



Differentiation therapy: development of a new drug discovery platform

Title in Spanish: *Terapia de diferenciación: desarrollo de una nueva plataforma de descubrimiento de fármacos*

Ruth M. Risueño^{1,*}

¹Josep Carreras Leukaemia Research Institute. Campus Clínic-UB. Barcelona, España.

ABSTRACT: Most of the tumors are hierarchically organized, with a cellular subpopulation of cancer stem cells in the apex. This population is responsible for the initiation and maintenance of the tumor. Due to their “stem cell”-like properties, cancer stem cells display self-renewal and differentiation potential, both properties are tightly regulated. Thus, direct inhibition of self-renewal or induction of terminal differentiation will eradicate cancer stem cells and, thus, the maintenance and regeneration capacity of the neoplasia will be eliminated. Two distinct drug discovery platforms were developed to identify small bioactive compounds that induce terminal differentiation of cancer stem cells. These platforms are based on high-throughput and high-content screenings using a transformed embryonic stem cell system and an *in silico* bioinformatics analysis. Using acute myeloid leukemia as a hierarchically organized tumor model, these compounds were studied *ex vivo* and *in vivo* and optimized for clinical settings. These platforms have been validated as a new experimental approach to identify differentiating-inducing drugs as anti-neoplastic compounds.

RESUMEN: La mayor parte de los tumores están estructurados jerárquicamente, siendo la población de células madre del cáncer la encargada de iniciar y mantener el tumor. Estas células madre del cáncer, debido a sus similitudes con las células madre sanas, tienen capacidad de auto-renovación y diferenciación. Existe un balance altamente regulado que controla ambos procesos. De forma que la eliminación de la auto-renovación directamente o la inducción terminal de diferenciación producen la eliminación de las células madre del cáncer y, por lo tanto, la capacidad de mantenimiento y regeneración de la neoplasia. El desarrollo de dos plataformas distintas para buscar compuestos de pequeño tamaño bioactivos que induzcan la diferenciación terminal de las células madre del cáncer ha permitido identificar distintos fármacos con potencial acción neoplásica. Estas plataformas están basadas en cribados de alto rendimiento y alto contenido usando un sistema de células madre embrionarias transformadas y un análisis bioinformático *in silico*. Usando la leucemia mieloide aguda como modelo de tumor jerárquico, estos compuestos se estudiaron *ex vivo* y *in vivo* y se han optimizado para su evaluación clínica. Estas plataformas de descubrimiento de fármacos se han validado como una nueva aproximación experimental para identificar nuevos fármacos con actividad diferenciadora anti-tumoral.

*Corresponding Author: risueno@carrerasresearch.org

Received: March 13, 2018 Accepted: March 20, 2018

Accésit del Premio Real Academia Nacional de Farmacia en el Concurso Científico 2017 de la RANF.

An Real Acad Farm Vol. 84, N° 2 (2018), pp. 154-163

Language of Manuscript: Spanish

1. HETEROGENEIDAD TUMORAL: MODELO ESTOCÁSTICO VS. MODELO JERÁRQUICO

La mayoría de los tumores están compuestos por una variedad de tipos celulares que presentan distintas características genéticas, epigenéticas y morfológicas. Los tumores son, por tanto, un grupo de células transformadas con distintos fenotipos y propiedades funcionales discretas. A nivel clínico, los tumores de distintos pacientes exhiben frecuentemente una heterogeneidad significativa en cuanto a morfología, marcadores de superficie, lesiones genéticas, tasa de proliferación celular y respuestas a terapia, entre otras. Por tanto, es necesario entender las bases moleculares y celulares de esta

heterogeneidad para diseñar aproximaciones terapéuticas efectivas y selectivas. Actualmente, la heterogeneidad tumoral puede ser explicada basada en dos grandes modelos: la hipótesis de células madre del cáncer (modelo jerárquico) y el modelo de evolución clonal (modelo estocástico).

Hasta los años 70, el campo fue dominado por el modelo de evolución clonal. En base a este modelo, se establece que cualquier célula dentro del tumor tiene el mismo potencial de adquirir secuencialmente los cambios genéticos y/o epigenéticos que les confieren las ventajas de crecimiento y generación de nuevos tumores (1, 2). Las diferencias intrínsecas dentro de las células tumorales

pueden ser causadas por cambios estocásticos tanto genéticos como epigenéticos adquiridos a lo largo del tiempo. La heterogeneidad también podría ser explicada por mecanismos extrínsecos en los que los distintos microambientes dentro del tumor pueden conferir diferencias fenotípicas y funcionales en las células tumorales dependiendo de la localización anatómica (3, 4). De acuerdo al modelo de evolución clonal, el cáncer se inicia en una célula individual que sufre un proceso mutacional al azar y múltiple, adquiriendo una ventaja de crecimiento selectiva sobre las células adyacentes normales. A medida que el cáncer progresa, la inestabilidad genética y la proliferación incontrolada permite la generación de células transformadas con alteraciones genéticas adicionales que pueden conferir comportamientos diversos. Alternativamente, las nuevas mutaciones pueden inducir una ventaja en supervivencia sobre las otras células tumorales que les permita resistir a terapias o ser insensibles a los estímulos apoptóticos (1). Por lo tanto, la progresión clonal es un proceso evolutivo que está dirigido por la selección darwiniana y expansión de subclones celulares más adaptados (5). Según este modelo, todas las células tumorales contribuyen al mantenimiento y regeneración del tumor aportando distintas capacidades. Este modelo está apoyado científicamente por evidencias histopatológicas de progresión de la enfermedad y metástasis (6-10), análisis genético a nivel de células individuales (11-17) y inmunofenotipo (18).

La evolución clonal ya empieza en una fase temprana de la enfermedad y los múltiples subclones son anteriores al diagnóstico. Estos subclones tienen diferentes propiedades de supervivencia, proliferación, resistencia a terapia y tumorigenicidad. Una vez la terapia ha empezado, aquellos subclones sensibles a los fármacos usados se erradicarán, originándose una selección farmacológica de los clones resistentes al tratamiento que podrán llegar a expandirse eventualmente y producir un episodio de recaída. Después de que la mayoría de los subclones son eliminados por la terapia, la evolución clonal y la competición entre los clones resistentes empieza de nuevo produciéndose una nueva mezcla heterogénea de clones que se parecen al tumor primario. Con cada ronda de tratamiento, los cuellos de botella durante el desarrollo son creados siguiendo un proceso de selección clonal que, finalmente, resulta en la selección de los subclones más agresivos y resistentes a los tratamientos. Siguiendo este modelo, una terapia solamente será efectiva si es capaz de eliminar todos los subclones dentro del tumor puesto que cualquiera de ellos puede eventualmente adquirir capacidad tumorigénica. Por lo tanto, los fármacos antineoplásicos deberían actuar sobre rutas de señalización específicas que están altamente conservadas en todos los procesos de transformación que sufren los distintos subclones que conforman el tumor.

El modelo de células madre del cáncer (CSCs, *cancer stem cell*), también denominado modelo jerárquico, propone que el crecimiento y progresión de los tumores

está dirigido por una subpoblación celular aislada de células madre del cáncer, siendo el tumor una caricatura del desarrollo tisular normal (19). Por tanto, las CSCs comparten con las células madre sanas su capacidad de auto-renovación y el potencial de diferenciación. Las CSCs no sólo se mantienen a sí mismas, sino que también se pueden diferenciar en células transformadas sin propiedades de CSCs que constituyen la mayoría de las células neoplásicas. La primera evidencia experimental de la existencia de una subpoblación de células neoplásicas se obtuvo en leucemia linfocítica, demostrando la capacidad de auto-renovación en un modelo de ratón *in vivo* (20). Posteriormente, se mostró que no todas las células neoplásicas aisladas de tumores humanos pueden regenerar el tumor en auto-trasplantes (21). El potencial de diferenciación de algunos subtipos celulares ha sido descrito en la mayoría de los tipos de cáncer, incluyendo cáncer de células germinales (22), neuroblastomas (23) y leucemias (24). El desarrollo de técnicas avanzadas de citometría de flujo hizo posible aislar fenotípicamente distintas poblaciones celulares vivas y comparar su potencial tumorigénico en modelos de xenotrasplante en ratón. Usando esta aproximación de aislamiento prospectivos de CSCs, se demostró que algunas leucemias mieloides agudas (LMA) (25, 26) y el cáncer de mama (27) siguen este modelo de CSCs, sugiriendo que la organización jerárquica de un tumor en subpoblaciones tumorigénicas y no tumorigénicas es general y similar a los tejidos sanos. En estos estudios, el porcentaje de células con capacidad de formar el tumor al ser trasplantadas en ratones inmunosuprimidos condicionados era muy bajo, pero podían obtenerse fracciones enriquecidas mediante aislamiento de poblaciones fenotípicas. Posteriormente, se evidenció que otros tumores sólidos como el cáncer de colon (28), cáncer pancreático (29), tumor cerebral (30) y cáncer de ovario (31). En todos estos casos, la capacidad de propagar la enfermedad estaba restringida en una subpoblación de células transformadas fenotípicamente única que podía generar todas las células tumorales que contenía el tumor del que proceden. Por tanto, los tumores que siguen el modelo de CSCs podrían ser más efectivamente tratados eliminando las CSCs para erradicar la capacidad de auto-renovación del tumor que, eventualmente, supondrá la eliminación de la capacidad de regeneración y mantenimiento de la neoplasia.

A pesar de las evidencias experimentales anteriormente descritas, el modelo jerárquico sigue siendo controvertido. La identificación de la población de CSCs no ha sido posible en todos los tipos tumorales. En algunos melanomas, virtualmente todas las células del tumor son capaces de regenerar la enfermedad en modelos de ratón, sugiriendo que todas las células del tumor tienen un comportamiento homogéneo (32, 33). Además, en otros tumores, la población sin características de CSCs puede adquirirlas dependiendo de las señales del microambiente, sugiriendo que la población de CSCs es plástica (34, 35).

Aunque estos dos modelos puedan parecer mutuamente

excluyentes, los datos actuales indicarían que ambos dos coexistirían. De hecho, se ha descrito la existencia de una diversidad genética dentro de la fracción de CSCs tanto al diagnóstico como durante la progresión de la enfermedad gracias a la combinación de los ensayos funcionales con análisis genéticos (13, 36-38). Es más, los subclones genéticamente diversos ya poseen agresividad diversa al tiempo de diagnóstico (36). Por lo tanto, estas evidencias experimentales sugieren que muchos tumores son mantenidos por una población de CSCs que puede sufrir una evolución clonal. Esta evolución clonal de la población de CSC hace que el aislamiento prospectivo de las CSCs sea complejo.

2. SISTEMA HEMATOPOYÉTICO – ANTECEDENTES HISTÓRICOS

De todos los tejidos de mamíferos, el sistema hematopoyético fue el primero y mejor caracterizado en términos de la organización jerárquica y diferenciación secuencial de cada una de las subpoblaciones celulares que lo componen. Mediante experimentos de trasplante en ratón, se demostró la existencia de precursores clonogénicos en la médula ósea con capacidad de expansión a largo plazo y diferenciación mielo-eritroide. Estos estudios permitieron la caracterización jerárquica progresiva de los distintos linajes celulares en base a su funcionalidad y fenotipo; y la identificación de las células madre hematopoyéticas (HSCs, *hematopoietic stem cells*). Todas las poblaciones de células madre se caracterizan por su capacidad de diferenciación (la habilidad de dar lugar a una progenie celular heterogénea, que progresivamente se amplifica, diversifica y se especializa siguiendo un proceso jerárquico) y auto-renovación (la habilidad de formar nuevas células madre idénticas, con el mismo potencial de proliferación, expansión y diferenciación) [revisado en (19)].

3. IDENTIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE LEUCÉMICAS

La leucemia mieloide aguda (LMA) es una neoplasia hematológica caracterizada por la rápida expansión de progenitores mieloides inmaduros en la médula ósea y la sangre (39). El curso de la enfermedad está marcado por las frecuentes recaídas, la alta mortalidad y la mala prognosis (40). El tratamiento actual, que no ha sufrido cambios significativos en las últimas décadas, comprende distintos ciclos de quimioterapia y la posibilidad de realización de un trasplante de progenitores hematopoyéticos. Más del 70 % de los pacientes de LMA conseguirán la remisión completa tras el tratamiento de inducción con quimioterapia (41). Sin embargo, la mayoría recaerán y sucumbirán a la enfermedad a los 5 años del diagnóstico (42). Es por ello, que la tasa de supervivencia de los pacientes de LMA no ha sufrido cambios dramáticos en los últimos años (43) y nuevas aproximaciones terapéuticas son necesarias en esta enfermedad (44).

El modelo jerárquico fue demostrado por primera vez en LMA. La primera evidencia directa de la existencia de

LSCs fue la identificación de una población minoritaria de células leucémicas capaces de recapitular la enfermedad humana en xenotransplantes en ratón (26). El grupo de Dick realizó experimentos pioneros para determinar si la jerarquía funcional observada en la hemopoyesis normal también se conservaba en los tumores sanguíneos. Estos estudios demostraron que en múltiples formas de LMA (salvo la leucemia promielocítica aguda), las células con capacidad de regeneración en ratones inmunosuprimidos estaban restringidas a una subpoblación definida por un fenotipo característico: CD34⁺CD38⁻, fenotipo compartido con la población de HSCs (25). De hecho, el análisis fenotípico de las células leucémicas de los ratones trasplantados revelaba la regeneración del fenotipo heterogéneo observado en el paciente, indicando que las LSCs mantenían el potencial de diferenciación. La habilidad para regenerar la LMA en trasplantes seriados demostraba la capacidad de auto-renovación de esta población. Estas observaciones constituyeron la primera prueba experimental de que, en una enfermedad neoplásica en humanos, las poblaciones de células tumorales estaban organizadas de acuerdo a una jerarquía funcional similar al sistema de células madre de los tejidos sanos.

El desarrollo de nuevas cepas de ratón con una mayor inmunodeficiencia y el empleo de nuevas vías de inyección permitió demostrar que la actividad LSC también reside en la población CD34⁺CD38⁺ de algunos pacientes (45), sugiriendo que el compartimento de LSC es heterogéneo. De hecho, se han descrito LSC CD34⁻ (46) y poblaciones de LSCs con plasticidad de linaje (47). En los últimos años, se han identificado varios marcadores de superficie asociados a LSCs como CD13, CD25, CD32, CD33, CD47, CD90, CD96, CD117, CD123, CLL-1 ó TIM3 (48). Sin embargo, y como ocurre con CD34 y CD38, el fenotipo de las LSCs no es uniforme ni entre pacientes ni en un solo paciente (48).

Hasta la fecha, los ensayos de xenotransplantes en ratones inmunodeficientes siguen siendo el método más sensible que soporta el crecimiento mayoritario de tumores. Aunque es posible que la capacidad de regeneración de una célula en un ratón condicionado trasplantado puede no reflejar fielmente el comportamiento en el paciente. Adicionalmente, pueden existir limitaciones inherentes al modelo de ratón como es la vida media limitada del ratón, la alteración del *homing* de CSCs, la falta de citoquinas o la ausencia de células inmunes. Para poder mejorar el conocimiento sobre la biología de las CSCs, es necesario desarrollar métodos de mayor precisión.

4. CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE LAS LSCS

Las LSCs se caracterizan por una capacidad ilimitada de auto-renovación. Evidencias experimentales han demostrado la primacía, en este proceso, de rutas de señalización imprescindibles durante el desarrollo y altamente conservadas como Bmi-1, Hox, Wnt, Hedgehog y Notch. Sin embargo, el grado de activación parece ser dependiente de contexto y oncogén, puesto que la

señalización mayoritaria que dirige el proceso de auto-renovación es diferente según las aberraciones genómicas presentes en la LSC. HSCs y LSCs también comparten los mecanismos responsables de la resistencia a estímulos apoptóticos, la prevalencia del estado quiescente y la resistencia a multidrogas. Aunque el mecanismo de auto-renovación y citoprotección es compartido, la actividad telomerasa está altamente reducida o ausente en LSCs. En HSCs, la actividad telomerasa contribuye al mantenimiento a largo plazo de la auto-renovación en un contexto altamente regulado. Sin embargo, la actividad telomerasa en LSCs aparece disminuida y, como consecuencia de ella, los telómeros son más cortos. De hecho, se ha hipotetizado que el acortamiento acelerado de los telómeros puede predisponer a padecer una LMA [revisado en (49)].

Recientemente, se ha propuesto que las LSCs pueden usar un mecanismo nuevo para evadir la inmunovigilancia basado en la expresión en superficie de CD47, una proteína de membrana reconocida por macrófagos y que inhibe la fagocitosis (50). De hecho, en pacientes con LMA, la expresión de CD47 se correlaciona negativamente con la respuesta a la quimioterapia convencional (51).

El perfil de expresión génica de las LSCs es distinto al del resto de células leucémicas del paciente. Sin embargo, conserva muchas similitudes con el patrón génico de las HSCs y progenitores tempranos hematopoyéticos (52, 53). Desafortunadamente, las firmas génicas de LSCs publicadas tienen una homología parcial, probablemente debido a diferencias en el método de aislamiento y a las variaciones entre pacientes (52-54).

Las LSCs migran a la médula ósea y residen en microambientes similares a los de las HSCs. Las células estromales con las que interactúan protegen de la apoptosis inducida por quimioterapéuticos, potencialmente mediante la inducción en LSCs de un estado de quiescencia. La interacción con el microambiente medular también es imprescindible para mantener el estado indiferenciado y la capacidad ilimitada de auto-renovación. La alteración de estas uniones supone la movilización de las LSCs y una reducción en su viabilidad (55).

5. EVIDENCIAS CLÍNICAS DE LA EXISTENCIA DE LAS LSCS

La presencia de LSCs así como la existencia de una firma génica en pacientes con LMA asociada a LSCs se ha relacionado tanto con enfermedad mínima residual como con un pronóstico adverso. El porcentaje de LSCs al diagnóstico está relacionada con la capacidad de regeneración de la LMA en ratones inmunosuprimidos, la agresividad de la enfermedad en humanos (56, 57) y la supervivencia libre de enfermedad (58, 59). De hecho, la cantidad relativa de LSCs en el momento del diagnóstico predice la respuesta al tratamiento quimioterapéutico convencional (59) y tiene valor pronóstico (57, 60). Además, la detección de LSCs residuales en muestras de

médula ósea en remisión predice la recaída en pacientes con LMA (59, 61). Aunque todos estos estudios demuestran la utilidad potencial de la detección de LSCs en clínica para estratificar pacientes en los distintos grupos pronósticos, es necesario unificar los criterios de detección de LSCs y validar estos resultados.

Los perfiles de expresión génica de LSCs también han sido relacionados con el desarrollo clínico de la enfermedad. La expresión de una firma génica asociada a LSCs al diagnóstico predice una menor supervivencia global, supervivencia libre de enfermedad y un mayor riesgo de recaída (52). Esta firma génica es similar a la obtenida de HSCs y ambas predicen la supervivencia del paciente (53).

6. IMPLICACIÓN TERAPÉUTICA

Debido a sus propiedades de células madre, las CSCs se mantienen mayormente inalterables tras el tratamiento por la resistencia a fármacos y/o radiación (62-65). La resistencia al tratamiento se cree que está sustentada en un aumento del reconocimiento y reparación del ADN dañado, la alteración de los puntos de control del ciclo celular, la desensibilización a los estímulos apoptóticos y la sobreexpresión de los transportadores de resistencia a multidrogas (63). De forma similar a las células madre sanas, las CSCs son mayormente quiescentes, siendo esta propiedad muy importante para la resistencia a terapia.

La resistencia de las CSCs al tratamiento ha sido descrito tanto *ex vivo* como *in vivo*. La inducción de apoptosis en la presencia de los quimioterapéuticos comúnmente usados en clínica es menor que en células tumorales más diferenciadas. De hecho, las diferencias en sensibilidad son independiente de la tasa de proliferación. Por tanto, la resistencia a la terapia es una característica intrínseca a las CSCs. Las CSCs remanentes tras el tratamiento pueden restablecer la enfermedad, confirmando su implicación en el fracaso del tratamiento (62, 66-70). En cuanto a los ensayos de xenotrasplantes, las CSCs parecen insensibles a los fármacos neoplásicos convencionales. Es más, la población de CSCs se enriquece tras el tratamiento (64, 71-75).

Aunque la supervivencia a largo plazo de los pacientes con LMA ha aumentado en las últimas décadas, los episodios de recaída siguen siendo frecuentes. De acuerdo con el modelo de células madre del cáncer, cualquier aproximación terapéutica que no erradique las LSCs probablemente tendrá poco éxito. Aunque elimine la mayoría de los blastos leucémicos e induzca la remisión temporal del tumor, no impedirá la regeneración de la enfermedad y la diseminación metastásica del mismo. Por lo tanto, se requieren nuevos tratamientos que afecten selectivamente a las LSCs con una mínima toxicidad para las células madre hematopoyéticas. Un aspecto importante de la biología de las LSCs es su plasticidad y la formación de subclones durante la evolución de la enfermedad. Por lo tanto, son necesarias mejoras en el tratamiento y es previsible que las nuevas terapias que actúen sobre LSCs aumenten la tasa de curación, disminuyendo las recaídas.

7. TERAPIA DE DIFERENCIACIÓN

Existen tres grandes tipos de terapias neoplásticas:

- Inhibidores de productos de fusión génica
- Moduladores de rutas de señalización
- Inducción de diferenciación terminal

La LMA en particular, y el resto de los tumores en general, son neoplasias altamente heterogéneas con varias anomalías moleculares y citogenéticas (43). El diseño de nuevas terapias cuya diana específica sea una proteína de fusión sería de utilidad clínica limitada. Esta aproximación sería únicamente eficaz para aquellas patologías donde una única lesión genética sea responsable del fenotipo transformado.

Otra aproximación terapéutica basada en el mecanismo de transformación explorada ha sido la modificación de rutas de señalización (39). Hasta la fecha, para LMA, el éxito ha sido dispar. El uso de anticuerpos bloqueantes que reconozcan antígenos de superficie específicos o sobreexpresados en LSCs como CD33 (76), CD44 (77), CD123 (78) o CD47 (51) ha mostrado ser efectivo en modelos preclínicos aunque el efecto en pacientes ha sido irrelevante clínicamente (55). La inhibición de Akt (79), JunB (80), CDX (81) o NFκB (82) elimina la población de LSCs en modelo preclínicos pero aún no hay datos clínicos de su efectividad. Sin embargo, debido a la similitud en el patrón de expresión génica de LSCs y HSCs (52, 53, 83), es esperable que la modulación farmacéutica de rutas de señalización implicadas en la supervivencia de LSCs puede ser tóxica en HSCs.

Sin embargo, existe una tercera aproximación terapéutica basada en superar el bloqueo en diferenciación causado por mutaciones y/o cambios epigenéticos y, por lo tanto, inducir diferenciación directa a un linaje hematopoyético alternativo (84). Las células madre están definidas por dos propiedades únicas: capacidad de auto-renovación prolongada y potencial para generar células progenitoras más maduras y con capacidad de amplificación a corto plazo que darán lugar a las células especializadas que constituyen un tejido determinado mediante procesos de diferenciación. Por lo tanto, el equilibrio entre auto-renovación y diferenciación está altamente regulado, como también lo está el balance entre quiescencia y proliferación (85). En LSCs, el balance está desplazado hacia la auto-renovación produciendo una ventaja proliferativa y un bloqueo en la diferenciación (86). Tanto la inhibición de la auto-renovación como el incremento en la presión diferenciadora podrían agotar la población de LSCs (77, 87). Esta aproximación terapéutica está obteniendo datos prometedores a nivel preclínico (55).

8. CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS HUMANAS TRANSFORMADAS: MODELO DE CSCS *IN VITRO*

Las células madre pluripotentes humanas (embrionarias) neoplásticas fueron descritas en 2009 como una variante de las células humanas pluripotentes (embrionarias) generadas espontáneamente en cultivo celular que mantenía un cariotipo normal pero mostraban las características fenotípicas clásicas de la transformación

tumoral (88), conservando también sus propiedades de células madre. Entre estas características se encuentra el incremento en la auto-renovación y menor dependencia de factores de crecimiento para la supervivencia, acompañada con el bloqueo de la diferenciación. El comportamiento de estas células transformadas pluripotentes es parecido al de las CSCs, convirtiéndose en un sustituto de las CSCs con un alto valor científico como modelo *in vitro*. Posteriormente, se generaron líneas derivadas de éstas que contenían la expresión de la proteína de fusión Oct4-GFP (Oct4 es un marcador de pluripotencia), como marcado de diferenciación. Las células derivadas fueron usadas para generar una plataforma de cribado de alto rendimiento y alto contenido de compuestos con actividad diferenciadora. Las librerías de compuestos conocidos, naturales o sintetizados *de novo*, fueron probadas sobre estas células y su efecto en la diferenciación de este modelo de CSCs fue determinado por las variaciones en la intensidad de fluorescencia del GFP. Para confirmar que los compuestos que inducían diferenciación en las células pluripotentes transformadas de forma específica, se generaron células humanas embrionarias que expresaban este mismo marcador. Se consideraron como positivos todos aquellos compuestos químicos que indujesen diferenciación en las células transformadas y no en las sanas (89).

De una librería compuesta de más de 2,000 compuestos, identificaron 26 positivos. La mayoría de ellos eran antagonistas de receptores de dopamina que son usados para tratar los síntomas de la esquizofrenia. La validación funcional se realizó en LMA puesto que es el modelo neoplásico jerárquico más estudiado. Se eligió tioridazina como representante de los positivos. El tratamiento con tioridazina inducía la diferenciación de las LSCs tanto *ex vivo* como en modelo de xenotrasplante en ratón. No se demostró ningún efecto significativo en la hematopoyesis sana ni en la funcionalidad de las células madre hematopoyéticas. Teniendo en cuenta que las LSCs son mayormente quiescentes y la inducción de diferenciación supone la entra en ciclo celular, el tratamiento con tioridazina producía un efecto citotóxico sinérgico con los quimioterapéuticos utilizados en clínica (89). Se ha finalizado ya la fase clínica I para evaluar la toxicidad de este tratamiento en pacientes de LMA (NCT02096289 – Thoridal).

9. REPOSICIONAMIENTO DE FÁRMACOS PARA LA TERAPIA DE DIFERENCIACIÓN BASADO EN UN CRIBADO *IN SILICO*

Las LSCs pueden diferenciarse en granulocitos, monocitos y/o células dendríticas (90). Todas ellas tienen una vida media limitada y son más sensibles a fármacos. Los mecanismos que bloquean la diferenciación e incrementan la auto-renovación son parcialmente desconocidos; sin embargo, si se conocen compuestos que inducen diferenciación mieloide en LSCs *in vitro*. Se obtuvieron los perfiles de expresión génica correspondientes a las células leucémicas no LSCs, las LSCs, granulocitos, monocitos y células dendríticas.

Adicionalmente, se obtuvieron los perfiles correspondientes a líneas celulares de LMA tratadas con agentes diferenciadores ya conocidos procedentes de repositorios públicos (GEO, ArrayExpress). Mediante un estudio *in silico* se identificó la firma génica asociada al proceso de diferenciación de LSCs hacia monocitos, granulocitos y células dendríticas. De forma similar, se obtuvo la firma génica asociada a la diferenciación sana hematopoyética de los linajes mieloides. Se descartaron aquellos genes que estuviesen regulados de forma equivalente en los procesos de diferenciación de LSCs y células madre hematopoyéticas para poder obtener una firma génica asociada exclusivamente a las LSCs. Estas firmas refinadas fueron optimizadas posteriormente excluyendo aquellos genes que se expresaban de forma similar en células madre hematopoyéticas y LSCs. Cada una de las firmas génicas constituye una diana terapéutica *per se*. Se enfrentaron a la base de datos de Connectivity Maps (91) para encontrar pequeñas moléculas bioactivas aprobadas por la FDA que produjesen una regulación génica similar a la firma identificada previamente en cualquier sistema celular. Los resultados positivos fueron filtrados primeramente en base a su valor en el cribado *in silico*, la concentración a la cual inducía esa expresión génica y la significación estadística. De una librería de más de 3000 compuestos, se obtuvieron 17 positivos, que correspondían a 4 grandes familias:

- Inhibidores de XIAPs (92)
- Fármacos anti-malaria (93)
- Moduladores del receptor de dopamina (94)
- Antagonistas del receptor de serotonina (95)

La primera familia de fármacos descrita usando esta estrategia fueron los inhibidores de XIAP, una proteína proapoptótica. Dequalinum fue el primer compuesto identificado, un fármaco conocido por inhibir XIAP y aprobado como antiséptico y antifúngico (96, 97). Tanto Dequalinum como otros inhibidores de XIAPs afectan selectivamente a las LSCs, induciendo su diferenciación.

Algunos fármacos anti-malaria como mefloquina poseen actividad anti-leucémica (98). La segunda familia de fármacos identificada en el cribado *in silico* fueron compuestos con actividad anti-malaria como la emetina, aunque con distinto mecanismo de acción de las quininas. Se demostró que la inhibición de HIF-1 α era crítica para la inducción de diferenciación de las LSCs y el efecto anti-leucémico fue detectado en modelos de xenotrasplante en ratón. La inhibición de HIF-1 α no tenía efectos significativos en las células madre hematopoyéticas.

El último conjunto de compuestos identificados siguiendo esta estrategia han sido los antagonistas de receptores de serotonina de tipo 1B. Se ha descrito que las LSCs, en especial, y las células de LMA, en general, expresan de forma aberrante estos receptores neuronales. De hecho, la expresión de los receptores de serotonina 1B es significativamente más baja en las poblaciones de células sanas hematopoyéticas. Es más, la expresión del receptor de serotonina 1B tiene valor diagnóstico, es decir, su expresión permite discriminar las muestras tumorales.

Además, hay una relación entre la expresión del receptor y la historia clínica del paciente. A mayor expresión del receptor, más resistencia al tratamiento quimioterapéutico convencional y mayor sensibilidad a los antagonistas de receptores de serotonina 1B. La inhibición farmacológica del receptor de serotonina 1B produce la diferenciación y muerte de LSCs tanto *ex vivo* como *in vivo* en modelos de xenotrasplantes de ratón. El tratamiento con los inhibidores de serotonina de tipo 1B sinergiza en su efecto citotóxico con los quimioterapéuticos actuales. No se ha detectado ningún efecto significativo en la hematopoyesis sana ni en la funcionalidad de células sanguíneas maduras ni células madre hematopoyéticas (95). Es más, los estudios epidemiológicos ya publicados indicarían que los pacientes de Parkinson tratados con antagonistas de receptores de serotonina 1B tienen una menor incidencia de leucemia. El desarrollo clínico de los antagonistas de receptores de serotonina de tipo 1B está siendo realizada por la empresa Leukos Biotech (cofundada por la Dra. Risueño y el Josep Carreras Leukaemia Research Institute) y se espera empezar el ensayo clínico en pacientes de LMA en el primer trimestre del 2018.

Lista de abreviaturas

CSC: Célula madre del cáncer (*cancer stem cell*)

HSC: Célula madre hematopoyética (*hematopoietic stem cell*)

LMA: Leucemia mieloide aguda

LSC: Célula madre leucémica (*leukemic stem cell*)

Conflicto de intereses

La Dra. Risueño es inventora en varias patentes licencias a distintas empresas farmacéuticas relacionadas con el trabajo expuesto. Asimismo, es fundadora y accionista de Leukos Biotech.

Agradecimientos

Este trabajo hubiese sido imposible de realizar sin el apoyo constante de los miembros del Risueño Lab. RMR está financiada por el programa Ramón y Cajal (RYC-2011-07998) y el programa IEDI (IEDI-2016-00740).

10. REFERENCIAS

1. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*. 1976 Oct 1;194(4260):23-8.
2. Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer*. 2008 Oct;8(10):755-68.
3. Polyak K, Haviv I, Campbell IG. Co-evolution of tumor cells and their microenvironment. *Trends Genet*. 2009 Jan;25(1):30-8.
4. Bissell MJ, Hines WC. Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nat Med*. 2011 Mar;17(3):320-9.
5. Stratton MR. Exploring the genomes of cancer cells: progress and promise. *Science*. 2011 Mar 25;331(6024):1553-8.
6. Takahashi T, Habuchi T, Kakehi Y, Mitsumori K,

- Akao T, Terachi T, et al. Clonal and chronological genetic analysis of multifocal cancers of the bladder and upper urinary tract. *Cancer Res.* 1998 Dec 15;58(24):5835-41.
7. Cottu PH, Asselah J, Lae M, Pierga JY, Dieras V, Mignot L, et al. Intratumoral heterogeneity of HER2/neu expression and its consequences for the management of advanced breast cancer. *Ann Oncol.* 2008 Mar;19(3):595-7.
 8. Boland CR, Sato J, Appelman HD, Bresalier RS, Feinberg AP. Microallelotyping defines the sequence and tempo of allelic losses at tumour suppressor gene loci during colorectal cancer progression. *Nat Med.* 1995 Sep;1(9):902-9.
 9. Navin N, Krasnitz A, Rodgers L, Cook K, Meth J, Kendall J, et al. Inferring tumor progression from genomic heterogeneity. *Genome Res.* 2010 Jan;20(1):68-80.
 10. Teixeira MR, Pandis N, Bardi G, Andersen JA, Heim S. Karyotypic comparisons of multiple tumorous and macroscopically normal surrounding tissue samples from patients with breast cancer. *Cancer Res.* 1996 Feb 15;56(4):855-9.
 11. Klein CA. Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nat Rev Cancer.* 2009 Apr;9(4):302-12.
 12. Navin N, Kendall J, Troge J, Andrews P, Rodgers L, McIndoo J, et al. Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. *Nature.* 2011 Apr 7;472(7341):90-4.
 13. Anderson K, Lutz C, van Delft FW, Bateman CM, Guo Y, Colman SM, et al. Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia. *Nature.* 2011;469(7330):356-61.
 14. Greenman C, Stephens P, Smith R, Dalgliesh GL, Hunter C, Bignell G, et al. Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature.* 2007 Mar 8;446(7132):153-8.
 15. Beroukhi R, Mermel CH, Porter D, Wei G, Raychaudhuri S, Donovan J, et al. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature.* 2010 Feb 18;463(7283):899-905.
 16. Greaves MF, Maia AT, Wiemels JL, Ford AM. Leukemia in twins: lessons in natural history. *Blood.* 2003 Oct 1;102(7):2321-33.
 17. Park SY, Gonen M, Kim HJ, Michor F, Polyak K. Cellular and genetic diversity in the progression of in situ human breast carcinomas to an invasive phenotype. *J Clin Invest.* 2010 Feb;120(2):636-44.
 18. Shipitsin M, Campbell LL, Argani P, Weremowicz S, Bloushtain-Qimron N, Yao J, et al. Molecular definition of breast tumor heterogeneity. *Cancer Cell.* 2007 Mar;11(3):259-73.
 19. Dick JE. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood.* 2008 Dec 15;112(13):4793-807.
 20. Furth J, Strumia M. Studies on Transmissible Lymphoid Leucemia of Mice. *J Exp Med.* 1931 Apr 30;53(5):715-31.
 21. Southam CM, Brunschwig A. Quantitative studies of autotransplantation of human cancer. Preliminary report. *Cancer.* 1961;14(5):971-8.
 22. Kleinsmith LJ, Pierce GB, Jr. Multipotentiality of Single Embryonal Carcinoma Cells. *Cancer Res.* 1964 Oct;24:1544-51.
 23. Shimada H, Chatten J, Newton WA, Jr., Sachs N, Hamoudi AB, Chiba T, et al. Histopathologic prognostic factors in neuroblastic tumors: definition of subtypes of ganglioneuroblastoma and an age-linked classification of neuroblastomas. *J Natl Cancer Inst.* 1984 Aug;73(2):405-16.
 24. Ogawa M, Fried J, Sakai Y, Strife A, Clarkson BD. Studies of cellular proliferation in human leukemia. VI. The proliferative activity, generation time, and emergence time of neutrophilic granulocytes in chronic granulocytic leukemia. *Cancer.* 1970 May;25(5):1031-49.
 25. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature medicine.* 1997;3(7):730-7.
 26. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature.* 1994;367(6464):645-8.
 27. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(7):3983-8.
 28. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature.* 2007;445(7123):106-10.
 29. Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, et al. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer research.* 2007;67(3):1030-7.
 30. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature.* 2004;432(7015):396-401.
 31. Zhang S, Balch C, Chan MW, Lai H-C, Matei D, Schilder JM, et al. Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors. *Cancer research.* 2008;68(11):4311-20.
 32. Quintana E, Shackleton M, Foster HR, Fullen DR, Sabel MS, Johnson TM, et al. Phenotypic heterogeneity among tumorigenic melanoma cells from patients that is reversible and not hierarchically organized. *Cancer Cell.* 2010 Nov 16;18(5):510-23.
 33. Quintana E, Shackleton M, Sabel MS, Fullen DR, Johnson TM, Morrison SJ. Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature.* 2008 Dec 4;456(7222):593-8.
 34. Chaffer CL, Marjanovic ND, Lee T, Bell G, Kleer CG, Reinhardt F, et al. Poised chromatin at the ZEB1

- promoter enables breast cancer cell plasticity and enhances tumorigenicity. *Cell*. 2013 Jul 03;154(1):61-74.
35. Vermeulen L, De Sousa EMF, van der Heijden M, Cameron K, de Jong JH, Borovski T, et al. Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nat Cell Biol*. 2010 May;12(5):468-76.
 36. Notta F, Mullighan CG, Wang JCY, Poepl A, Doulatov S, Phillips LA, et al. Evolution of human BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia-initiating cells. *Nature*. 2011;469(7330):362-7.
 37. Kreso A, O'Brien CA, van Galen P, Gan OI, Notta F, Brown AMK, et al. Variable clonal repopulation dynamics influence chemotherapy response in colorectal cancer. *Science (New York, N Y)*. 2013;339(6119):543-8.
 38. van Delft FW, Horsley S, Colman S, Anderson K, Bateman C, Kempinski H, et al. Clonal origins of relapse in ETV6-RUNX1 acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2011;117(23):6247-54.
 39. Perl AE, Carroll M. Exploiting signal transduction pathways in acute myelogenous leukemia. *Curr Treat Options Oncol*. 2007 Aug;8(4):265-76.
 40. Lowenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 1999 Sep 30;341(14):1051-62.
 41. Dohner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Buchner T, Burnett AK, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2009 Jan 21;115(3):453-74.
 42. Shipley JL, Butera JN. Acute myelogenous leukemia. *Exp Hematol*. 2009 Jun;37(6):649-58.
 43. Estey E, Dohner H. Acute myeloid leukaemia. *Lancet*. 2006 Nov 25;368(9550):1894-907.
 44. Tallman MS. New agents for the treatment of acute myeloid leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2006;19(2):311-20.
 45. Taussig DC, Miraki-Moud F, Anjos-Afonso F, Pearce DJ, Allen K, Ridler C, et al. Anti-CD38 antibody-mediated clearance of human repopulating cells masks the heterogeneity of leukemia-initiating cells. *Blood*. 2008;112(3):568-75.
 46. Taussig DC, Vargaftig J, Miraki-Moud F, Griessinger E, Sharrock K, Luke T, et al. Leukemia-initiating cells from some acute myeloid leukemia patients with mutated nucleophosmin reside in the CD34(-) fraction. *Blood*. 2010;115(10):1976-84.
 47. Risueno RM, Campbell CJ, Dingwall S, Levadoux-Martin M, Leber B, Xenocostas A, et al. Identification of T-lymphocytic leukemia-initiating stem cells residing in a small subset of patients with acute myeloid leukemic disease. *Blood*. 2011 Jun 30;117(26):7112-20.
 48. Horton SJ, Huntly BJ. Recent advances in acute myeloid leukemia stem cell biology. *Haematologica*. 2012 Jul;97(7):966-74.
 49. Felipe Rico J, Hassane DC, Guzman ML. Acute myelogenous leukemia stem cells: from Bench to Bedside. *Cancer Lett*. 2013 Sep 10;338(1):4-9.
 50. Jaiswal S, Jamieson CH, Pang WW, Park CY, Chao MP, Majeti R, et al. CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis. *Cell*. 2009 Jul 23;138(2):271-85.
 51. Majeti R, Chao MP, Alizadeh AA, Pang WW, Jaiswal S, Gibbs KD, Jr., et al. CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells. *Cell*. 2009 Jul 23;138(2):286-99.
 52. Gentles AJ, Plevritis SK, Majeti R, Alizadeh AA. Association of a leukemic stem cell gene expression signature with clinical outcomes in acute myeloid leukemia. *JAMA*. 2010 Dec 22;304(24):2706-15.
 53. Eppert K, Takenaka K, Lechman ER, Waldron L, Nilsson B, van Galen P, et al. Stem cell gene expression programs influence clinical outcome in human leukemia. *Nat Med*. 2011 Sep;17(9):1086-93.
 54. de Jonge DM, Jones A, Phillips R, Chung M. Understanding the essence of home: older people's experience of home in Australia. *Occup Ther Int*. 2011 Mar;18(1):39-47.
 55. Lane SW, Scadden DT, Gilliland DG. The leukemic stem cell niche: current concepts and therapeutic opportunities. *Blood*. 2009 Aug 06;114(6):1150-7.
 56. Pearce DJ, Taussig D, Zibara K, Smith LL, Ridler CM, Preudhomme C, et al. AML engraftment in the NOD/SCID assay reflects the outcome of AML: implications for our understanding of the heterogeneity of AML. *Blood*. 2006 Feb 1;107(3):1166-73.
 57. Cheung AM, Wan TS, Leung JC, Chan LY, Huang H, Kwong YL, et al. Aldehyde dehydrogenase activity in leukemic blasts defines a subgroup of acute myeloid leukemia with adverse prognosis and superior NOD/SCID engrafting potential. *Leukemia*. 2007 Jul;21(7):1423-30.
 58. van Rhenen A, Feller N, Kelder A, Westra AH, Rombouts E, Zweegman S, et al. High stem cell frequency in acute myeloid leukemia at diagnosis predicts high minimal residual disease and poor survival. *Clin Cancer Res*. 2005 Sep 15;11(18):6520-7.
 59. Terwijn M, Feller N, van Rhenen A, Kelder A, Westra G, Zweegman S, et al. Interleukin-2 receptor alpha-chain (CD25) expression on leukaemic blasts is predictive for outcome and level of residual disease in AML. *Eur J Cancer*. 2009 Jun;45(9):1692-9.
 60. Ran D, Schubert M, Pietsch L, Taubert I, Wuchter P, Eckstein V, et al. Aldehyde dehydrogenase activity among primary leukemia cells is associated with stem

- cell features and correlates with adverse clinical outcomes. *Exp Hematol*. 2009 Dec;37(12):1423-34.
61. Gerber JM, Smith BD, Ngwang B, Zhang H, Vala MS, Morsberger L, et al. A clinically relevant population of leukemic CD34(+)CD38(-) cells in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2012 Apr 12;119(15):3571-7.
 62. Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 2006;444(7120):756-60.
 63. Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer*. 2005 Apr;5(4):275-84.
 64. Ishikawa F, Yoshida S, Saito Y, Hijikata A, Kitamura H, Tanaka S, et al. Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region. *Nat Biotechnol*. 2007 Nov;25(11):1315-21.
 65. Diehn M, Cho RW, Lobo NA, Kalisky T, Dorie MJ, Kulp AN, et al. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature*. 2009 Apr 9;458(7239):780-3.
 66. Colak S, Zimmerlin CD, Fessler E, Hogdal L, Prasetyanti PR, Grandela CM, et al. Decreased mitochondrial priming determines chemoresistance of colon cancer stem cells. *Cell Death Differ*. 2014 Jul;21(7):1170-7.
 67. Ma S, Lee TK, Zheng BJ, Chan KW, Guan XY. CD133+ HCC cancer stem cells confer chemoresistance by preferential expression of the Akt/PKB survival pathway. *Oncogene*. 2008 Mar 13;27(12):1749-58.
 68. Bertolini G, Roz L, Perego P, Tortoreto M, Fontanella E, Gatti L, et al. Highly tumorigenic lung cancer CD133+ cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Sep 22;106(38):16281-6.
 69. Eramo A, Ricci-Vitiani L, Zeuner A, Pallini R, Lotti F, Sette G, et al. Chemotherapy resistance of glioblastoma stem cells. *Cell Death Differ*. 2006 Jul;13(7):1238-41.
 70. Ginestier C, Liu S, Diebel ME, Korkaya H, Luo M, Brown M, et al. CXCR1 blockade selectively targets human breast cancer stem cells in vitro and in xenografts. *J Clin Invest*. 2010 Feb;120(2):485-97.
 71. Todaro M, Alea MP, Di Stefano AB, Cammareri P, Vermeulen L, Iovino F, et al. Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4. *Cell Stem Cell*. 2007 Oct 11;1(4):389-402.
 72. Dylla SJ, Beviglia L, Park IK, Chartier C, Raval J, Ngan L, et al. Colorectal cancer stem cells are enriched in xenogeneic tumors following chemotherapy. *PLoS One*. 2008;3(6):e2428.
 73. Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell*. 2007 Sep 13;1(3):313-23.
 74. Oravecz-Wilson KI, Philips ST, Yilmaz OH, Ames HM, Li L, Crawford BD, et al. Persistence of leukemia-initiating cells in a conditional knockin model of an imatinib-responsive myeloproliferative disorder. *Cancer Cell*. 2009;16(2):137-48.
 75. Baumann M, Krause M, Hill R. Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance. *Nat Rev Cancer*. 2008 Jul;8(7):545-54.
 76. Jawad M, Seedhouse C, Mony U, Grundy M, Russell NH, Pallis M. Analysis of factors that affect in vitro chemosensitivity of leukaemic stem and progenitor cells to gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg) in acute myeloid leukaemia. *Leukemia*. 2010 Jan;24(1):74-80.
 77. Jin L, Hope KJ, Zhai Q, Smadja-Joffe F, Dick JE. Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells. *Nat Med*. 2006 Oct;12(10):1167-74.
 78. Jin L, Lee EM, Ramshaw HS, Busfield SJ, Peoppl AG, Wilkinson L, et al. Monoclonal antibody-mediated targeting of CD123, IL-3 receptor alpha chain, eliminates human acute myeloid leukemic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2009 Jul 02;5(1):31-42.
 79. Kharas MG, Okabe R, Ganis JJ, Gozo M, Khandan T, Paktinat M, et al. Constitutively active AKT depletes hematopoietic stem cells and induces leukemia in mice. *Blood*. 2010 Feb 18;115(7):1406-15.
 80. Passegue E, Wagner EF, Weissman IL. JunB deficiency leads to a myeloproliferative disorder arising from hematopoietic stem cells. *Cell*. 2004 Oct 29;119(3):431-43.
 81. Koo S, Huntly BJ, Wang Y, Chen J, Brumme K, Ball B, et al. Cdx4 is dispensable for murine adult hematopoietic stem cells but promotes MLL-AF9-mediated leukemogenesis. *Haematologica*. 2010 Oct;95(10):1642-50.
 82. Guzman ML, Rossi RM, Neelakantan S, Li X, Corbett CA, Hassane DC, et al. An orally bioavailable parthenolide analog selectively eradicates acute myelogenous leukemia stem and progenitor cells. *Blood*. 2007 Dec 15;110(13):4427-35.
 83. Gal H, Amariglio N, Trakhtenbrot L, Jacob-Hirsh J, Margalit O, Avigdor A, et al. Gene expression profiles of AML derived stem cells; similarity to hematopoietic stem cells. *Leukemia*. 2006 Dec;20(12):2147-54.
 84. Koefler HP. Is there a role for differentiating therapy in non-APL AML? *Best Pract Res Clin Haematol*. 2010 Dec;23(4):503-8.
 85. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001 Nov 1;414(6859):105-11.
 86. Lobo NA, Shimono Y, Qian D, Clarke MF. The biology of cancer stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2007;23:675-99.

87. Saito Y, Kitamura H, Hijikata A, Tomizawa-Murasawa M, Tanaka S, Takagi S, et al. Identification of therapeutic targets for quiescent, chemotherapy-resistant human leukemia stem cells. *Sci Transl Med*. 2010 Feb 3;2(17):17ra9.
88. Werbowetski-Ogilvie TE, Bosse M, Stewart M, Schnerch A, Ramos-Mejia V, Rouleau A, et al. Characterization of human embryonic stem cells with features of neoplastic progression. *Nat Biotechnol*. 2009 Jan;27(1):91-7.
89. Sachlos E, Risueno RM, Laronde S, Shapovalova Z, Lee JH, Russell J, et al. Identification of drugs including a dopamine receptor antagonist that selectively target cancer stem cells. *Cell*. 2012 Jun 8;149(6):1284-97.
90. Bruserud O, Gjertsen BT. New strategies for the treatment of acute myelogenous leukemia: differentiation induction--present use and future possibilities. *Stem Cells*. 2000;18(3):157-65.
91. Lamb J, Crawford ED, Peck D, Modell JW, Blat IC, Wrobel MJ, et al. The Connectivity Map: using gene-expression signatures to connect small molecules, genes, and disease. *Science*. 2006 Sep 29;313(5795):1929-35.
92. Moreno-Martinez D, Nomdedeu M, Lara-Castillo MC, Etxabe A, Pratorcorona M, Tesi N, et al. XIAP inhibitors induce differentiation and impair clonogenic capacity of acute myeloid leukemia stem cells. *Oncotarget*. 2014 Jun 30;5(12):4337-46.
93. Cornet-Masana JM, Moreno-Martinez D, Lara-Castillo MC, Nomdedeu M, Etxabe A, Tesi N, et al. Emetine induces chemosensitivity and reduces clonogenicity of acute myeloid leukemia cells. *Oncotarget*. 2016 Apr 26;7(17):23239-50.
94. Lara-Castillo MC, Cornet-Masana JM, Etxabe A, Banus-Mulet A, Torrente MA, Nomdedeu M, et al. Repositioning of bromocriptine for treatment of acute myeloid leukemia. *J Transl Med*. 2016 Sep 07;14:261.
95. Etxabe A, Lara-Castillo MC, Cornet-Masana JM, Banus-Mulet A, Nomdedeu M, Torrente MA, et al. Inhibition of serotonin receptor type 1 in acute myeloid leukemia impairs leukemia stem cell functionality: a promising novel therapeutic target. *Leukemia*. 2017 Mar 10.
96. D'Auria FD, Simonetti G, Strippoli V. [Antimicrobial characteristics of a tincture of dequalinium chloride]. *Ann Ig*. 1989 Sep-Oct;1(5):1227-41.
97. Della Casa V, Noll H, Gonser S, Grob P, Graf F, Pohlig G. Antimicrobial activity of dequalinium chloride against leading germs of vaginal infections. *Arzneimittelforschung*. 2002;52(9):699-705.
98. Sukhai MA, Prabha S, Hurren R, Rutledge AC, Lee AY, Sriskanthadevan S, et al. Lysosomal disruption preferentially targets acute myeloid leukemia cells and progenitors. *J Clin Invest*. 2013 Jan;123(1):315-28.