sobre todo en células con expresión ectópica de PRLR. Una vez la célula entra en senescencia emite señales para permanecer en este estado, donde destaca la secreción de SASP, fomentada por la señalización de Jak/Stat, sobre todo Stat3 (Toso et al., 2014). Dado que esta señalización se encuentra incrementada en la LMA debido a la sobreexpresión de PRLR, el estado senescente estará sostenido en el tiempo, proporcionando una ventaja en la supervivencia de las células. Además, la activación de la vía de señalización de PRLR y la consecuente activación de Jak/Stat permite mantener el fenotipo secretor SASP, manteniendo la célula en senescencia y otorgándole resistencia a tratamientos gracias a su estado quiescente. Finalmente, la represión del receptor permite una salida de senescencia, sugiriendo una mayor sensibilidad a fármacos antileucémicos y pudiendo aplicarse en combinación con inhibidores de ATR. Estos datos correlacionan con los observados en la bibliografía, donde las estrategias terapéuticas enfocadas en la inhibición de la senescencia necesitan estar en combinación con otros agentes citotóxicos (Fokas et al., 2012; Jossé et al., 2014).

Se ha desentramado el papel del PRLR y su ligando en la LMA (**Figura 72**), pero aún queda mucho campo de estudio en la leucemia relacionado con el receptor. La sobreexpresión de PRLR observada en la LMA y su activación funcional en otros tumores sugiere que el desarrollo de una estrategia que permita la modulación del receptor y su señalización podría tener un efecto pancáncer de alto interés clínico (**Figura 73**). El bloqueo del PRLR en tumores ginecológicos y de próstata tiene efectos prometedores en estudios preclínicos, pero suelen caer en los ensayos clínicos. El uso del anticuerpo bloqueante del PRLR LFA102 no presenta actividad antitumoral en los ensayos clínicos de Fase I, posiblemente debido al tiempo

necesitado para bloquear los PRLR más periféricos (Agarwal et al., 2016; Minami et al., 2020). Otro anticuerpo bloqueante utilizado ha sido el Mat3, aunque los resultados de los ensayos clínicos son pobres y se necesitan estudios adicionales, descartando la estrategia terapéutica (Freiberg et al., 2016). Otra de las estrategias terapéuticas más estudiadas es el antagonista del-1-9-G129R en cáncer de mama (Scotti et al., 2008), cáncer de ovario y endometrio (Wen et al., 2014) y cáncer de próstata (Thomas et al., 2012), con resultados escasos que revelan la necesidad de más investigación al respecto. Aun así, esta última estrategia ofrece una ventana terapéutica interesante en la LMA con efectos observados tanto *ex vivo*, como *in vivo*. Aun así, la distribución focalizada del antagonista es un reto a solventar, así como el efecto residual agónico observado, dejando en evidencia la necesidad de modificaciones de química médica y la combinación con otras moléculas inhibidoras. Finalmente, otra estrategia con potencial es el uso de pequeñas moléculas inhibidoras, que permiten una distribución más concreta, minimizando los efectos secundarios, como se ha observado en cáncer de mama recientemente (Borcherding et al., 2021). La inhibición del CXCR4 con fármacos actualmente en ensayos clínicos permitiría el mantenimiento de las células leucémicas en la médula ósea, concentrando las células en una zona concreta fácilmente accesible para pequeñas moléculas inhibidoras dirigidas contra el PRLR.

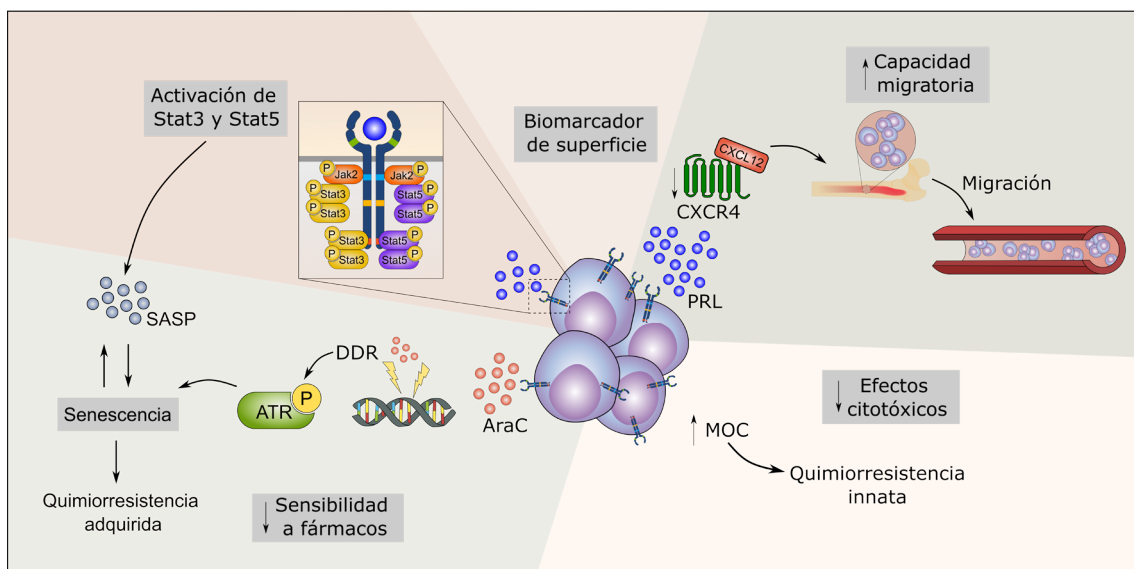


Figura 72. Acciones del PRLR en el contexto leucémico.

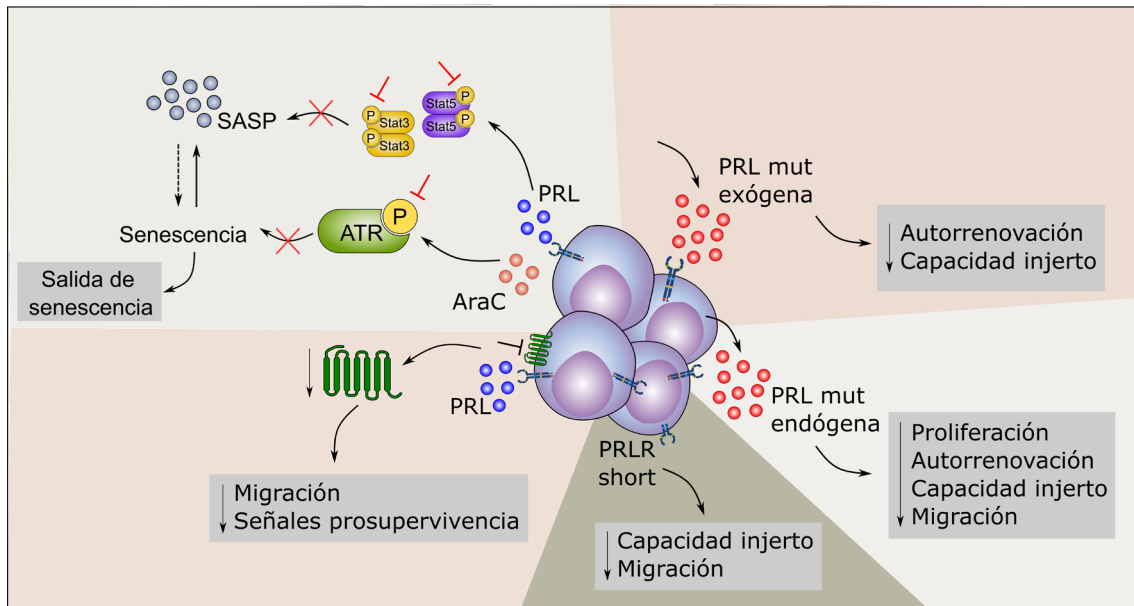


Figura 73. Posibles estrategias terapéuticas dirigidas al PRLR y sus efectos en el contexto leucémico.

A lo largo de este trabajo se ha desvelado por primera vez que la presencia del PRLR en LMA es clave para el inicio y mantenimiento de la enfermedad, ya que la supresión de éste disminuye completamente la capacidad de autorrenovación de las células leucémicas, convirtiéndose en un biomarcador adecuado para el diagnóstico de la leucemia. Aunque no se han observado efectos proliferativos debido a la expresión de la isoforma salvaje del receptor, la isoforma dominante negativa presenta una capacidad leucémica y colonizadora inferior, poniendo en evidencia la eficacia de un inhibidor del receptor que impida la progresión de las vías de señalización. Además, la expresión del receptor y su activación promueven un estado senescente de las células, relacionándose directamente con la resistencia a quimioterapia asociada a la expresión incrementada del PRLR, característica de las células leucémicas. Todos estos datos indican por primera vez que la supresión de la señalización del PRLR no sólo dificultaría el progreso de la neoplasia hematológica, sino que también incrementaría la sensibilidad a fármacos y podría incluso revertir los mecanismos de quimiorresistencia, respaldando el desarrollo preclínico de inhibidores dirigidos específicamente hacia el receptor.

6. Conclusiones

En base a todo lo expuesto hasta ahora, se pueden extraer cinco grandes conclusiones de esta tesis doctoral que se detallan a continuación.

- 1) La prolactina tiene un papel relevante en el mantenimiento de la LMA fomentando la proliferación y la autorrenovación de las células leucémicas, mientras que su papel en el inicio de los procesos leucémicos es limitado.
- 2) Existe una expresión diferencial del PRLR en las células leucémicas en comparación con las células sanguíneas sanas fácilmente detectable por citometría de flujo, validando el potencial del PRLR como biomarcador de diagnóstico.
- 3) En el contexto leucémico la señalización por el PRLR está mediada por Stat5 e induce la expresión de un fenotipo de resistencia a quimioterapia tanto a nivel funcional como genético, en parte debido a la capacidad de las células de entrar en un estado senescente que disminuye su sensibilidad a agentes quimioterapéuticos. Además, aumenta la capacidad regenerativa de la leucemia, así como la migración y movilización de las células leucémicas *in vivo*.
- 4) La inhibición de la señalización del PRLR mediante un antagonista competitivo expresado ectópicamente o bien administrado exógenamente en forma de proteína aislada (del-1-9-G129R) reduce la capacidad clonogénica de las células leucémicas *ex vivo*, así como la capacidad de regeneración de la leucemia *in vivo*, sin afectar las células sanguíneas sanas.
- 5) Teniendo en cuenta la expresión diferencial de PRLR y la disminución de la capacidad clonogénica y regenerativa de la LMA *ex vivo* e *in vivo*, respectivamente, debido a su inhibición, podemos concluir que existe un efecto diferencial (ventana terapéutica), ya que no hay afectación de las células sanguíneas sanas. Esta premisa apoya el desarrollo de nuevas aproximaciones terapéuticas alrededor del PRLR.

7. Bibliografía

- Abe, M., Nozawa, Y., Wakasa, H., Ohno, H., & Fukuhara, S. (1988). Characterization and comparison of two newly established Epstein-Barr virus-negative lymphoma B-cell lines. Surface markers, growth characteristics, cytogenetics, and transplantability. *Cancer*, *61*(3), 483–490. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19880201\)61:3<483::aid-cncr2820610313>3.0.co;2-1](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19880201)61:3<483::aid-cncr2820610313>3.0.co;2-1)
- Abramicheva, P. A., & Smirnova, O. V. (2019). Prolactin Receptor Isoforms as the Basis of Tissue-Specific Action of Prolactin in the Norm and Pathology. *Biochemistry (Moscow)*, *84*(4), 329–345. <https://doi.org/10.1134/S0006297919040011>
- Agarwal, N., Machiels, J., Suárez, C., Lewis, N., Higgins, M., Wisinski, K., Awada, A., Maur, M., Stein, M., Hwang, A., Mosher, R., Wasserman, E., Wu, G., Zhang, H., Zieba, R., & Elmeliogy, M. (2016). Phase I Study of the Prolactin Receptor Antagonist LFA102 in Metastatic Breast and Castration-Resistant Prostate Cancer. *The Oncologist*, *21*(5), 535. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2015-0502>
- Agliano, A., Martin-padura, I., Mancuso, P., Marighetti, P., Rabascio, C., Pruneri, G., Shultz, L. D., & Bertolini, F. (2008). Human acute leukemia cells injected in NOD / LtSz- scid / IL-2R c null mice generate a faster and more efficient disease compared to other NOD / scid -related strains. *The Journal of Clinical Investigation*, *2227*(May), 2222–2227. <https://doi.org/10.1002/ijc.23772>
- Alexander, W. S., & Hilton, D. J. (2004). The role of Suppressors of Cytokine Signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. *Annual Review of Immunology*, *22*, 503–529. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.091003.090312>
- Anderson, K., Lutz, C., Van Delft, F. W., Bateman, C. M., Guo, Y., Colman, S. M., Kempfski, H., Moorman, A. V., Titley, I., Swansbury, J., Kearney, L., Enver, T., & Greaves, M. (2011). Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia. *Nature*, *469*(7330), 356–361. <https://doi.org/10.1038/nature09650>
- 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>
- Arendt, L. M., & Schuler, L. A. (2008). Transgenic models to study actions of prolactin in mammary neoplasia. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, *13*(1), 29–40. <https://doi.org/10.1007/s10911-008-9073-9>
- Asou, H., Tashiro, S., Hamamoto, K., Otsuji, A., Kita, K., & Kamada, N. (1991). Establishment of a human acute myeloid leukemia cell line (Kasumi-1) with 8;21 chromosome translocation. *Blood*, *77*(9), 2031–2036. <https://doi.org/10.1182/blood.v77.9.2031.2031>

- Astle, M. V., Hannan, K. M., Ng, P. Y., Lee, R. S., George, A. J., Hsu, A. K., Haupt, Y., Hannan, R. D., & Pearson, R. B. (2012). AKT induces senescence in human cells via mTORC1 and p53 in the absence of DNA damage: Implications for targeting mTOR during malignancy. *Oncogene*, *31*(15), 1949–1962. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.394>
- Bellone, G., Astarita, P., Artusio, E., Silvestri, S., Mareschi, K., Turletti, A., Buttiglieri, S., Emanuelli, G., & Matera, L. (1997). Bone marrow stroma-derived prolactin is involved in basal and platelet-activating factor-stimulated in vitro erythropoiesis. *Blood*, *90*(1), 21–27. <https://doi.org/10.1182/blood.v90.1.21>
- Bellone, G., Geuna, M., Carbone, A., Silvestri, S., Foa, R., Emanuelli, G., & Matera, L. (1995). Regulatory action of prolactin on the in vitro growth of CD34+ve human hemopoietic progenitor cells. *Journal of Cellular Physiology*, *163*(2), 221–231. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041630202>
- Ben-Jonathan, N., LaPensee, C. R., & LaPensee, E. W. (2008). What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endocrine Reviews*, *29*(1), 1–41. <https://doi.org/10.1210/er.2007-0017>
- Benjamin, D., Magrath, I. T., Maguire, R., Janus, C., Todd, H. D., & Parsons, R. G. (1982). Immunoglobulin secretion by cell lines derived from African and American undifferentiated lymphomas of Burkitt's and non-Burkitt's type. *The Journal of Immunology*, *129*(3).
- Bennett, J., Catovsky, D., Daniel, M.-T., Flandrin, G., Galton, D., Gralnick, H., & Sultan, C. (1976). Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias. *British Journal of Haematology*, *33*, 451–458.
- Berinder, K., Akre, O., Granathand, F., & Hulting, A. L. (2011). Cancer risk in hyperprolactinemia patients: A population-based cohort study. *European Journal of Endocrinology*, *165*(2), 209–215. <https://doi.org/10.1530/EJE-11-0076>
- Bern, H. A., & Nicoll, C. S. (1968). The comparative endocrinology of prolactin. *Recent Progress in Hormone Research*, *24*, 681–720. <https://doi.org/10.1016/b978-1-4831-9827-9.50019-8>
- Bernichtein, S., Kayser, C., Dillner, K., Moulin, S., Kopchick, J. J., Martial, J. A., Norstedt, G., Isaksson, O., Kelly, P. A., & Goffin, V. (2003). Development of pure prolactin receptor antagonists. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(38), 35988–35999. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305687200>
- Besser, D., Bromberg, J. F., Darnell, J. E., & Hanafusa, H. (1999). A Single Amino Acid Substitution in the v-Eyk Intracellular Domain Results in Activation of Stat3 and Enhances Cellular Transformation. *Molecular and Cellular Biology*, *19*(2), 1401–1409. <https://doi.org/10.1128/mcb.19.2.1401>
- Bogorad, R. L., Ostroukhova, T. Y., Orlova, A. N., Rubtsov, P. M., & Smirnova, O. V. (2006). Long isoform of prolactin receptor predominates in rat intrahepatic bile ducts and further increases under obstructive cholestasis. *Journal of Endocrinology*, *188*(2), 345–354. <https://doi.org/10.1677/joe.1.06468>

- Bole-Feysot, C., Goffin, V., Edery, M., Binart, N., & Kelly, P. A. (1998). Prolactin (PRL) and its receptor: Actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocrine Reviews*, *19*(3), 225–268. <https://doi.org/10.1210/edrv.19.3.0334>
- Borcherding, D. C., Hugo, E. R., Fox, S. R., Jacobson, E. M., Hunt, B. G., Merino, E. J., Ben-Jonathan, N., & Saraiva, L. (2021). Suppression of Breast Cancer by Small Molecules That Block the Prolactin Receptor. *Cancers*, *13*, 2662. <https://doi.org/10.3390/cancers13112662>
- Bose, P., Vachhani, P., & Cortes, J. E. (2017). Treatment of Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia. In *Current Treatment Options in Oncology* (Vol. 18, Issue 3). Springer New York LLC. <https://doi.org/10.1007/s11864-017-0456-2>
- Bouilly, J., Sonigo, C., Auffret, J., Gibori, G., & Binart, N. (2012). Prolactin signaling mechanisms in ovary. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *356*(1–2), 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.05.004>
- Boutin, J. M., Edery, M., Shirota, M., Jolicoeu, C., Lesueur, L., Ali, S., Gould, D., Djiane, J., & Kelly, P. A. (1989). Identification of a cDNA encoding a long form of prolactin receptor in human hepatoma and breast cancer cells. *Molecular Endocrinology*, *3*(9), 1455–1461. <https://doi.org/10.1210/mend-3-9-1455>
- Bridger, G. J., Skerlj, R. T., Thornton, D., Padmanabhan, S., Martellucci, S. A., Henson, G. W., Abrams, M. J., Yamamoto, N., De Vreese, K., Pauwels, R., & De Clercq, E. (1995). Synthesis and Structure-Activity Relationships of Phenylenebis(methylene)-Linked Bis-Tetraazamacrocycles That Inhibit HIV Replication. Effects of Macrocyclic Ring Size and Substituents on the Aromatic Linker. *Journal of Medicinal Chemistry*, *38*(2), 366–378. <https://doi.org/10.1021/jm00002a019>
- Brooks, C. L. (2012). Molecular Mechanisms of Prolactin and Its Receptor. *Endocrine Reviews*, *33*(August), 1–22. <https://doi.org/10.1210/er.2011-1040>
- Brueckner, B., Boy, R. G., Siedlecki, P., Musch, T., Kliem, H. C., Zielenkiewicz, P., Suhai, S., Wiessler, M., & Lyko, F. (2005). Epigenetic reactivation of tumor suppressor genes by a novel small-molecule inhibitor of human DNA methyltransferases. *Cancer Research*, *65*(14), 6305–6311. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-2957>
- Burnett, A. K., Hills, R. K., Milligan, D., Kjeldsen, L., Kell, J., Russell, N. H., Yin, J. A. L., Hunter, A., Goldstone, A. H., & Wheatley, K. (2011). Identification of Patients with Acute Myeloblastic Leukemia Who Benefit from the Addition of Gemtuzumab Ozogamicin: Results of the MRC AML15 Trial. *Journal of Clinical Oncology*, *29*(4), 369–377. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.31.4310>
- Campbell, G. S., Argetsinger, L. S., Ihlet, J. N., Kelly, P. A., Rillemat, J. A., & Carter-Su, C. (1994). Activation of JAK2 tyrosine kinase by prolactin receptors in Nb2 cells and mouse mammary gland explants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, *91*, 5232–5236.

- Cancilla, D., Rettig, M. P., & DiPersio, J. F. (2020). Targeting CXCR4 in AML and ALL. *Frontiers in Oncology*, *10*(September).
<https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01672>
- Castaigne, S., Chomienne, C., Daniel, M. T., Ballerini, P., Berger, R., Fenaux, P., & Degos, L. (1990). All-trans retinoic acid as a differentiation therapy for acute promyelocytic leukemia. I. Clinical results. *Blood*, *76*(9), 1704–1709.
<https://doi.org/10.1182/blood.v76.9.1704.1704>
- Castedo, M., Perfettini, J. L., Roumier, T., Andreau, K., Medema, R., & Kroemer, G. (2004). Cell death by mitotic catastrophe: A molecular definition. In *Oncogene* (Vol. 23, Issue 16 REV. ISS. 2, pp. 2825–2837). Nature Publishing Group.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207528>
- Cavaco, B., Leite, V., Santos, M. A., Arranhado, E., & Sobrinho, L. G. (1995). Some Forms of Big Big Prolactin with Macroprolactinemia or Prolactinoma. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *80*(8), 2342–2346.
- Chen, W. Y., Ramamoorthy, P., Chen, N. Y., Sticca, R., & Wagner, T. E. (1999). A human prolactin antagonist, hPRL-G129R, inhibits breast cancer cell proliferation through induction of apoptosis. *Clinical Cancer Research*, *5*(11), 3583–3593.
- Childs, B. G., Baker, D. J., Kirkland, J. L., Campisi, J., & Deursen, J. M. (2014). Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO Reports*, *15*(11), 1139–1153. <https://doi.org/10.15252/embr.201439245>
- Chopra, M., & Bohlander, S. K. (2019). The cell of origin and the leukemia stem cell in acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes and Cancer*, *58*(12), 850–858.
<https://doi.org/10.1002/gcc.22805>
- Christensen, H. R., Murawsky, M. K., Horseman, N. D., Willson, T. A., & Gregerson, K. A. (2013). Completely Humanizing Prolactin Rescues Infertility in Prolactin Knockout Mice and Leads to Human Prolactin Expression in Extrapituitary Mouse Tissues. *Endocrinology*, *154*(12), 4777–4789.
<https://doi.org/10.1210/en.2013-1476>
- Clevenger, C. V., & Kline, J. B. (2001). Prolactin receptor signal transduction. *Lupus*, *10*(10), 706–718. <https://doi.org/10.1191/096120301717164949>
- Clevenger, CV, Freier, D., & Kline, J. (1998). Prolactin receptor signal transduction in cells of the immune system. *Journal of Endocrinology*, *157*(2), 187–197.
<https://doi.org/10.1677/joe.0.1570187>
- Clevenger, Charles V. (2003). Role of prolactin/prolactin receptor signaling in human breast cancer. *Breast Disease*, *18*, 75–86. <https://doi.org/10.3233/BD-2003-18108>
- Clevenger, Charles V., Gadd, S. L., & Zheng, J. (2009). New mechanisms for PRLr action in breast cancer. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, *20*(5), 223–229.
<https://doi.org/10.1016/j.tem.2009.03.001>

- Colmone, A., Amorim, M., Pontier, A. L., Wang, S., Jablonski, E., & Sipkins, D. A. (2008). Leukemic cells create bone marrow niches that disrupt the behavior of normal hematopoietic progenitor cells. *Science*, *322*(5909), 1861–1865. <https://doi.org/10.1126/science.1164390>
- Copelan, E. A. (2006). Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *The New England Journal of Medicine*, *354*, 1813–1826.
- Cornet-Masana, J. M., Banús-Mulet, A., Carbó, J. M., Torrente, M. Á., Guijarro, F., Cuesta-Casanovas, L., Esteve, J., & Risueño, R. M. (2019). Dual lysosomal-mitochondrial targeting by antihistamines to eradicate leukaemic cells. *EBioMedicine*, *47*, 221–234. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.08.021>
- Cosme-Blanco, W., Shen, M. F., Lazar, A. J. F., Pathak, S., Lozano, G., Multani, A. S., & Chang, S. (2007). Telomere dysfunction suppresses spontaneous tumorigenesis in vivo by initiating p53-dependent cellular senescence. *EMBO Reports*, *8*(5), 497–503. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400937>
- Coss, D., Kuo, C. B., Yang, L., Ingleton, P., Luben, R., & Walker, A. M. (1999). Dissociation of Janus kinase 2 and signal transducer and activator of transcription 5 activation after treatment of Nb2 cells with a molecular mimic of phosphorylated prolactin. *Endocrinology*, *140*(11), 5087–5094. <https://doi.org/10.1210/endo.140.11.7104>
- Cros, E., Jordheim, L., Dumontet, C., & Galmarini, C. M. (2004). Problems related to resistance to cytarabine in acute myeloid leukemia. In *Leukemia and Lymphoma* (Vol. 45, Issue 6, pp. 1123–1132). Leuk Lymphoma. <https://doi.org/10.1080/1042819032000159861>
- Damiano, J. S., & Wasserman, E. (2013). Molecular pathways: Blockade of the PRLR signaling pathway as a novel antihormonal approach for the treatment of breast and prostate cancer. *Clinical Cancer Research*, *19*(7), 1644–1650. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0138>
- Dean, P. N., & Jett, J. H. (1974). Mathematical analysis of DNA distribution derived from flow microfluorometry. *The Journal of Cell Biology*, *60*, 523–527.
- Degos, L. (1992). All-trans retinoic acid (ATRA) therapeutic effect in acute promyelocytic leukemia. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *46*(5–7), 201–209. [https://doi.org/10.1016/0753-3322\(92\)90083-J](https://doi.org/10.1016/0753-3322(92)90083-J)
- DeVito, W. J. (1988). Distribution of immunoreactive prolactin in the male and female rat brain: Effects of hypophysectomy and intraventricular administration of colchicine. *Neuroendocrinology*, *47*(4), 284–289. <https://doi.org/10.1159/000124926>
- Di Micco, R., Fumagalli, M., Cicalese, A., Piccinin, S., Gasparini, P., Luise, C., Schurra, C., Garré, M., Giovanni Nuciforo, P., Bensimon, A., Maestro, R., Giuseppe Pelicci, P., & D'Adda Di Fagagna, F. (2006). Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature*, *444*(7119), 638–642. <https://doi.org/10.1038/nature05327>

- Di Micco, R., Krizhanovsky, V., Baker, D., & d'Adda di Fagagna, F. (2021). Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 22, Issue 2, pp. 75–95). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00314-w>
- Dick, J. E. (1996). Normal and leukemic human stem cells assayed in SCID mice. *Immunology*, 8, 197–206.
- Dick, J. E. (2008). Stem cell concepts renew cancer research. *Blood*, 112(13), 4793–4807. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-08-077941>
- Dick, J. E., & Bonnet, D. (1997). Human Acute Myeloid Leukaemia is organised as a hierarchy that originates from a primitive haematopoietic cell. *Nature Medicine*, 3(7), 730–737. <http://www.nature.com/naturemedicine>
- Döhner, H., Estey, E., Grimwade, D., Amadori, S., Appelbaum, F. R., Büchner, T., Dombret, H., Ebert, B. L., Fenaux, P., Larson, R. A., Levine, R. L., Lo-Coco, F., Naoe, T., Niederwieser, D., Ossenkoppele, G. J., Sanz, M., Sierra, J., Tallman, M. S., Tien, H. F., ... Bloomfield, C. D. (2017). Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. In *Blood* (Vol. 129, Issue 4). <https://doi.org/10.1182/blood-2016-08-733196>
- Döhner, H., Weisdorf, D. J., & Bloomfield, C. D. (2015). Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 373(12), 1136–1152. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1406184>
- Duan, G., Tang, Q., Yan, H., Xie, L., Wang, Y., Zheng, X. E., Zhuge, Y., Shen, S., Zhang, B., Zhang, X., Wang, J., Wang, W., & Zou, X. (2017). A Strategy to Delay the Development of Cisplatin Resistance by Maintaining a Certain Amount of Cisplatin-Sensitive Cells. *Scientific Reports*, 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00422-2>
- Dubridge, R. B., Tang, P., Chao Hsia, H., Leong, P.-M., Miller, J. H., & Calos1, M. P. (1987). Analysis of Mutation in Human Cells by Using an Epstein-Barr Virus Shuttle System. In *Molecular and Cellular Biology* (Vol. 7, Issue 1). <https://journals.asm.org/journal/mcb>
- Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R. J., Nguyen, M., Trono, D., & Naldini, L. (1998). A Third-Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System. *Journal of Virology*, 72(11), 8463–8471. <https://doi.org/10.1128/jvi.72.11.8463-8471.1998>
- Duy, C., Li, M., Teater, M., Meydan, C., Garrett-Bakelman, F. E., Lee, T. C., Chin, C. R., Durmaz, C., Kawabata, K. C., Dhimolea, E., Mitsiades, C. S., Doehner, H., D'Andrea, R. J., Becker, M. W., Paietta, E. M., Mason, C. E., Carroll, M., & Melnick, A. M. (2021). Chemotherapy Induces Senescence-Like Resilient Cells Capable of Initiating AML Recurrence. *Cancer Discovery*, 11(6), 1542–1561. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-20-1375>
- Eisfeld, A. K., Mrózek, K., Kohlschmidt, J., Nicolet, D., Orwick, S., Walker, C. J.,

- Kroll, K. W., Blachly, J. S., Carroll, A. J., Kolitz, J. E., Powell, B. L., Wang, E. S., Stone, R. M., de la Chapelle, A., Byrd, J. C., & Bloomfield, C. D. (2017). The mutational oncoprint of recurrent cytogenetic abnormalities in adult patients with de novo acute myeloid leukemia. *Leukemia*, *31*(10), 2211–2218. <https://doi.org/10.1038/leu.2017.86>
- Eppert, K., Takenaka, K., Lechman, E. R., Waldron, L., Nilsson, B., Van Galen, P., Metzeler, K. H., Poepl, A., Ling, V., Beyene, J., Canty, A. J., Danska, J. S., Bohlander, S. K., Buske, C., Minden, M. D., Golub, T. R., Jurisica, I., Ebert, B. L., & Dick, J. E. (2011). Stem cell gene expression programs influence clinical outcome in human leukemia. *Nature Medicine*, *17*(9), 1086–1094. <https://doi.org/10.1038/nm.2415>
- Estey, E., & Döhner, H. (2006). Acute myeloid leukaemia. *The Lancet*, *368*, 1894–1907.
- Fajardo-Orduña, G. R., Ledesma-Martínez, E., Aguiñiga-Sánchez, I., Mora-García, M. de L., Weiss-Steider, B., & Santiago-Osorio, E. (2021). Inhibitors of chemoresistance pathways in combination with ara-c to overcome multidrug resistance in aml. A mini review. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 9). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms22094955>
- Fang, F., Antico, G., Zheng, J., & Clevenger, C. V. (2008). Quantification of PRL/Stat5 signaling with a novel pGL4-CISH reporter. *BMC Biotechnology*, *8*, 1–7. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-8-11>
- Feldman, E. J., Lancet, J. E., Kolitz, J. E., Ritchie, E. K., Roboz, G. J., List, A. F., Allen, S. L., Asatiani, E., Mayer, L. D., Swenson, C., & Louie, A. C. (2011). First-in-man study of CPX-351: A liposomal carrier containing cytarabine and daunorubicin in a fixed 5:1 molar ratio for the treatment of relapsed and refractory acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, *29*(8), 979–985. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.30.5961>
- Ferrara, F., Lessi, F., Vitagliano, O., Birkenghi, E., & Rossi, G. (2019). Current therapeutic results and treatment options for older patients with relapsed acute myeloid leukemia. In *Cancers* (Vol. 11, Issue 2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/cancers11020224>
- Fokas, E., Prevo, R., Pollard, J. R., Reaper, P. M., Charlton, P. A., Cornelissen, B., Vallis, K. A., Hammond, E. M., Olcina, M. M., Gillies McKenna, W., Musche, R. J., & Brunner, T. B. (2012). Targeting ATR in vivo using the novel inhibitor VE-822 results in selective sensitization of pancreatic tumors to radiation. *Cell Death and Disease*, *3*(12), e441-10. <https://doi.org/10.1038/cddis.2012.181>
- Foley, G. E., Lazarus, H., Farber, S., Uzman, B. G., Boone, B. A., & McCarthy, R. E. (1965). Continuous culture of human lymphoblasts from peripheral blood of a child with acute leukemia. *Cancer*, *18*(4), 522–529. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(196504\)18:4<522::aid-cncr2820180418>3.0.co;2-j](https://doi.org/10.1002/1097-0142(196504)18:4<522::aid-cncr2820180418>3.0.co;2-j)

- Fordham, S. E., Blair, H. J., Elstob, C. J., Plummer, R., Drew, Y., Curtin, N. J., Heidenreich, O., Pal, D., Jamieson, D., Park, C., Pollard, J., Fields, S., Milne, P., Jackson, G. H., Marr, H. J., Menne, T., Jones, G. L., & Allan, J. M. (2018). Inhibition of ATR acutely sensitizes acute myeloid leukemia cells to nucleoside analogs that target ribonucleotide reductase. *Blood Advances*, 2(10), 1157–1169. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2017015214>
- Frank, D. A. (2007). STAT3 as a central mediator of neoplastic cellular transformation. *Cancer Letters*, 251(2), 199–210. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2006.10.017>
- Freeman, M. E., Kanyicska, B., Lerant, A., & Nagy, G. (2000). Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiological Reviews*, 80(4), 1523–1631. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-515400-0.50037-3>
- Freiberg, C., Otto, C., Linden, L., Harrenga, A., Trautwein, M., Greven, S., & Wilmen, A. (2016). *Neutralizing prolactin receptor antibody Mat3 and its therapeutic use*.
- Gallagher, R., Collins, J. T., McCredie, K., Ahearn, M., Tsai, S., Metzgar, R., Aulakh, G., Ting, R., Ruscetti, F., & Gallo, R. (1979). Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 54(3), 713–733. *Blood*, 54(3). <https://doi.org/10.1182/blood-2016-10-748780>
- Gentles, A. J., Plevritis, S. K., Majeti, R., & Alizadeh, A. A. (2014). A leukemic stem cell gene expression signature is associated with clinical outcomes in acute myeloid leukemia. *JAMA*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1001/jama.2010.1862.A>
- Gilbert, L. A., & Hemann, M. T. (2010). DNA damage-mediated induction of a chemoresistant niche. *Cell*, 143(3), 355–366. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.09.043>
- Gillam, M. P., Molitch, M. E., Lombardi, G., & Colao, A. (2006). Advances in the treatment of prolactinomas. *Endocrine Reviews*, 27(5), 485–534. <https://doi.org/10.1210/er.2005-9998>
- Gocek, E., Bauraska, H., Marchwicka, A., & Marcinkowska, E. (2012). Regulation of Leukemic Cell Differentiation through the Vitamin D Receptor at the Levels of Intracellular Signal Transduction, Gene Transcription, and Protein Trafficking and Stability. *Leukemia Research and Treatment*, 2012, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2012/713243>
- Goffin, V., Kinet, S., Ferrag, F., Binart, N., Martial, J. A., & Kelly, P. A. (1996). Antagonistic properties of human prolactin analogs that show paradoxical agonistic activity in the Nb2 bioassay. *Journal of Biological Chemistry*, 271(28), 16573–16579. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.28.16573>
- Goffin, V., & Touraine, P. (2015). The prolactin receptor as a therapeutic target in human diseases: Browsing new potential indications. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 19(9), 1229–1244.

<https://doi.org/10.1517/14728222.2015.1053209>

- Greaves, M. (2016). Evolutionary determinants of cancer. *Cancer Discovery*, 5(8), 806–820. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-0439>. Evolutionary
- Greaves, M., & Maley, C. C. (2012). Clonal evolution in cancer. *Nature*, 481(7381), 306–313. <https://doi.org/10.1038/nature10762>. CLONAL
- Greenan, J. R., Balden, E., Ho, T. W. C., & Walker, A. M. (1989). Biosynthesis of the secreted 24 k isoforms of prolactin. *Endocrinology*, 125(4), 2041–2048. <https://doi.org/10.1210/endo-125-4-2041>
- Greenberg, P. L., Tuechler, H., Schanz, J., Sanz, G., Garcia-Manero, G., Solé, F., Bennett, J. M., Bowen, D., Fenaux, P., Dreyfus, F., Kantarjian, H., Kuendgen, A., Levis, A., Malcovati, L., Cazzola, M., Cermak, J., Fonatsch, C., Le Beau, M. M., Slovak, M. L., ... Haase, D. (2012). Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*, 120(12), 2454–2465. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-03-420489>
- Gregerson, K. A. (2006). Prolactin: Structure, function, and regulation of secretion. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, 80(4), 1703–1726. <https://doi.org/10.1016/B978-012515400-0/50037-3>
- Guenechea, G., Gan, O. I., Dorrell, C., & Dick, J. E. (2001). Distinct classes of human stem cells that differ in proliferative and self-renewal potential. *Nature Immunology*, 2(1), 75–82. <https://doi.org/10.1038/83199>
- Guo, M., Joiakim, A., & Reiners, J. J. (2000). (TCDD) -Mediated Aryl Hydrocarbon Receptor Transformation and CYP1A1 Induction by the Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibitor. *Science*, 60(00), 635–642.
- Gutzman, J. H., Miller, K. K., & Schuler, L. A. (2004). Endogenous human prolactin and not exogenous human prolactin induces estrogen receptor α and prolactin receptor expression and increases estrogen responsiveness in breast cancer cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 88(1), 69–77. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2003.10.008>
- Hackl, H., Steinleitner, K., Lind, K., Hofer, S., Tomic, N., Pavlovic, S., Suvajdzic, N., Sill, H., & Wieser, R. (2015). A gene expression profile associated with relapse of cytogenetically normal acute myeloid leukemia is enriched for leukemia stem cell genes. *Leukemia and Lymphoma*, 56(4), 1126–1128. <https://doi.org/10.3109/10428194.2014.944523>
- Haferlach, T., Kohlmann, A., Wiczorek, L., Basso, G., Te Kronnie, G., Béné, M. C., De Vos, J., Hernández, J. M., Hofmann, W. K., Mills, K. I., Gilkes, A., Chiaretti, S., Shurtleff, S. A., Kipps, T. J., Rassenti, L. Z., Yeoh, A. E., Papenhausen, P. R., Liu, W. M., Williams, P. M., & Foà, R. (2010). Clinical utility of microarray-based gene expression profiling in the diagnosis and subclassification of leukemia: Report from the international microarray innovations in leukemia study group. *Journal of Clinical Oncology*, 28(15), 2529–2537. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.23.4732>

- Halperin, J., Devi, S. Y., Elizur, S., Stocco, C., Shehu, A., Rebourcet, D., Unterman, T. G., Leslie, N. D., Le, J., Binart, N., & Gibori, G. (2008). Prolactin signaling through the short form of its receptor represses forkhead transcription factor FOXO3 and its target gene Galt causing a severe ovarian defect. *Molecular Endocrinology*, 22(2), 513–522. <https://doi.org/10.1210/me.2007-0399>
- Hatfill, S. J., Kirby, R., Hanley, M., Rybicki, E., & Böhm, L. (1990). Hyperprolactinemia in acute myeloid leukemia and indication of ectopic expression of human prolactin in blast cells of a patient of subtype M4. *Leukemia Research*, 14(1), 57–62. [https://doi.org/10.1016/0145-2126\(90\)90146-Z](https://doi.org/10.1016/0145-2126(90)90146-Z)
- Hayflick, L. (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 37(3), 614–636. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(65\)90211-9](https://doi.org/10.1016/0014-4827(65)90211-9)
- Hayflick, L., & Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 25(3), 585–621. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(61\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(61)90192-6)
- Hiestand, P. C., Mekler, P., Nordmann, R., Grieder, A., & Permmongkol, C. (1986). Prolactin as a modulator of lymphocyte responsiveness provides a possible mechanism of action for cyclosporine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(8), 2599–2603. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.8.2599>
- Howard, J. K., & Flier, J. S. (2006). Attenuation of leptin and insulin signaling by SOCS proteins. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 17(9), 365–371. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2006.09.007>
- Hu, Z.-Z., Zhuang, L., Meng, J., Leondires, M., & Dufau, M. L. (1999). The human prolactin receptor gene structure and alternative promoter utilization: the generic promoter hPIII and a novel human promoter hP(N). *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 84(3), 1153–1156.
- Hu, Z. Z., Meng, J., & Dufau, M. L. (2001). Isolation and Characterization of Two Novel Forms of the Human Prolactin Receptor Generated by Alternative Splicing of a Newly Identified Exon 11. *Journal of Biological Chemistry*, 276(44), 41086–41094. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102109200>
- Hu, Z., Zhuang, L., & Dufau, M. L. (1996). Multiple and tissue-specific promoter control of gonadal and non-gonadal prolactin receptor gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, 271(17), 10242–10246. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.17.10242>
- Huang, C., Hou, Y., Woods, L., Moore, G., & Minowada, J. (1974). Cytogenetic study of human lymphoid T-cell lines derived from lymphocytic leukemia. *Journal of the National Cancer Institute*, 53(3), 655–660. <https://doi.org/10.1093/JNCI/53.3.655>
- Jackson, & Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and

- disease. *Nature*, 461(7267), 1071–1078. <https://doi.org/10.1038/nature08467>
- Jackson, N., Lowe, J., Ball, J., Bromidge, E., Ling, N., Larkins, S., Griffith, M., & Franklin, I. (1989). Two new IgA1-kappa plasma cell leukaemia cell lines (JJN-1 & JJN-2) which proliferate in response to B cell stimulatory factor 2. *Clinical and Experimental Immunology*, 75(1). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2495201/>
- Jadayel, D., Lukas, J., Nacheva, E., Bartkova, J., Stranks, G., De Schouwer, P., Lens, D., Bertek, J., Dyer, M., Kruger, A., & Catovsky, D. (1997). Potential role for concurrent abnormalities of the cyclin D1, p16CDKN2 and p15CDKN2B genes in certain B cell non-Hodgkin's lymphomas. Functional studies in a cell line (Granta 519). *Leukemia*, 11(1), 64–72. <https://doi.org/10.1038/SJ.LEU.2400555>
- Jaiswal, S., & Ebert, B. L. (2014). MDS is a stem cell disorder after all. In *Cancer Cell* (Vol. 25, Issue 6, pp. 713–714). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.06.001>
- Jin, L., Hope, K. J., Zhai, Q., Smadja-Joffe, F., & Dick, J. E. (2006). Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells. *Nature Medicine*, 12(10), 1167–1174. <https://doi.org/10.1038/nm1483>
- Johansen, P. W., Sand, O., Iversen, J. G., Haug, E., & Gautvik, K. M. (1986). Effects of Bromocriptine on prolactin release, electrical membrane properties and transmembrane Ca²⁺ fluxes in cultured rat pituitary adenoma cells. *Acta Endocrinologica*, 111, 185–192.
- Jordan, C. T., & Lemischka, I. R. (1990). Clonal and systemic analysis of long-term hematopoiesis in the mouse. *Genes and Development*, 4(2), 220–232. <https://doi.org/10.1101/gad.4.2.220>
- Jossé, R., Martin, S. E., Guha, R., Ormanoglu, P., Pfister, T. D., Morris, J., Doroshov, J. H., & Pommier, Y. (2014). ATR inhibitors VE-821 and VX-970 sensitize cancer cells to topoisomerase I inhibitors by disabling DNA replication initiation and fork elongation responses. *Cancer Research*, 74(23), 6968–6979. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-3369.ATR>
- Kavarthapu, R., & Dufau, M. L. (2016). Role of EGF/ERBB1 in the transcriptional regulation of the prolactin receptor independent of estrogen and prolactin in breast cancer cells. *Oncotarget*, 7(40), 65602–65613. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11579>
- Kirschner, K., Samarajiwa, S. A., Cairns, J. M., Menon, S., Pérez-Mancera, P. A., Tomimatsu, K., Bermejo-Rodriguez, C., Ito, Y., Chandra, T., Narita, M., Lyons, S. K., Lynch, A. G., Kimura, H., Ohbayashi, T., Tavaré, S., & Narita, M. (2015). Phenotype Specific Analyses Reveal Distinct Regulatory Mechanism for Chronically Activated p53. *PLoS Genetics*, 11(3), 1005053. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005053>
- Kline, J. B., Roehrs, H., & Clevenger, C. V. (1999). Functional characterization of the intermediate isoform of the human prolactin receptor. *Journal of Biological*

- Chemistry*, 274(50), 35461–35468. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.50.35461>
- Koeffler, H. P., & Golde, D. W. (1978). Acute myelogenous leukemia: A human cell line responsive to colony-stimulating activity. *Science*, 200(4346), 1153–1154. <https://doi.org/10.1126/science.306682>
- Kohlmann, A., Kipps, T. J., Rassenti, L. Z., Downing, J. R., Shurtleff, S. A., Mills, K. I., Gilkes, A. F., Hofmann, W. K., Basso, G., Dell'Orto, M. C., Foà, R., Chiaretti, S., De Vos, J., Rauhut, S., Papenhausen, P. R., Hernández, J. M., Lumberras, E., Yeoh, A. E., Koay, E. S., ... Haferlach, T. (2008). An international standardization programme towards the application of gene expression profiling in routine leukaemia diagnostics: The Microarray Innovations in LEukemia study prephase. *British Journal of Haematology*, 142(5), 802–807. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.07261.x>
- Kooijman, R., Gerlo, S., Coppens, A., & Hooghe-Peters, E. L. (2000). Myeloid leukemic cells express and secrete bioactive pituitary-sized 23 kDa prolactin. *Journal of Neuroimmunology*, 110(1–2), 252–258. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(00\)00356-8](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(00)00356-8)
- Lacombe, F., Durrieu, F., Briais, A., Dumain, P., Belloc, F., Bascans, E., Reiffers, J., Boisseau, M. R., & Bernard, P. (1997). Flow cytometry CD45 gating for immunophenotyping of acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 11(11), 1878–1886. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2400847>
- Lajtha, L. G. (1979). Stem Cell Concepts. *Differentiation*, 14(1–3), 23–33. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.1979.tb01007.x>
- Lamb, J., Crawford, E. D., Peck, D., Modell, J. W., Blat, I. C., Wrobel, M. J., Lerner, J., Brunet, J. P., Subramanian, A., Ross, K. N., Reich, M., Hieronymus, H., Wei, G., Armstrong, S. A., Haggarty, S. J., Clemons, P. A., Wei, R., Carr, S. A., Lander, E. S., & Golub, T. R. (2006). The connectivity map: Using gene-expression signatures to connect small molecules, genes, and disease. *Science*, 313(5795), 1929–1935. <https://doi.org/10.1126/science.1132939>
- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M. A., & Dick, J. E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, 367(6464), 645–648. <https://doi.org/10.1038/367645a0>
- Lara-Castillo, M. C., Cornet-Masana, J. M., Etxabe, A., Banús-Mulet, A., Torrente, M. Á., Nomdedeu, M., Díaz-Beyá, M., Esteve, J., & Risueño, R. M. (2016). Repositioning of bromocriptine for treatment of acute myeloid leukemia. *Journal of Translational Medicine*, 14(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-1007-5>
- Lathia, J. D., Heddleston, J. M., Venere, M., & Rich, J. N. (2011). Deadly teamwork: Neural cancer stem cells and the tumor microenvironment. *Cell Stem Cell*, 8(5), 482–485. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.04.013>
- Laverdière, I., Boileau, M., Neumann, A. L., Frison, H., Mitchell, A., Ng, S. W. K.,

- Wang, J. C. Y., Minden, M. D., & Eppert, K. (2018). Leukemic stem cell signatures identify novel therapeutics targeting acute myeloid leukemia. *Blood Cancer Journal*, 8(6). <https://doi.org/10.1038/s41408-018-0087-2>
- Leondires, M. P., Hu, Z. Z., Dong, J., Tsai-Morris, C. H., & Dufau, M. L. (2002). Estradiol stimulates expression of two human prolactin receptor isoforms with alternative exons-1 in T47D breast cancer cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 82(2–3), 263–268. [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(02\)00184-X](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(02)00184-X)
- Levin, M., Stark, M., Ofran, Y., & Assaraf, Y. G. (2021). Deciphering molecular mechanisms underlying chemoresistance in relapsed AML patients: towards precision medicine overcoming drug resistance. *Cancer Cell International*, 21(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12935-021-01746-w>
- Levina, V. V., Nolen, B., Su, Y., Godwin, A. K., Fishman, D., Liu, J., Mor, G., Maxwell, L. G., Herberman, R. B., Miroslaw, J., Szajnik, M. E., Gorelik, E., & Lokshin, A. E. (2009). Biological significance of Prolactin in gynecological cancers. *Cancer Research*, 69(12), 5226–5233. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4652>. Biological
- Lhermitte, L., Mejstrikova, E., Van Der Sluijs-Gelling, A. J., Grigore, G. E., Sedek, L., Bras, A. E., Gaipa, G., Sobral Da Costa, E., Novakova, M., Sonneveld, E., Buracchi, C., De Sá Bacelar, T., Te Marvelde, J. G., Trinquand, A., Asnafi, V., Szczepanski, T., Matarraz, S., Lopez, A., Vidriales, B., ... Van Der Velden, V. H. J. (2018). Automated database-guided expert-supervised orientation for immunophenotypic diagnosis and classification of acute leukemia. *Leukemia*, 32(4), 874–881. <https://doi.org/10.1038/leu.2017.313>
- Li, C., & Hung Wong, W. (2001). Model-based analysis of oligonucleotide arrays: model validation, design issues and standard error application. *Genome Biology*, 2(8), 1–11. <https://doi.org/10.1186/gb-2001-2-8-research0032>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lozzio, C., & Lozzio, B. (1975). Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood*, 45(3):321-334. *Blood*, 45(3). <https://doi.org/10.1182/blood-2016-08-736025>
- Lücking, U., Wortmann, L., Wengner, A. M., Lefranc, J., Lienau, P., Briem, H., Siemeister, G., Bömer, U., Denner, K., Schäfer, M., Koppitz, M., Eis, K., Bartels, F., Bader, B., Bone, W., Moosmayer, D., Holton, S. J., Eberspächer, U., Grudzinska-Goebel, J., ... Von Nussbaum, F. (2020). Damage Incorporated: Discovery of the Potent, Highly Selective, Orally Available ATR Inhibitor BAY 1895344 with Favorable Pharmacokinetic Properties and Promising Efficacy in Monotherapy and in Combination Treatments in Preclinical Tumor Models. *Journal of Medicinal Chemistry*, 63(13), 7293–7325. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00369>

- Lytle, N. K., Barber, A., & Reya, T. (2018). Stem cell fate in cancer growth, progression and therapy resistance. *Nature Reviews Cancer*, *18*(11), 669–680. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0056-x>.Stem
- Majeti, R., Becker, M. W., Tian, Q., Lee, T. M., Yan, X., Liu, R., Chiang, J., Hood, L., Clarke, M. F., & Weissman, I. L. (2009). Dysregulated gene expression networks in human acute myelogenous leukemia stem cells. *PNAS*.
- Majeti, R., & Weissman, I. L. (2011). *Markers of acute myeloid leukemia stem cells*. *Pub. No.: US 2011/0015090 A1*.
- Marano, R. J., & Ben-Jonathan, N. (2014). Minireview: Extrapituitary prolactin: An update on the distribution, regulation, and functions. *Molecular Endocrinology*, *28*(5), 622–633. <https://doi.org/10.1210/me.2013-1349>
- Maria Diakonova. (2014). Recent advances in prolactin research. In I. R. Cohen, A. Lajtha, R. Paoletti, & J. D. Lambris (Eds.), *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 846). Springer. <https://doi.org/10.1080/09553008314551361>
- Marin, J. J. G., Briz, O., Rodríguez-Macias, G., Díez-Martín, J. L., & Macias, R. I. R. (2016). Role of drug transport and metabolism in the chemoresistance of acute myeloid leukemia. *Blood Reviews*, *30*(1), 55–64. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2015.08.001>
- Matsuoka, Y., Moore, G., Yagi, Y., & Pressman, D. (1967). Production of free light chains of immunoglobulin by a hematopoietic cell line derived from a patient with multiple myeloma. *Society for Experimental Biology and Medicine*, *125*(4), 1246–1250. <https://doi.org/10.3181/00379727-125-32327>
- Maurer, B., Kollmann, S., Pickem, J., Hoelbl-Kovacic, A., & Sexl, V. (2019). STAT5A and STAT5B—twins with different personalities in hematopoiesis and leukemia. *Cancers*, *11*(11). <https://doi.org/10.3390/cancers11111726>
- Maurer, R. (1980). Bromoergocryptine-Induced Prolactin Degradation in Cultured Pituitary Cells. *Journal of Biological Chemistry*, *19*(1980), 3573–3578.
- McBride, B. F., Yang, T., Liu, K., Urban, T. J., Giacomini, K. M., Kim, R. B., & Roden, D. M. (2009). The Organic Cation Transporter, OCTN1, Expressed in the Human Heart, Potentiates Antagonism of the HERG Potassium Channel. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, *54*(1), 63–71. <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e3181abc288>.The
- Merlo, L. M. F., Pepper, J. W., Reid, B. J., & Maley, C. C. (2006). Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nature Reviews Cancer*, *6*(12), 924–935. <https://doi.org/10.1038/nrc2013>
- Minami, H., Ando, Y., Tamura, K., Tajima, T., & Isaacs, R. (2020). Phase I Study of LFA102 in Patients with Advanced Breast Cancer or Castration-resistant Prostate Cancer. *Anticancer Research*, *40*(9), 5229–5235. <https://doi.org/10.21873/anticancer.14526>

- Montgomery, D. W. (2001). Prolactin production by immune cells. *Lupus*, *10*(10), 665–675. <https://doi.org/10.1191/096120301717164895>
- Müller, J., Sperl, B., Reindll, W., Kiessling, A., & Berg, T. (2008). Discovery of chromone-based inhibitors of the transcription factor STAT5. *ChemBioChem*, *9*(5), 723–727. <https://doi.org/10.1002/cbic.200700701>
- Murphy, T., & Yee, K. W. L. (2017). Cytarabine and daunorubicin for the treatment of acute myeloid leukemia. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, *18*(16), 1765–1780. <https://doi.org/10.1080/14656566.2017.1391216>
- Nakagawa, T., Matozaki, S., Murayama, T., Nishimura, R., Tsutsumi, M., Kawaguchi, R., Yokoyama, Y., Hikiji, K., Isobe, T., & Chihara, K. (1993). Establishment of a leukaemic cell line from a patient with acquisition of chromosomal abnormalities during disease progression in myelodysplastic syndrome. *British Journal of Haematology*, *85*(3), 469–476. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1993.tb03334.x>
- Napoli, J. L., & Martin, C. A. (1991). Induction, inhibition, and analysis of Vitamin D metabolism in cultured cells. *Methods in Enzymology*, *206*.
- Negoro, E., Yamauchi, T., Urasaki, Y., Nishi, R., Hori, H., & Ueda, T. (2011). Characterization of cytarabine-resistant leukemic cell lines established from five different blood cell lineages using gene expression and proteomic analyses. *International Journal of Oncology*, *38*(4), 911–919. <https://doi.org/10.3892/ijo.2011.933>
- Neidhart, M. (1997). Bromocriptine has little direct effect on murine lymphocytes, the immunomodulatory effect being mediated by the suppression of prolactin secretion. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *51*(3), 118–125. [https://doi.org/10.1016/S0753-3322\(97\)86909-0](https://doi.org/10.1016/S0753-3322(97)86909-0)
- Nilsson, K., Bennich, H., Johansson, S., & Pontén, J. (1970). Established immunoglobulin producing myeloma (IgE) and lymphoblastoid (IgG) cell lines from an IgE myeloma patient. *Clinical and Experimental Immunology*, *7*(4). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4097745/>
- Nishioka, H., Haraoka, J., Akada, K., & Azuma, S. (2002). Gender-related differences in prolactin secretion in pituitary prolactinomas. *Neuroradiology*, *44*(5), 407–410. <https://doi.org/10.1007/s00234-002-0774-2>
- Nitze, L. M., Galsgaard, E. D., Din, N., Lund, V. L., Rasmussen, B. B., Berchtold, M. W., Christensen, L., & Panina, S. (2013). Reevaluation of the proposed autocrine proliferative function of prolactin in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, *142*(1), 31–44. <https://doi.org/10.1007/s10549-013-2731-7>
- Nowell, P. C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, *194*(4260), 23–28. <https://doi.org/10.1126/science.959840>
- Ogawa, M. (1993). Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells.

- Blood*, 81(11), 2844–2853. <https://doi.org/10.1182/blood.v81.11.2844.2844>
- Otto, C., Särnefält, A., Ljungars, A., Wolf, S., Rohde-Schulz, B., Fuchs, I., Schkoldow, J., Mattsson, M., Vonk, R., Harrenga, A., & Freiberg, C. (2015). A neutralizing prolactin receptor antibody whose in vivo application mimics the phenotype of female prolactin receptor-deficient mice. *Endocrinology*, 156(11), 4365–4373. <https://doi.org/10.1210/en.2015-1277>
- Page, B. D. G., Khoury, H., Laister, R. C., Fletcher, S., Vellozo, M., Manzoli, A., Yue, P., Turkson, J., Minden, M. D., & Gunning, P. T. (2012). Small molecule STAT5-SH2 domain inhibitors exhibit potent antileukemia activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(3), 1047–1055. <https://doi.org/10.1021/jm200720n>
- Palacios-berraquero, M. L., & Alfonso-pi, A. (2021). Current Therapy of the Patients with MDS : Walking towards Personalized Therapy. *Journal of Clinical Medicine*, 10, 2107.
- Pan, L., Chen, S., Weng, C., Call, G., Zhu, D., Tang, H., Zhang, N., & Xie, T. (2007). Stem Cell Aging Is Controlled Both Intrinsically and Extrinsically in the Drosophila Ovary. *Cell Stem Cell*, 1(4), 458–469. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.09.010>
- Papaemmanuil, E., Gerstung, M., Malcovati, L., Tauro, S., Gundem, G., Loo, P. Van, Yoon, C. J., Ellis, P., Wedge, D. C., Pellagatti, A., Shlien, A., Groves, M. J., Forbes, S. A., Raine, K., Hinton, J., Mudie, L. J., McLaren, S., Hardy, C., Latimer, C., ... Campbell, P. J. (2013). CME Article Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *The American Society of Hematology*, 122(22), 3616–3627. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-08-518886>
- Patil, M. J., Green, D. P., Henry, M. A., & Akopian, A. N. (2013). Sex-dependent roles of prolactin and prolactin receptor in postoperative pain and hyperalgesia in mice. *Neuroscience*, 3(253), 132–141. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.08.035>
- Pellegrini, I., Lebrun, J. J., Ali, S. A., & Kelly, P. A. (1992). Expression of prolactin and its receptor in human lymphoid cells. *Molecular Endocrinology*, 6(7), 1023–1031. <https://doi.org/10.1210/mend.6.7.1508218>
- Pienta, K. J., McGregor, N., Axelrod, R., & Axelrod, D. E. (2008). Ecological therapy for cancer: Defining tumors using an ecosystem paradigm suggests new opportunities for novel cancer treatments. *Translational Oncology*, 1(4), 158–164. <https://doi.org/10.1593/tlo.08178>
- Qian, J., Huang, X., Zhang, Y., Ye, X., & Qian, W. (2020). γ -Catenin overexpression in AML Patients may promote tumor cell survival via activation of the Wnt/ β -catenin axis. *OncoTargets and Therapy*, 13, 1265–1276. <https://doi.org/10.2147/OTT.S230873>
- Quintás-Cardama, A., Vaddi, K., Liu, P., Manshour, T., Li, J., Scherle, P. A.,

- Caulder, E., Wen, X., Li, Y., Waeltz, P., Rupal, M., Burn, T., Lo, Y., Kelley, J., Covington, M., Shepard, S., Rodgers, J. D., Haley, P., Kantarjian, H., ... Verstovsek, S. (2010). Preclinical characterization of the selective JAK1/2 inhibitor INCB018424: Therapeutic implications for the treatment of myeloproliferative neoplasms. *Blood*, *115*(15), 3109–3117. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-04-214957>
- Raaijmakers, M. H. G. P., Mukherjee, S., Guo, S., Zhang, S., Kobayashi, T., Schoonmaker, J. A., Ebert, B. L., Al-Shahrour, F., Hasserjian, R. P., Scadden, E. O., Aung, Z., Matza, M., Merckenschlager, M., Lin, C., Rommens, J. M., & Scadden, D. T. (2010). Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. *Nature*, *464*(7290), 852–857. <https://doi.org/10.1038/nature08851>
- Ralph, P., Moore, M. A. S., & Nilsson, K. (1976). Lysozyme synthesis by established human and murine histiocytic lymphoma cell lines. *Journal of Experimental Medicine*, *143*(6), 1528–1533. <https://doi.org/10.1084/jem.143.6.1528>
- Ramamoorthy, P., Sticca, R., Wagner, T. E., & Chen, W. Y. (2001). In vitro studies of a prolactin antagonist, hPRL-G129R in human breast cancer cells. *International Journal of Oncology*, *18*(1), 25–32. <https://doi.org/10.3892/ijo.18.1.25>
- Ramírez-de-Arellano, A., Villegas-Pineda, J. C., Hernández-Silva, C. D., & Pereira-Suárez, A. L. (2021). The Relevant Participation of Prolactin in the Genesis and Progression of Gynecological Cancers. *Frontiers in Endocrinology*, *12*(October), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.747810>
- Ramsingh, G., Westervelt, P., McBride, A., Stockerl-Goldstein, K., Vij, R., Uy, G., Cashen, A., DiPersio, J. F., & Abboud, C. N. (2014). Phase I study of cladribine, cytarabine, granulocyte colony stimulating factor (CLAG regimen) and midostaurin and all-trans retinoic acid in relapsed/refractory AML. *International Journal of Hematology*, *99*(3), 272–278. <https://doi.org/10.1007/s12185-014-1503-4>
- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., & Weissman, I. L. (2008). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature Reviews Cancer*, *8*(12), 990. <https://doi.org/10.1038/nrc2419-c2>
- Rhyasen, G. W., Wunderlich, M., Tohyama, K., Garcia-Manero, G., Mulloy, J. C., & Starczynowski, D. T. (2014). An MDS xenograft model utilizing a patient-derived cell line. *Leukemia*, *28*(5), 1142–1145. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.372>
- Riddle, O., Bates, R. W., & Dykshorn, S. W. (1933). The preparation, identification and assay of prolactin - a hormone of the anterior pituitary. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, *101*(1), 191–216.
- Risueño, R. M., Cuesta-Casanovas, L., Carbó, J. M., & Cornet-Masana, J. M. (2021). New Therapeutic Approaches for Acute Myeloid Leukaemia. *European Medical Journal*, *June*, 82–89.

- Rodriguez, V., Hart, J. S., Freireich, E. J., Bodey, G. P., McCredie, K. B., Whitecar, J. P., & Coldtman, C. A. (1973). POMP combination chemotherapy of adult acute leukemia. *Cancer*, *32*, 69–75.
- Sabharwal, P., Glaser, R., Lafuse, W., Varma, S., Liu, Q., Arkins, S., Kooijman, R., Kutz, L., Kelley, K. W., & Malarkey, W. B. (1992). Prolactin synthesized and secreted by human peripheral blood mononuclear cells: An autocrine growth factor for lymphoproliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *89*(16), 7713–7716. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.16.7713>
- Sachlos, E., Risueño, R. M., Laronde, S., Shapovalova, Z., Lee, J. H., Russell, J., Malig, M., McNicol, J. D., Fiebig-Comyn, A., Graham, M., Levadoux-Martin, M., Lee, J. B., Giacomelli, A. O., Hassell, J. A., Fischer-Russell, D., Trus, M. R., Foley, R., Leber, B., Xenocostas, A., ... Bhatia, M. (2012). Identification of drugs including a dopamine receptor antagonist that selectively target cancer stem cells. *Cell*, *149*(6), 1284–1297. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.049>
- Sackmann-Sala, L., Chiche, A., Mosquera-Garrote, N., Boutillon, F., Cordier, C., Pourmir, I., Pascual-Mathey, L., Kessal, K., Pigat, N., Camparo, P., & Goffin, V. (2014). Prolactin-induced prostate tumorigenesis links sustained stat5 signaling with the amplification of basal/stem cells and emergence of putative luminal progenitors. *American Journal of Pathology*, *184*(11), 3105–3119. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.07.020>
- Sahai Srivastava, B. ., & Minowada, J. (1973). Terminal deoxynucleotidyl transferase activity in a cell line (Molt-4) derived from the peripheral blood of a patient with acute lymphoblastic leukemia. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *51*(3), 529–535. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(73\)91346-6](https://doi.org/10.1016/0006-291X(73)91346-6)
- Sangeeta Devi, Y., & Halperin, J. (2014). Reproductive actions of prolactin mediated through short and long receptor isoforms. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *382*(1), 400–410. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.09.016>
- Sarry, J., Murphy, K., Perry, R., Sanchez, P. V., Secreto, A., Keefer, C., Swider, C. R., Strzelecki, A., Cavalier, C., Récher, C., Mas, V. M., Delabesse, E., & Carroll, M. (2011). Human acute myelogenous leukemia stem cells are rare and heterogeneous when assayed in NOD / SCID / IL2R γ c-deficient mice. *The Journal of Clinical Investigation*, *121*(1), 384–395. <https://doi.org/10.1172/JCI41495.384>
- Schmid, C., Schleuning, M., Schwerdtfeger, R., Hertenstein, B., Mischak-Weissinger, E., Bunjes, D., Harsdorf, S. V., Scheid, C., Holtick, U., Greinix, H., Keil, F., Schneider, B., Sandherr, M., Bug, G., Tischer, J., Ledderose, G., Hallek, M., Hiddemann, W., & Kolb, H. J. (2006). Long-term survival in refractory acute myeloid leukemia after sequential treatment with chemotherapy and reduced-intensity conditioning for allogeneic stem cell transplantation. *Blood*, *108*(3), 1092–1099. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-10-4165>

- Scotti, M. L., Langenheim, J. F., Tomblyn, S., Springs, A. E. B., & Chen, W. Y. (2008). Additive effects of a prolactin receptor antagonist, G129R, and herceptin on inhibition of HER2-overexpressing breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, *111*(2), 241–250. <https://doi.org/10.1007/s10549-007-9789-z>
- Sebolt-Leopold, J. S., Dudley, D. T., Herrera, R., Van Becelaere, K., Wiland, A., Gowan, R. C., Teclé, H., Barret, S. D., Bridges, A., Przybranowski, S., Leopold, W. R., & Saltiel, A. R. (1999). Blockade of the MAP kinase pathway suppresses growth of colon tumors in vivo. *Nature Medicine*, *5*(7), 810–816. <https://doi.org/10.1038/10533>
- Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D., & Lowe, S. W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16(INK4a). *Cell*, *88*(5), 593–602. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81902-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81902-9)
- Shallis, R. M., Wang, R., Davidoff, A., Ma, X., & Zeidan, A. M. (2019). Epidemiology of acute myeloid leukemia: Recent progress and enduring challenges. In *Blood Reviews* (Vol. 36, pp. 70–87). Churchill Livingstone. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2019.04.005>
- Shlush, L. I., Mitchell, A., Heisler, L., Abelson, S., Ng, S. W. K., Trotman-Grant, A., Medeiros, J. J. F., Rao-Bhatia, A., Jaciw-Zurakowsky, I., Marke, R., McLeod, J. L., Doedens, M., Bader, G., Voisin, V., Xu, C., McPherson, J. D., Hudson, T. J., Wang, J. C. Y., Minden, M. D., & Dick, J. E. (2017). Tracing the origins of relapse in acute myeloid leukaemia to stem cells. *Nature*, *547*(7661), 104–108. <https://doi.org/10.1038/nature22993>
- Short, N. J., Konopleva, M., Kadia, T. M., Borthakur, G., Ravandi, F., DiNardo, C. D., & Daver, N. (2020). Advances in the treatment of acute myeloid leukemia: New drugs and new challenges. *Cancer Discovery*, *10*(4), 506–525. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-1011>
- Short, N. J., & Ravandi, F. (2016). Acute Myeloid Leukemia: Past, Present, and Prospects for the Future. In *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia* (Vol. 16, pp. S25–S29). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.clml.2016.02.007>
- Shuai, K. (2006). Regulation of cytokine signaling pathways by PIAS proteins. *Cell Research*, *16*(2), 196–202. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7310027>
- Sinha, Y. N. (1995). Structural variants of prolactin: Occurrence and physiological significance. *Endocrine Reviews*, *16*(3), 354–369. <https://doi.org/10.1210/edrv-16-3-354>
- Soto-Pedre, E., Newey, P. J., Bevan, J. S., & Leese, G. P. (2017). Morbidity and mortality in patients with hyperprolactinaemia: The PROLEARs study. *Endocrine Connections*, *6*(8), 580–588. <https://doi.org/10.1530/EC-17-0171>
- Spiekermann, K., Biethahn, S., Wilde, S., Hiddemann, W., & Alves, F. (2001). Constitutive activation of STAT transcription factors in acute myelogenous

- leukemia. *European Journal of Haematology*, 67(2), 63–71.
<https://doi.org/10.1034/j.1600-0609.2001.t01-1-00385.x>
- Stattin, P., Rinaldi, S., Stenman, U. H., Riboli, E., Hallmans, G., Bergh, A., & Kaaks, R. (2001). Plasma prolactin and prostate cancer risk: A prospective study. *International Journal of Cancer*, 92(3), 463–465. <https://doi.org/10.1002/ijc.1191>
- Stegmaier, K., Ross, K. N., Colavito, S. A., O'Malley, S., Stockwell, B. R., & Golub, T. R. (2004). Gene expression-based high-throughput screening (GE-HTS) and application to leukemia differentiation. *Nature Genetics*, 36(3), 257–263.
<https://doi.org/10.1038/ng1305>
- Stein, H., Gerdes, L. J., Kirchner, H., Diehl, V., Schaadt, M., Bonk, A., & Steffen, T. (1981). Detection of a New Antigen and Evidence for Selective IgG Uptake in the Absence of B Cell, T Cell and Histiocytic Markers. *Journal of Cancer Research Clinical Oncology*, 101, 125–134.
- Steube, K. G., Teepe, D., Meyer, C., Zaborski, M., & Drexler, H. G. (1997). A model system in haematology and immunology: The human monocytic cell line MONO-MAC-1. *Leukemia Research*, 21(4), 327–335.
[https://doi.org/10.1016/S0145-2126\(96\)00129-4](https://doi.org/10.1016/S0145-2126(96)00129-4)
- Sutherland, A., Forsyth, A., Cong, Y., Grant, L., Juan, T. H., Lee, J. K., Klimowicz, A., Petrillo, S. K., Hu, J., Chan, A., Boutillon, F., Goffin, V., Egan, C., Tang, P. A., Cai, L., Morris, D., Magliocco, A., & Shemanko, C. S. (2016). The Role of Prolactin in Bone Metastasis and Breast Cancer Cell-Mediated Osteoclast Differentiation. *Journal of the National Cancer Institute*, 108(3), 1–11.
<https://doi.org/10.1093/jnci/djv338>
- Swaminathan, G., Varghese, B., & Fuchs, S. Y. (2008). Regulation of prolactin receptor levels and activity in breast cancer. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 13(1), 81–91. <https://doi.org/10.1007/s10911-008-9068-6>
- Takebe, N., Harris, P. J., Warren, R. Q., & Ivy, S. P. (2011). Targeting cancer stem cells by inhibiting Wnt, Notch, and Hedgehog pathways. In *Nature Reviews Clinical Oncology* (Vol. 8, Issue 2, pp. 97–106). Nat Rev Clin Oncol.
<https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2010.196>
- Tan, D., Huang, K. T., Ueda, E., & Walker, A. M. (2008). S2 deletion variants of human PRL receptors demonstrate that extracellular domain conformation can alter conformation of the intracellular signaling domain. *Biochemistry*, 47(1), 479–489. <https://doi.org/10.1021/bi7013882>
- Tavor, S., Petit, I., Porozov, S., Avigdor, A., Dar, A., Leider-Trejo, L., Shemtov, N., Deutsch, V., Naparstek, E., Nagler, A., & Lapidot, T. (2004). CXCR4 Regulates Migration and Development of Human Acute Myelogenous Leukemia Stem Cells in Transplanted NOD/SCID Mice. *Cancer Research*, 64(8), 2817–2824.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-3693>
- Teicher, B. A., & Fricker, S. P. (2010). CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clinical Cancer Research*, 16(11), 2927–2931.

<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-2329>

- Testa, U., Masciulli, R., Tritarelli, E., Pustorino, R., Mariani, G., Martucci, R., Barberi, T., Camagna, A., Valtieri, M., & Peschle, C. (1993). Transforming growth factor-beta potentiates vitamin D3-induced terminal monocytic differentiation of human leukemic cell lines. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *150*(6), 2418–24130. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8383719/>
- Thomas, D., & Majeti, R. (2017). Biology and relevance of human acute myeloid leukemia stem cells. *Blood*, *129*(12), 1577–1586. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-10-696054>.
- Thomas, L. N., Morehouse, T. J., & Too, C. K. L. (2012). Testosterone and prolactin increase carboxypeptidase-D and nitric oxide levels to promote survival of prostate cancer cells. *Prostate*, *72*(4), 450–460. <https://doi.org/10.1002/PROS.21446>
- Till, J. E., McCulloch, E. A., & Siminovitch, L. (1964). a Stochastic Model of Stem Cell Proliferation, Based on the Growth of. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States Of*, *51*, 29–36. <https://doi.org/10.1073/pnas.51.1.29>
- Toso, A., Revandkar, A., DiMitre, D., Guccini, I., Proietti, M., Sarti, M., Pinton, S., Zhang, J., Kalathur, M., Civenni, G., Jarrossay, D., Montani, E., Marini, C., Garcia-Escudero, R., Scanziani, E., Grassi, F., Pandolfi, P. P., Catapano, C. V., & Alimonti, A. (2014). Enhancing chemotherapy efficacy in pten-deficient prostate tumors by activating the senescence-associated antitumor immunity. *Cell Reports*, *9*(1), 75–89. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.08.044>
- Ueda, E., Ozerdem, U., Chen, Y. H., Yao, M., Kuang, T. H., Sun, H., Martins-Green, M., Bartolini, P., & Walker, A. M. (2006). A molecular mimic demonstrates that phosphorylated human prolactin is a potent anti-angiogenic hormone. *Endocrine-Related Cancer*, *13*(1), 95–111. <https://doi.org/10.1677/erc.1.01076>
- Utama, F. E., Tran, T. H., Ryder, A., Lebaron, M. J., Parlow, A. F., & Rui, H. (2009). Insensitivity of Human Prolactin Receptors to Nonhuman Prolactins: Relevance for Experimental Modeling of Prolactin Receptor-Expressing Human Cells. *Endocrinology*, *150*(4), 1782–1790. <https://doi.org/10.1210/en.2008-1057>
- Vosberg, S., & Greif, P. A. (2019). Clonal evolution of acute myeloid leukemia from diagnosis to relapse. *Genes Chromosomes and Cancer*, *58*(12), 839–849. <https://doi.org/10.1002/gcc.22806>
- Walker, A. M. (2007). S179D prolactin: Antagonistic agony! In *Molecular and Cellular Endocrinology* (Vol. 276, Issues 1–2, pp. 1–9). Mol Cell Endocrinol. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2007.06.001>
- Wang, J. C. Y., & Dick, J. E. (2005). Cancer stem cells: Lessons from leukemia. *Trends in Cell Biology*, *15*(9), 494–501. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2005.07.004>

- Weiss, A., Wiskocil, R. L., & Stobo, J. D. (1984). The role of T3 surface molecules in the activation of human T cells: a two-stimulus requirement for IL 2 production reflects events occurring at a pre-translational level. *Journal of Immunology*, *133*(1), 123–128. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6327821>
- Welsch, C. W., & Nagasawa, H. (1976). Prolactin and Murine Mammary Tumorigenesis: A Review. *Cancer Research*, *37*(4), 951–963.
- Wen, Y., Zand, B., Ozpolat, B., Szczepanski, M. J., Lu, C., Yuca, E., Carroll, A. R., Alpay, N., Bartholomeusz, C., Tekedereli, I., Kang, Y., Rupaimoole, R., Pecot, C. V., Dalton, H. J., Hernandez, A., Lokshin, A., Lutgendorf, S. K., Liu, J., Hittelman, W. N., ... Sood, A. K. (2014). Antagonism of tumoral prolactin receptor promotes autophagy related cell death. *Cell Reports*, *7*(2), 488–500. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.03.009>.Antagonism
- Wingelhofer, B., Maurer, B., Heyes, E. C., Cumaraswamy, A. A., Berger-Becvar, A., De Araujo, E. D., Orlova, A., Freund, P., Ruge, F., Park, J., Tin, G., Ahmar, S., Lardeau, C. H., Sadovnik, I., Bajusz, D., Keseru, G. M., Grebien, F., Kubicek, S., Valent, P., ... Moriggl, R. (2018). Pharmacologic inhibition of STAT5 in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, *32*(5), 1135–1146. <https://doi.org/10.1038/s41375-017-0005-9>
- Winters, A. C., & Bernt, K. M. (2017). MLL-rearranged leukemias- An update on science and clinical approaches. *Frontiers in Pediatrics*, *5*(February), 11–13. <https://doi.org/10.3389/fped.2017.00004>
- Yates, J. W., Wallace, H. J., Ellison, R. R., & Holland, J. F. (1973). Cytosine arabinoside (NSC 63878) and daunorubicin (NSC 83142) therapy in acute nonlymphocytic leukemia. *Cancer Chemother. Rep.*, *57*(4), 485–488. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4586956/>
- Yonezawa, T., Chen, K. H., Ghosh, M. K., Rivera, L., Dill, R., Ma, L., Villa, P. A., Kawaminami, M., & Walker, A. M. (2015). Anti-metastatic outcome of isoform-specific prolactin receptor targeting in breast cancer. *Cancer Letters*, *366*(1), 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.06.010>
- Zhang, J., Gu, Y., & Chen, B. (2019). Mechanisms of drug resistance in acute myeloid leukemia. *OncoTargets and Therapy*, *12*, 1937–1945. <https://doi.org/10.2147/OTT.S191621>
- Zhao, W., Jaganathan, S., & Turkson, J. (2010). A cell-permeable Stat3 SH2 domain mimetic inhibits Stat3 activation and induces antitumor cell effects in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(46), 35855–35865. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.154088>

8. Anexos

I. Tabla de pacientes de LMA

La **Tabla 11** muestra la tabla de las características de los pacientes de donde proceden las muestras primarias de LMA incluidas en este trabajo.

LMA	Proc. muestra	Sexo	Edad (años)	Subtipo OMS	BSP (%)	BMO (%)	Cariotipo	Alteraciones moleculares	Riesgo	QR
#1	MO	M	49	LMA con cambios relacionados con mielodisplasia	42	26	46-47,XY,del(5)(q22q34),del(6)(q22q25),del(7)(q22q23),-8,-9,add(11)(q23),+i(11)(q11),-16,+mar1,+mar2,+mar3[cp8]	Ninguna detectada	Adv	Sí
#2	SP	M	64	LMA sin maduración	1	35	46,XY[20]	Ninguna detectada	Int	No
#3	N/D	F	45	LMA relacionada con tratamiento	22	44	46,XX[20]	Ninguna detectada	Int	No
#4	SP	F	51	LMA con mutación en NPM1	26	63	N/D	NPM1 mut	Fav	No
#5	N/D	M	61	LMA con mutación en NPM1	33	72	46,XY[20]	NPM1 mut, DNMT3A mut	Fav	Sí
#6	N/D	M	51	LMA con cambios relacionados con mielodisplasia	88	93	46,XY,-5,+mar1[4]/46,XY,-5,+mar2[4]	Ninguna detectada	Adv	Sí

#7	N/D	F	54	LMA con cambios relacionados con mielodisplasia	47	83	48,XX,+add(13)(q34),+add(13)(q34)[8]/46,XX[5]	Ninguna detectada	Int	Sí
#8	LA	F	44	LMA con mutación en NPM1	76	80	N/D	NPM1 mut	Fav	No
#9	LA	F	67	Leucemia aguda de fenotipo mixto T/mieloide	53	30	46,XX[21]	Ninguna detectada	Adv	Sí
#10	SP	F	80	LMA con mutación en NPM1	53	95	46,XX[20]	FLT3-ITD, NPM1 mut	Int	No
#11	MO	M	41	LMA con t(3;3)(q21;q26)	57	73	46,XY,t(3;3)(q21;q26)[1]/45,X,-Y,t(3;3)(q21;q26)[19]	Ninguna detectada	Adv	Sí
#12	MO	M	45	N/D	N/D	0	46,XY[20]	FLT3-ITD	Adv	No
#13	MO	M	71	LMA con mutación en NPM1	0	3	Normal	NPM1 mut	Fav	No
#14	MO	M	27	N/D	0	2	46,XY[20]	Ninguna detectada	Int	No
#15	MO	M	27	LMA con cambios relacionados con mielodisplasia	3	34	46,XY[37]	FLT3-ITD	Int	No

#16	SP	M	69	LMA con cambios relacionados con mielodisplasia	23	3	43,XY,-4,add(4)(q?35),del(5)(q13q33),-7,der(12)t(12;?14)(p?12;q?12),-14,-15,del(20)(q11q13),-21,+mar1,+mar2[22]	Ninguna detectada	Adv	N/D
#17	MO	F	45	LMA con cambios relacionados con mielodisplasia	0	20	46,XX[20]	Ninguna detectada	Int	No
#18	MO	F	82	LMA con mutación en NPM1	79	83	46,XX,der(12)t(1;12)(q21;q24.3)[4] / 46,XX[12]	NPM1 mut	Fav	Sí
#19	MO	M	78	N/D	0	0	Normal	Ninguna detectada	Int	No
#20	MO	M	73	N/D	0	27	Complejo	Ninguna detectada	Adv	No
#21	MO	M	70	N/D	0	5	2/5/16: 46,XY[20]	Ninguna detectada	Int	No
#22	MO	M	78	N/D	0	0	Normal	Ninguna detectada	Int	No
#23	MO	M	27	N/D	0	6	46,XY[20]	Ninguna detectada	Int	No
#24	MO	M	47	APL con PML-RARA	71	0	46, XY[20]	N/D	Int	No
#25	MO	M	71	LMA con mutación en NPM1	N/D	0	Normal	NPM1 mut	Fav	No

#26	MO	M	68	LMA con cambios relacionados con mielodisplasia	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
#27	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
#28	SP	M	75	N/D	N/D	98	46,XY,inv(3)(p25q21),del(11)(p11.1p15)[cp14]	Ninguna detectada	N/D	N/D
#29	MO	M	64	LMA con mutación en NPM1	56	78	46, XY[20]	NPM1 mut	Fav	No
#30	SP	F	47	LMA con inv(3)(q21.3q26.2); GATA2, MECOM	3	23	46,XX,inv(3)(q21q26.2)[17]/46,XX[30]	Ninguna detectada	Adv	Sí
#31	MO	F	90	LMA con cambios relacionados con mielodisplasia	92	77	42,XX,del(5)(q22q34),del(7)(q22q32),add(8)(q24),-15,-16,add(17)(p13),-18,-19,-20,-21,-22,-22,+r(?),+mar[cp18]*	TP53 mut	Adv	N/D
#32	SP	F	90	LMA con cambios relacionados con mielodisplasia	92	77	42,XX,del(5)(q22q34),del(7)(q22q32),add(8)(q24),-15,-16,add(17)(p13),-18,-19,-20,-21,-22,-22,+r(?),+mar[cp18]*	TP53 mut	Adv	N/D

#33	LA	F	63	LMA con mutación en NPM1	100	94	N/D	FLT3-ITD, DNMT3A mut, IDH2mut	Int	No
#34	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
#35	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
#36	SP	F	64	LMA sin diferenciación	48	73	46,XX[30]	MLL-PTD, IDH2 mut, DNMT3A mut	Adv	No
#37	SP	F	69	LMA con mutación en NPM1	68	66	47,XX,+8[20]	NRAS mut, RUNX1 mut, CEBPA mut	Adv	No
#38	MO	M	62	LMA con inv(3)(q21.3q26.2); GATA2, MECOM	18	61	46,XY,inv(3)(q21q26.2)[8]/46,XY[20]	DNMT3A mut, IDH1 mut	Adv	No
#39	SP	F	77	LMA con mutación en NPM1	95	85	N/D	FLT3-ITD, TET2 mut	Int	N/D
#40	SP	M	62	LMA con mutación en RUNX1	49	81	6,XY,del(7)(?) [19]/46,XY[1]	Ninguna detectada	Adv	No
#41	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D		N/D

#42	SP	M	63	LMA con cambios relacionados con mielodisplasia	43	30	N/D	TP53 mut	Adv	Sí
#43	MO	M	27	N/D	0	1	46,XY[20]	Ausencia de BCR/ABL	Int	No
#44	MO	M	57	N/D	43	33	46,XY [5]	Ninguna detectada	Int	No
#45	MO	M	71	LMA con mutación en NPM1	N/D	1	Normal	NPM1 mut	Fav	No
#46	MO	M	73	N/D	0	27	Complejo	Ninguna detectada	Adv	No
#47	MO	M	43	N/D	29	6	46,XY[30]	Ninguna detectada	Int	Sí
#48	MO	M	78	LMA con cambios relacionados con mielodisplasia	0	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
#49	LA	M	47	LMA con mutación en NPM1	23	48	Normal	DNMT3A mut, IDH2 mut, TP53 mut	Adv	No
#50	LA	M	40	LMA con mutación en NPM1	96	93	N/D	IDH1 mut, NPM1 mut, FLT3-ITD	Adv	N/D

#51	LA	M	37	LMA con inv(16)(p13.1q22); CBFβ-MYH11	98	91	47,XY,+9,inv(16)(p13;q22),der(17)t(11;17)(q13;q25)[10]	CEBPA mut, FLT3 mut, WT1 mut	Fav	No
#52	LA	F	21	LMA con t(10;11) y modificaciones en KMT2A	98	98	46,XX,t(1;20;11')(p36q21;q11.2;q23),t(10;11)(q13;q23)(p12;q13)[20]	N/D	Adv	No
#53	LA	M	65	LMA con mutación en NPM1	62	80	46,XY[20]	NPM1 mut, FLT3-ITD	Fav	No
#54	SP	M	71	LMA con mutación en NPM1	86	84	N/D	NPM1 mut, FLT3-ITD	Int	N/D
#55	SP	M	55	LMA con mutación en NPM1	85	76	46,XY[20]	NPM1 mut, IDH1 mut, DNMT3A mut, TET2 mut, PTPN11 mut	Fav	N/D
#56	SP	F	68	LMA con mutación en NPM1	54	66	46,XY[20]	NPM1 mut, DNMT3A mut, FLT3-TKD, IDH1 mut, NRAS mut	Fav	No
#57	SP+MO	F	74	LMA bialélica con CEBPA	20	23	46,XX[20]	CEBPA (x2), TET2 (x2)	Fav	No

#58	SP	F	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
#59	SP	M	84	LMA con cambios relacionados con mielodisplasia	84	66	46,XY,del(20)(q11q13)[5]/48,XY,+8,del(20)(q11q13),+21[15]	JAK2 mut, IDH2 mut, SRSF2 mut, ETV6-MN1 mut	Int	N/D
#60	SP + MO	M	72	LMA con mutación en NPM1	16	38	46,XY[20]	NPM1 mut, FLT3-ITD, IDH2 mut, RUNX1 mut, WT1 mut, IDH1 mut, DNMT3A mut	Fav	N/D
#61	LA	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D

Tabla 11. Relación de pacientes de LMA incluidos en los estudios. Clasificación hecha según la clasificación de la OMS (Arber et al., 2016) y según el riesgo citogenético en función de las recomendaciones del 2017 (Döhner et al., 2017). Abreviaturas. Proc. muestra: procedencia de la muestra; BSP (%): porcentaje de blastos en sangre periférica; BMO (%): porcentaje de blastos en médula ósea; QR: quimiorrefratariedad; MO: médula ósea; SP: sangre periférica; LA: leucoaféresis terapéutica; M: masculino; F: femenino; Adv: adverso; Int: intermedio; Fav: favorable; N/D: sin datos.

II. Tabla de pacientes de SMD

La **Tabla 12** recoge la información de las muestras primarias procedentes de pacientes con SMD incluidas en este trabajo.

SMD	Edad (años)	Sexo	Subtipo OMS	Cariotipo	IPSS-R	BMO (%)
#1	75	M	SMD-DM	46,XY[20]	Bajo	0
#2	83	M	SMD-EB-1	47,XY,+8[3]/46,XY[28]	Alto	7
#3	46	F	SMD-SA	46,XX[20]	Bajo	2
#4	70	F	SMD-SA	46,XX[20]	Intermedio	4
#5	74	M	SMD-EB-2	45,X,-Y,del(1)(p13p32),der(11)t(Y;11)(q11;q13)[8]/46,XY[12]	Muy alto	12
#6	75	M	SMD-DM	46,XY[20]	Bajo	0
#7	73	F	SMD del(5q)	46,XX,del(5)(q22q33)[15]/46,XX[5]	Bajo	2
#8	51	M	SMD-DM	N/A (normal FISH 5p15.2, 5q31, 7q31 & 20q12)	N/A	2
#9	71	F	N/D	46 XX,-11,+mar [20]	Intermedio	3
#10	29	F	SMD del(5q)	46,XX,del(5)(q12q32)[11]/46,XX[9]	N/D	N/D
#11	81	F	SMD-DM	46,XX[10]	Bajo	0
#12	59	F	SMD del(5q)	46,XX,del(5)(q13q33)[4]/46,XX[15]	Bajo	2
#13	65	M	SMD-DM-SA	46,XY[20]	Muy bajo	2
#14	86	F	SMD-DM	47,XX,+8[10]/48,idem,+mar[2]/46,XX[7]	Alto	3
#15	65	M	SMD-DM-SA	46,XY[20]	Muy bajo	2
#16	64	M	SMD del(5q)	46,XX,del(5)(q14q34)[5]/46,XX[15]	Muy bajo	1
#17	78	M	SMD del(5q)	46,XY,del(5)(q13q33)[12]/46,XY[8]	Muy bajo	2
#18	77	M	SMD-EB-2	Pérdida 3p, delección 5, pérdida 17p. Inv(9) constitucional	Muy alto	>5%
#19	67	M	SMD-DM	46,XY[20]	Bajo	4
#20	83	M	SMD-DU-SA	46,X,-Y,+8[1]/45,X,-Y[5]/46,XY[13]	Intermedio	1
#21	60	F	SMD-DM-SA	46,XX[20]	Muy bajo	1
#22	91	F	SMD-EB-1	45,X,-Y[14]/46,XY[6]	Alto	7
#23	67	M	SMD-EB-2	43,XY,-5,der(13;14)(q10;q10),add(15)(p10),add(16)(q24),-17,add(17)(p13),-18,+mar[cp14]	Muy alto	15
#25	79	M	SMD-EB-1	46,XY[21]	Alto	5
#26	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D

#27	94	F	SMD del(5q)	46,XX,del(5)(q13q33)[9]/46,XX X[24]	Muy bajo	1
#28	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
#29	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
#30	68	F	SMD-DM	46,XX[20]	Muy bajo	0
#31	83	M	SMD-DM	45,X,-Y[18]/46,XY[2]	Najo	3
#32	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
#33	58	M	SMD-DU	46,XY,inv(2)(p23q13),del(5)(q1 3q32)	Bajo	1
#34	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
#35	68	F	SMD-DM	46,XX,del(9)(q22)[11]/46,XX[2]	Intermedio	0
#36	75	F	SMD-DM	46,XX,-5,- 14,+mar1,+mar2[16]/45,XX,d el(5)(q13q33),-6[2]/46,XX[8]	Alto	1
#37	83	F	SMD-EB-1	del(7)(q22q31)	Muy alto	5
#38	30	F	SMD-DM	46,XX[20]	Muy bajo	2
#39	66	M	SMD-EB-1	47,XY,+8[2]/46,XY[3]	Intermedio	5

Tabla 12. Relación de pacientes de SMD incluidos en los estudios. Clasificación hecha según el criterio de la OMS de 2016 (Arber et al., 2016) y riesgo según el sistema IPSS-R (Greenberg et al., 2012). Abreviaturas: BMO (%): porcentaje de blastos en médula ósea; IPSS-R: sistema revisado de puntuación de pronóstico (Revised international prognostic scoring system); M: masculino; F: femenino; SMD-DM: SMD con displasia multilinea; SMD-EB-1: SMD con exceso de blastos 1; SMD-SA: SMD con sideroblastos en anillo; SMD-EB-2: SMD con exceso de blastos 2; SMD del(5q): SMD con deleción en 5q aislada; SMD-DM-SA: SMD con displasia multilinea y sideroblastos en anillo; SMD-DU-SA: SMD con displasia unilínea y sideroblastos en anillo; SMD-DU: SMD con displasia unilínea.

III. Publicaciones

1. Cornet-Masana JM, Banús-Mulet A, Carbó JM, Torrente MA, Guijarro F, **Cuesta-Casanovas L**, Esteve J, Risueño RM. *Dual lysosomal-mitochondrial targeting by antihistamines to eradicate leukaemic cells*. EBioMedicine. 2019 Sep; 47:221-234.
2. Cornet-Masana JM, Banús-Mulet A, **Cuesta-Casanovas L**, Carbó JM, Guijarro F, Torrente MA, Esteve J, Risueño RM. *Histamine receptor 1 is expressed in leukaemic cells and affects differentiation sensitivity*. J Cell Mol Med. 2020 Nov; 24(22):13536-13541.
3. Risueño RM, **Cuesta-Casanovas L**, Carbó JM, Cornet-Masana JM. *New therapeutic approaches for acute myeloid leukaemia*. EMJ. 2021 Jun; 6(2):82-89.
4. **Cuesta-Casanovas L**, Delgado-Martínez J, Cornet-Masana JM, Carbó JM, Clément-Demange L, Risueño RM. *Lysosome-mediated chemoresistance in Acute Myeloid Leukemia*. *Cancer Drug Resistance*. Under review in *Cancer Drug Resistance*. 2021.

Dual lysosomal-mitochondrial targeting by antihistamines to eradicate leukaemic cells

EBioMedicine. 2019 Sep; 47:221-234. Doi: 10.1016/j.ebiom.2019.08.021.

Epub 2019 Aug 28.

Cornet-Masana JM, Banús-Mulet A, Carbó JM, Torrente MA, Guijarro F, Cuesta-Casanovas L, Esteve J, Risueño RM.

Abstract

Background: Despite great efforts to identify druggable molecular targets for AML, there remains an unmet need for more effective therapies.

Methods: An *in silico* screening was performed using Connectivity Maps to identify FDA-approved drugs that may revert an early leukaemic transformation gene signature. Hit compounds were validated in AML cell lines. Cytotoxic effects were assessed both in primary AML patient samples and healthy donor blood cells. Xenotransplantation assays were undertaken to determine the effect on engraftment of hit compounds. The mechanism of action responsible for the antileukaemic effect was studied focussing on lysosomes and mitochondria.

Findings: We identified a group of antihistamines (termed ANHAs) with distinct physicochemical properties associated with their cationic-amphiphilic nature, that selectively killed leukaemic cells. ANHAs behaved as antileukaemic agents against primary AML samples *ex vivo*, sparing healthy cells. Moreover, ANHAs severely impaired the *in vivo* leukaemia regeneration capacity. ANHAs' cytotoxicity relied on simultaneous mitochondrial and lysosomal disruption and induction of autophagy and apoptosis. The pharmacological effect was exerted based on their physicochemical properties that permitted the passive targeting of both organelles, without the involvement of active molecular recognition.

Interpretation: Dual targeting of lysosomes and mitochondria constitutes a new promising therapeutic approach for leukaemia treatment, supporting the further clinical development. **FUND:** This work was funded by the Fundación Mutua Madrileña (RMR), CaixaImpulse (RMR), the Spanish Ministry of Economy (RMR), the Josep Carreras International Leukaemia Foundation (RMR), l'Obra Social "La Caixa" (RMR), and Generalitat de Catalunya (IJC).

EBioMedicine 47 (2019) 221–234



Contents lists available at ScienceDirect

EBioMedicine

journal homepage: www.ebiomedicine.com

EBioMedicine
Published by THE LANCET

Research paper

Dual lysosomal-mitochondrial targeting by antihistamines to eradicate leukaemic cells



Josep M. Cornet-Masana ^{a,b,c}, Antònia Banús-Mulet ^{a,d}, José M. Carbó ^a, Miguel Ángel Torrente ^{c,e}, Francesca Guijarro ^{c,e,f}, Laia Cuesta-Casanovas ^{a,g}, Jordi Esteve ^{a,c,e,f}, Ruth M. Risueño ^{a,*}

Histamine receptor 1 is expressed in leukaemic cells and affects differentiation sensitivity

Journal of Cellular and Molecular Medicine. 2020 Nov;24(22):13536-13541. doi: 10.1111/jcmm.15930.
Epub 2020 Oct 20.

Cornet-Masana JM, Banús-Mulet A, Cuesta-Casanovas L, Carbó JM, Guijarro F, Torrente MA, Esteve J, Risueño RM.

Abstract

Despite the success of immunotherapy in several haematological neoplasms, the effectiveness in acute myeloid leukaemia (AML) is still controversial, partially due to the lack of knowledge regarding immune-related processes in this disease and similar neoplasias. In this study, we analysed the role and expression of histamine receptor 1 (HRH1) in haematological malignancies. Although the histamine receptor type 1 was widely expressed in healthy and malignant haematopoiesis, especially along the myeloid lineage, HRH1 lacked a relevant role in survival/proliferation and chemoresistance of AML cells, as analysed by HRH1 knockdown (KD) and pharmacological modulation. However, HRH1-mediated signalling was critical for the activation of the differentiation process induced by several agents including all-trans retinoic acid, establishing a role for HRH1 in myeloid differentiation. Pharmacological activation of Erk was able to partially restore differentiation capacity in HRH1 KD AML cells, suggesting that HRH1 signalling acts upstream MAPK-Erk pathway. As an indirect consequence of our results, treatment-related histamine release is not expected to confer a proliferative advantage in leukaemic cells.

Journal of Cellular and Molecular Medicine

Open Access

SHORT COMMUNICATION |  Open Access |  

Histamine receptor 1 is expressed in leukaemic cells and affects differentiation sensitivity

Josep M. Cornet-Masana, Antònia Banús-Mulet, Laia Cuesta-Casanovas, José M. Carbó, Francesca Guijarro, Miguel Ángel Torrente, Jordi Esteve, Ruth M. Risueño  ... See fewer authors 

New therapeutic approaches for acute myeloid leukaemia

European Medical Journal. 2021Jun;6(2):82-89.

Risueño RM, Cuesta-Casanovas L, Carbó JM, Cornet-Masana JM.

Abstract

Acute myeloid leukaemia (AML) is a genetically heterogeneous haematopoietic neoplasm characterised by the accumulation of transformed immature blood progenitors in bone marrow. Since 1973, the backbone treatment has relied on the combination of cytarabine and an anthracycline, followed by allogeneic haematopoietic transplant if eligible. Therefore, the treatment decisions have largely revolved around chemotherapy drug intensity. Despite advances in our understanding of the underlying biology over the past decades, AML remains a therapeutic challenge as the overall survival is poor and treatment options are limited for relapsed/refractory AML or for unfit patients. After four decades without substantial changes, eight new noncytostatic drugs have been granted approval: vyxeos, enasidenib, gilteritinib, glasdegib, gemtuzumab ozogamicin, ivosidenib, midostaurin, and venetoclax. Despite promising preliminary results, some indications are based on early efficacy data, obtained in single-arm nonrandomised trials, highlighting the necessity for further validation in extended clinical trials. Interestingly, several druggable targets have been identified recently, associated with specific target-directed drugs. Based on the preclinical data available, great impact on clinical outcomes for patients with AML is expected, potentially increasing the therapeutic landscape for this disease.

EMJ

New Therapeutic Approaches for Acute Myeloid Leukaemia

Authors:

*Ruth M. Risueño,¹ Laia Cuesta-Casanovas,^{1,2} José M. Carbó,¹ Josep M. Cornet-Masana,¹

Lysosome-mediated chemoresistance in Acute Myeloid Leukemia. Cancer Drug Resistance

Cancer Drug Resistance, Under Review (2021)

Cuesta-Casanovas L, Delgado-Martínez J, Cornet-Masana JM, Carbó JM, Clément-Demange L, Risueño RM.

Abstract

Despite the outstanding advances in understanding the biology underlying the AML pathophysiology and the promising preclinical data published lastly, AML treatment still relies in a classic chemotherapy regimen largely unchanged for the past 5 decades. Recently, new drugs have been approved for AML but the real clinical benefit is still under evaluation. Nevertheless, primary refractory and relapse AML continue to represent the main clinical challenge, as the majority of AML patients will succumb to the disease despite achieving a complete remission during the induction phase. As such, chemoresistance represents an unmet need in this disease. Although great efforts have been made to decipher the biological basis for leukemogenesis, understanding the mechanism by which AML cells become resistant to chemotherapy is largely unknown. The identification of the signaling pathways involved in resistance may lead to new combinatory therapies or new therapeutic approaches suitable for this subset of patients. Several mechanisms of chemoresistance have been identified, including drug transporters, key secondary messengers and metabolic regulators. However, any therapeutic approach targeting chemoresistance has succeeded in clinical trial, especially due to broad secondary effects in healthy cells. Recent research has highlighted the importance of lysosomes in this phenomenon. Lysosomes' key role in resistance to chemotherapy includes the potential to sequester drugs, the central metabolic signaling role and the gene expression regulation. These results provide further evidence to support the develop of new therapeutic approaches that target lysosomes in AML.

