



VNIVERSITAT
D VALÈNCIA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Programa de Biomedicina y Biotecnología

**ROL DEL COMPLEJO *RUNX1-CBF- β /HIPK2/p300/p53* EN LA
EVOLUCIÓN LEUCÉMICA DE LAS NEOPLASIAS
MIELOPROLIFERATIVAS CRÓNICAS**

**Tesis doctoral presentada por
CARLOS A. LOZANO ASENCIO**

Directores

Dr. JUAN CARLOS HERNÁNDEZ BOLUDA

Dr. JOAN CLIMENT BATALLER

Tutor

Dr. CARLOS SOLANO VERCET

A mi familia,

“A man with an idea is a mad man until the idea success”

Mark Twain

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero dar las gracias a los Dres. Hernández Boluda y Climent Bataller por permitirme formar parte de un proyecto tan apasionante en el que he podido formarme y realizar mi tesis doctoral, así como por los conocimientos transmitidos y el haber puesto a mi disposición los recursos e instalaciones necesarias para poder llevar a cabo este proyecto.

Agradezco a la Dra. Villamón su paciencia, disponibilidad y ayuda en el desarrollo de este trabajo; a las Dras. Navarro y Amat por su ayuda en la búsqueda y recogida de muestras clínicas; así como al personal del Servicio de Hematología del Hospital Clínico.

Quiero dar las gracias a las personas con las que he compartido tantos momentos de bancada, los integrantes del laboratorio uno. Gracias por hacer de éste lugar un segundo hogar donde la ciencia y la amistad van de la mano. Que todos podamos seguir tocando más y mejor en el futuro. Gracias Ray, compañero y amigo desde el principio en este barco, y en esta aventura que es la ciencia. Persiguiendo la misma meta hemos compartido logros, fracasos, decepciones y alegrías. Gracias por tu ayuda, paciencia y conocimientos transmitidos, y por tanta ciencia compartida durante todo este tiempo.

También quiero agradecer a compañeros de otros grupos que me han ayudado en este largo camino: Gracias a los miembros del laboratorio 2, así como a Alba, Marcelino y Paco, por ayudar siempre que ha sido necesario, así como por tantas jornadas de ciencia compartidas. Gracias especialmente, Lucía, por tu apoyo y ayuda incondicional, por tus ánimos, consejos y explicaciones. Por último, quiero agradecer a Guadalupe su infinita paciencia, amabilidad y

tiempo dedicado. Gracias por estar siempre dispuesta a ayudar y por todas tus enseñanzas en el mundo de la citometría.

También quiero agradecer de forma especial a la Dra. Alberich, por su disposición y ayuda, por tantos consejos y recomendaciones y por haberme enseñado tanto para poder llegar a lo que hoy alcanzo.

Gracias especialmente a Alba, por acompañarme en esta última y ardua etapa de mi tesis doctoral, apareciendo de repente y recorriendo conmigo este tramo tan difícil para ambos. Gracias por tu apoyo y ayuda constante, por los ánimos y consejos, por escucharme y aguantarme. Sin ti, todo esto habría sido mucho más complicado.

Por último, todas las palabras que dedique a mi familia son insuficientes. A todos ellos. Gracias por compartir este largo proceso conmigo, por vuestro enorme e incondicional apoyo, vuestra paciencia y vuestros ánimos. Gracias por creer siempre en mí, por aguantar mis nervios, por acompañarme en mis alegrías, y por impulsarme cuando más falta hacía. Como siempre, me habéis vuelto a demostrar que somos un todo, y sin vosotros, no habría alcanzado lo que hoy consigo.

Finalmente, quiero agradecer a mi abuelo Alberto, porque la inspiración y motivación necesaria para dedicarme a esto se lo debo a él, y sin él, nunca habría llegado a ser lo que soy hoy.

Resumen

Las neoplasias mieloproliferativas crónicas (NMPs) son procesos cancerígenos en los que se produce una expansión clonal de una o varias poblaciones de progenitores hematopoyéticos de estirpe mieloide. En las fases iniciales de la enfermedad, éstos presentan una adecuada diferenciación celular, lo que conlleva una descompensación final de los diferentes tipos celulares en médula ósea y sangre periférica y la consiguiente aparición de una serie de síntomas asociados que pueden llegar a producir importantes citopenias o complicaciones vasculares.

A pesar de que las NMPs pueden mantenerse relativamente controladas en su fase crónica mediante un tratamiento adecuado, éstas patologías tienen una tendencia natural a evolucionar, tras un intervalo de tiempo variable, hacia un estado más agresivo de la enfermedad y el desarrollo de leucemia aguda, lo que supone la fase más crítica de las NMPs. Por todo ello, el pronóstico de los pacientes está determinado por las complicaciones vasculares y la transformación leucémica.

Éste riesgo de transformación es máximo en la leucemia mieloide crónica *BCR-ABL* positiva, pero la existencia de tratamientos muy eficaces para eliminar la clona leucémica ha permitido modificar la historia natural de esta enfermedad y mejorar sustancialmente el pronóstico de los pacientes. Por el contrario, no existen por el momento tratamientos similares que permitan modificar el riesgo de transformación aguda de las NMPs *BCR-ABL* negativas, donde el tratamiento va dirigido a controlar los síntomas y prevenir las complicaciones vasculares. La fase leucémica de las NMPs tiene un pronóstico infausto, siendo el tipo de leucemia más resistente al tratamiento. La mediana de supervivencia en esta fase es de meses y

sólo el trasplante alogénico permite curar la enfermedad en una proporción reducida de casos.

Los mecanismos moleculares y genéticos implicados en la transformación leucémica no se conocen con precisión, por ello es de relevancia su investigación, con el fin de comprender los eventos moleculares asociados y buscar nuevas dianas terapéuticas.

RUNX1 (*AML1*) es un factor de transcripción con gran importancia en el desarrollo hematopoyético, muy asociado también al desarrollo leucémico, encontrándose frecuentemente alterado, vía mutación o translocación en las leucemias humanas, sobre todo en las de estirpe mieloide. Además, es uno de los genes más frecuentemente alterado en la fase de transformación aguda de las NMPs. *RUNX1* no actúa en solitario, sino que requiere la actividad de su cofactor transcripcional, *CBF- β* , habiéndose encontrado también diversas alteraciones del complejo *RUNX1-CBF- β* en las neoplasias mieloides. Ambos genes controlan procesos fundamentales de la hematopoyesis normal y maligna cómo la proliferación y la diferenciación celular.

Otro gen altamente alterado en la fase transformante de las NMPs es *TP53*. No es de extrañar que este gen tenga un papel importante en el desarrollo leucémico, puesto que controla rutas clave de los procesos oncológicos cómo las vías de respuesta al estrés celular, apoptosis y resistencia farmacológica.

Las alteraciones en *RUNX1* y *TP53* son muy frecuentes en la fase de transformación leucémica de las NMPs. Recientemente se ha descrito que tanto la actividad del dúo *RUNX1-CBF- β* , como la de *TP53*, están reguladas por la interacción con las proteínas p300 y HIPK2. De hecho, HIPK2 se encarga de fosforilar a *RUNX1*, p53 y p300, siendo necesarias dichas fosforilaciones para que se lleven a cabo sus funciones. Por otra parte, p300 se encarga también de regular la

actividad y estabilidad de HIPK2, así como de activar la maquinaria transcripcional de RUNX1-CBF- β y de p53, una vez que ambos (y p300) han sido activados por HIPK2. Por último, existen también datos en la literatura acerca del rol mediador de CBF- β en la ruta transcripcional de p53.

En base a los datos anteriormente expuestos, esta Tesis Doctoral tiene como objetivo principal el estudio de las interacciones de estos cinco genes, a modo de posible complejo transcripcional bidireccional (proliferación-diferenciación y apoptosis-resistencia farmacológica), en la fase de evolución leucémica de las NMPs.

Con el fin de cumplir este objetivo, se ha analizado el estado molecular, citogenético y funcional de los 5 genes mediante diferentes técnicas moleculares en líneas celulares de NMPs agudizadas, obteniéndose una caracterización molecular y citogenética completa del complejo propuesto en el contexto de estas patologías. Por otra parte, se han explorado las posibles funciones leucémicas de éste mediante la manipulación química o biológica de los genes reguladores *HIPK2* y *EP300* en líneas celulares y muestras de pacientes en cultivo, obteniéndose efectos significativos en la homeóstasis de las células leucémicas tras dicha manipulación. Por último, se ha evaluado en ambos tipos de muestras el efecto de fármacos usados en el tratamiento de estas hemopatías en función del estado de actividad del complejo, previamente manipulado, logrando influir significativamente en la manera en la que las células leucémicas responden a los tratamientos convencionales de estas patologías.

Palabras clave: Neoplasias mieloproliferativas, NMPs, leucemia mieloide, hematopoyesis, leucemogénesis, LMC, PV, TE, MF, HIPK2, RUNX1, EP300, TP53, CBF- β , apoptosis, proliferación, ciclo celular.

Summary

Chronic myeloproliferative neoplasms (MPNs) are carcinogenic processes in which there is a clonal expansion of one or more populations of myeloid hematopoietic progenitors. In the initial stages of the disease, they present an adequate cell differentiation, which entails a final decompensation of the different cell types in bone marrow and peripheral blood and the consequent appearance of associated symptoms that can lead to significant cytopenias or vascular complications.

Despite MPNs can be kept relatively controlled in their chronic phase through proper treatment, these pathologies have a natural tendency to evolve, after a variable period of time, towards a more aggressive state of the disease and the development of acute leukemia, which is the most critical phase of the MPNs. Therefore, patients prognosis is determined by vascular complications and leukemic transformation.

This transformation risk is maximum in chronic myeloid leukemia *BCR-ABL* positive, but the existence of very effective treatments to eliminate the leukemic clone has allowed modifying the natural history of this disease and substantially improving the prognosis of patients. On the contrary, there are currently no similar treatments that allow modifying the risk of acute transformation of negative *BCR-ABL* MPNs, in which the treatment is aimed at controlling symptoms and preventing vascular complications. The leukemic phase of NMPs has an unfortunate prognosis, being the most treatment-resistant type of leukemia. The median survival in this phase is about months and only allogeneic transplantation can cure the disease in a small proportion of cases.

The molecular and genetic mechanisms involved in the leukemic transformation are not accurately known, therefore their research is relevant in order to understand the molecular associated events and search for new therapeutic targets.

RUNX1 (*AML1*) is a transcription factor with a great importance in hematopoietic development, also closely associated with leukemogenesis, being frequently altered via mutation or translocation in human leukemia, especially those of myeloid lineage. In addition, it is one of the most frequently altered genes in the acute transformation phase of MPNs.

RUNX1 does not act alone, but requires the activity of its transcriptional cofactor *CBF- β* , therefore different alterations of the *RUNX1-CBF- β* complex have been also found in myeloid neoplasms. Together, both genes control fundamental processes of normal and malignant hematopoietic, such as cell proliferation and differentiation.

Another gene highly altered in the transforming phase of MPNs is *TP53*. It is not surprising this gene has an important role in the leukemic development, since it controls key oncologic pathways such as cellular response to stress, apoptosis and drug resistance.

RUNX1 and *TP53* alterations are highly frequent in the leukemic transformation phase of the MPNs. Recently, it has been described that both the activity of the *RUNX1-CBF- β* and that of *TP53* are regulated by the interaction with p300 and HIPK2 proteins. In fact, HIPK2 is responsible for phosphorylating *RUNX1*, p53 and p300, and those phosphorylations are necessary for their functions. On the other hand, p300 regulates HIPK2 activity and stability, and activates the *RUNX1-CBF- β* and p53 transcriptional machinery, once both (and p300) have been previously activated by HIPK2. Finally, there is also

data in the literature concerning the mediating role of CBF- β in the p53 transcriptional pathway.

Based on the above-mentioned data, the main aim of this PhD is the study of the interactions between these five genes, as a possible bi-directional transcriptional complex (proliferation-differentiation and apoptosis-pharmacological resistance), in the leukemic evolution phase of the MPNs.

In order to fulfill this objective, the molecular, cytogenetic and functional state of these five genes has been analyzed through different molecular techniques in acute MPNs cell lines, obtaining a complete molecular and cytogenetic characterization of the proposed complex in the context of these pathologies. On the other hand, the possible leukemic functions of the latter have been explored by chemical or biological manipulation of the *HIPK2* and *EP300* regulatory genes in cell lines and cultured patient samples, obtaining significant effects in the leukemic cell lines homeostasis after such manipulation. Finally, the effect of drugs used for the treatment of these hemopathies has been evaluated in both types of samples based on the state of activity of the previously manipulated complex, significantly influencing the way in which the leukemic cells respond to the conventional treatments that are used in the therapeutics of these pathologies.

Key words: Myeloproliferative neoplasms, MPNs, myeloid leukemia, hematopoiesis, leukemogenesis, CML, PV, ET, MF, HIPK2, RUNX1, EP300, TP53, CBF- β , apoptosis, proliferation, cell cycle.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	20
GLOSARIO DE ABREVIATURAS.....	28
1. INTRODUCCIÓN.....	38
1.1. INTRODUCCIÓN A LAS NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS.....	38
1.1.1. Las neoplasias mieloides.....	38
1.1.2. Las neoplasias mieloproliferativas crónicas (NMPs).....	39
1.2. EVOLUCIÓN HISTÓRICA EN EL CONOCIMIENTO DE LAS NMPs CRÓNICAS.....	44
1.2.1. Las primeras descripciones de las NMPs crónicas.....	44
1.2.2. Avances en la caracterización molecular de las NMPs. Desde Dameshek hasta Vainchenker.....	47
1.2.3. La complejidad genética de las NMPs: Avances en su caracterización molecular desde Vainchenker hasta la actualidad.....	53
1.3. LAS NMPs CRÓNICAS EN LA ACTUALIDAD.....	67
1.3.1. Clasificación actual de las neoplasias mieloproliferativas.....	69
1.3.1.1. <i>La leucemia mieloide crónica (LMC)</i>	70
1.3.1.2. <i>Policitemia vera (PV)</i>	75
1.3.1.3. <i>Trombocitemia esencial (TE)</i>	78
1.3.1.4. <i>Mielofibrosis (MF)</i>	80
1.4. TRANSFORMACIÓN AGUDA DE LAS NMPs CRÓNICAS.....	84
1.4.1. Transformación aguda de la LMC.....	85
1.4.2. Transformación aguda de las NMPs Ph-negativos.....	91
1.5. EL COMPLEJO RUNX1/CBF-β/HIPK2/EP300/TP53.....	97
1.5.1. <i>RUNX1</i> y <i>TP53</i> , genes frecuentemente mutados en la fase de transformación de las NMPs crónicas.....	97
1.5.2. Regulación de la actividad de <i>RUNX1-CBF-β</i> y <i>TP53</i> : El complejo regulador <i>HIPK2-EP300</i>	107
1.5.3. El complejo <i>RUNX1/CBF-β/HIPK2/EP300/TP53</i> . Resumen.....	119
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	126
2.1. HIPÓTESIS.....	126
2.2. OBJETIVOS.....	129

3. MATERIALES Y MÉTODOS	134
3.1. CULTIVO CELULAR	134
3.1.1. Líneas celulares.....	134
3.1.2. Cultivo de muestras celulares de pacientes y donantes control.....	135
3.2. ENSAYOS FUNCIONALES	137
3.2.1. Viabilidad/Proliferación Celular (MTS).....	137
3.2.2. Proliferación celular a largo plazo (contaje manual).....	137
3.2.3. Estudio del patrón de ciclo celular.....	138
3.2.4. Estudios de apoptosis.....	139
3.3. ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS	140
3.3.1. Extracción de ADN de muestras celulares.....	140
3.3.2. Extracción de plásmidos bacterianos.....	140
3.4. EXTRACCIÓN DE ARN	141
3.4.1. Extracción mediante Trizol/Cloroformo.....	141
3.5. PCR CONVENCIONAL	142
3.6. RETROTRANSCRIPCIÓN DEL ARN A cADN	143
3.6.1. Tratamiento con DNAsa I.....	143
3.6.2. Retrotranscripción.....	143
3.7. PCR CUANTITATIVA	143
3.8. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	145
3.9. WESTERN BLOT	145
3.10. HIBRIDACIÓN “IN SITU” FLUORESCENTE (FISH)	148
3.10.1. Preparación y fijación de muestras.....	148
3.10.2. Generación de sondas no comerciales.....	149
3.11. CULTIVO BACTERIANO	154
3.11.1. Reactivos y condiciones de cultivo.....	154
3.12. TRANSFORMACIÓN BACTERIANA	155
3.13. ENSAYOS DE TRANSFECCIÓN	156
3.14. INFECCIÓN CELULAR	159

3.15. SELECCIÓN CELULAR.....	161
3.16. TRATAMIENTOS CELULARES CON FÁRMACOS.....	162
4. RESULTADOS.....	168
4.1. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL COMPLEJO	
<i>HIPK2/EP300/RUNX1/CBFB/TP53</i>	169
4.1.1. Análisis de la expresión génica y del nivel de proteína.....	169
4.1.2. Análisis del número de copias y de posibles alteraciones génicas mediante Hibridación in Situ Fluorescente (FISH).....	174
4.1.3. Caracterización mediante hibridación in situ fluorescente (FISH) de la translocación BCR-ABL en las líneas celulares de LMC.....	202
4.2. ESTUDIOS FUNCIONALES EN LÍNEAS CELULARES DE NMPS EN FUNCIÓN DEL ESTADO DEL COMPLEJO <i>HIPK2/EP300/RUNX1/CBF-B/TP53</i>	204
4.2.1. Introducción.....	204
4.2.2. Inhibición biológica de <i>HIPK2</i> en líneas celulares de NMPS.....	205
4.2.3. Inhibición química de p300 en líneas celulares de NMPS. Estudios funcionales con C646.....	220
4.2.4. Inhibición simultánea <i>HIPK2</i> -p300 en la línea celular MEG-01.....	243
4.3. INHIBICIÓN QUÍMICA DE P300 EN MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA Y MÉDULA ÓSEA DE DONANTES SIN NEOPLASIA HEMATOLÓGICA Y DE PACIENTES CON NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS CRÓNICAS	250
4.3.1. Introducción.....	250
4.3.2. Estudios de viabilidad en muestras celulares de sangre periférica y médula ósea de donantes del grupo control y pacientes con NMPS, sometidas a tratamiento con C646, Imatinib o combinación de ambos.....	255
4.3.2.1. Estudios de viabilidad en muestras del grupo control.....	256
4.3.2.2. Estudios de viabilidad en muestras de pacientes de LMC sometidas a tratamiento con C646 y/o Imatinib.....	257
4.3.2.3. Estudios de viabilidad en muestras celulares de sangre periférica y médula ósea de pacientes con NMPS cromosoma Filadelfia negativos.....	263
4.3.3. Estudios de apoptosis por citometría de flujo en muestras celulares de sangre periférica y médula ósea de donantes del grupo control y pacientes de NMPS, sometidas a tratamiento con C646, imatinib o la combinación de ambos.....	268

4.3.3.1. Estudios de apoptosis en muestras del grupo control sometidas a tratamiento con C646.....	268
4.3.3.2. Estudios de apoptosis en muestras de pacientes de leucemia mieloide crónica sometidas a tratamiento con C646 y/o imatinib.....	275
4.3.3.3. Estudios de apoptosis en muestras de pacientes con síndromes mieloproliferativos crónicos cromosoma Filadelfia negativos (NMPs Ph-) sometidas a tratamiento con C646.....	286
4.3.3.4. Resumen de los estudios de apoptosis en muestras de donantes del grupo control y de pacientes con NMPs crónicos.....	293
4.3.4. Resumen combinado de los resultados obtenidos mediante las técnicas de viabilidad y apoptosis en las muestras celulares de los 28 individuos participantes en el presente estudio.....	297
5. DISCUSIÓN.....	302
5.1. PRIMER OBJETIVO: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS GENES DEL COMPLEJO EN NMPS AGUDIZADAS.....	302
5.2. SEGUNDO OBJETIVO: EFECTOS DE LA INHIBICIÓN DE HIPK2-P300 EN LA TRANSFORMACIÓN AGUDA DE LAS NMPS.....	308
5.3. TERCER OBJETIVO: ROL DEL COMPLEJO EN LA RESPUESTA FARMACOLÓGICA.....	322
6. CONCLUSIONES.....	330
7. BIBLIOGRAFÍA.....	336
8. ANEXOS.....	376

***GLOSARIO DE
ABREVIATURAS***

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ABL: Abelson tyrosine-protein kinase 1

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AML1: Acute myeloid leukemia 1 gene

AP: Accelerated phase (fase acelerada)

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ASXL1: Additional sex combs like 1 (Drosophila) gene

ATP: Adenosín tri-fosfato

AV: Anexina V

BAC: Bacterial Artificial Chromosome

BCL-2: B-cell CLL/lymphoma 2 gene

BCR: Breakpoint cluster región gene

Blk: B lymphoid tyrosine kinase gene

BP: Blast Phase (fase de crisis blástica)

BRCA-1: BRCA1/BRCA2-containing complex, subunit 1 gene

cADN: ADN complementario

CALR: Calreticulin gene

CB: Crisis blástica

CBF- β : Core-binding factor, subunit beta gene

CBL: Casitas B-lineage Lymphoma gene

CBP: CREB-binding protein

CDRs: Complementarity-determining regions

CEBPA (o C/EBP α): CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha gene

CEP: Centromeric probe

CES/HES: Síndrome hipereosinofílico

c-Fos: Fos Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit gene

C-GSF: Granulocyte colony-stimulating factor

c-Jun: Jun Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit gene

CLIC6: Chloride intracellular channel 6 gene

CMPDs: Chronic myeloproliferative disorders

C-MYC: MYC Proto-Oncogene, BHLH Transcription Factor gene

CNL: Chronic neutrophilic leukemia

CO₂: Dióxido de carbono

CtBP1: C-Terminal Binding Protein 1 gene

CUX1: Cut Like Homeobox 1 gene

Cxcr4: C-X-C Motif Chemokine Receptor 4 gene

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNA-PKcs: DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit gene

DNMT3A: DNA Methyltransferase 3 Alpha gen

dNTPs: Deoxyribonucleotides triphosphate

DYRK: Dual Specificity Tyrosine Phosphorylation Regulated Kinase gene

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

EP300 (o p300): E1A Binding Protein P300 gene

EPO: Erythropoietin

EPOR: Erythropoietin receptor gene

ETV6: ETS variant transcription factor 6 gene

EVI-1: Ecotropic viral integration site 1 gene

EZH2: enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit gene

FAB: French-American-British classification of AML subtypes

- FACS:** Fluorescence activated cell sorting
- FISH:** Fluorescent in situ hybridation
- FLT3:** Fms Related Tyrosine Kinase 3 gene
- FOXP1:** Forkhead Box P1
- GAG/POL:** Gen-specific antigen/ DNA polymerase gene
- GAPDH:** Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
- GATA-1:** Globin transcription factor 1
- G-CSF:** Factor estimulante de colonias de granulocitos
- G-CSFR:** Granulocyte colony-stimulating factor receptor gene
- GFP:** Green fluorescent protein
- GM-CSF:** Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
- H₂O:** Agua
- Hb:** Hemoglobin
- HIF-1 α :** Hypoxia Inducible Factor 1 gene, subunit α
- HIPK1:** Homeodomain interacting protein kinase 1
- HIPK2:** Homeodomain interacting protein kinase 2
- HIPK3:** Homeodomain interacting protein kinase 3
- HU:** Hydroxiurea
- Ic₅₀:** The half maximal inhibitory concentration
- IDH1:** Isocitrate Dehydrogenase (NADP(+)) 1 gene
- IDH2:** Isocitrate Dehydrogenase (NADP(+)) 2 gene
- IFN- α :** Interferon alpha
- Iga:** Immunoglobulin A
- IKZF1:** IKAROS Family Zinc Finger 1 gene
- IL-3:** Interleukin 3
- IM:** Imatinib

IR: Ionizing radiation

JAK1: Janus kinase 1 gene

JAK2: Janus kinase 2 gene

JNKs: Quinasas c-Jun N-terminal

KIT: KIT Proto-Oncogene, Receptor Tyrosine Kinase gene

KRAS: v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog gene

LB: Lysogeny broth médium

LDH: Lactate dehydrogenase

LEA: Leucemia eosinofílica aguda

LLA: Leucemia linfática aguda

LMA: Leucemia mieloide aguda

LMC: Leucemia mieloide crónica

LNC: Leucemia neutrofílica crónica

LNK: SH2B Adaptor Protein 3 gene

LSK: Lin-Sca1+Kit-cells

LTRs: Long terminal repeats

Lys: Lysine

MAPK-JNK: Jun N-terminal kinase/p38 mitogen-activated protein kinase

M-CSF: Macrophage colony-stimulating factor

MDM2: Mouse double minute 2 gene

MDM4: Mouse double minute 4 gene

MDS/MPN: Síndrome mielodisplásico/mieloproliferativo

MF: Mielofibrosis

MFP: Mielofibrosis primaria

MOZ: Monocytic leukemia zinc finger protein

MPL: Thrombopoietin receptor gene

- MPN:** Myeloproliferative neoplasm
- mSin3A:** SIN3 transcription regulator family member A protein
- MT2A:** Metallothionein 2A gene
- MTS:** Colorimetric method for sensitive quantification of viable cells
- NADPH:** Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
- NF-E2:** Nuclear factor erythroid 2 gene
- NK:** Natural killer cell
- NMP:** Neoplasia mieloproliferativa
- NOX1:** NADPH oxidase 1 gene
- NRAS:** Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog gene
- OMS:** Organización Mundial de la Salud
- P16 (o CDKN2A):** Cyclin dependent kinase inhibitor 2A gene
- p63 (o TP63):** Tumor protein 63 gene
- p73 (o TP73):** Tumor protein 73 gene
- PcG:** Polycomb-group proteins
- PCR:** Polymerase chain reaction
- PEI:** Polyethylenimine
- Ph:** Philadelphia chromosome
- PI:** Propidium iodide
- PML:** Promyelocytic leukemia protein gene
- PSA:** Persulfato amónico
- PTEN:** Phosphatase and tensin homolog gene
- PTMs:** Post-translational modifications
- PU.1:** Hematopoietic transcription factor PU.1 (encoded by the SPI1 gene)
- PV:** Polycythemia Vera
- PVDF:** Polyvinylidene fluoride

PVSG: Polycythemia Vera Study Group

RAS: The RAS family is a subset of the RAS small GTPase superfamily

Rb: Retinoblastoma transcriptional corepressor 1 gene

RFP: Red fluorescent protein

RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium

RUNX1: Runt-related transcription factor 1 gene

Ruxo (o Rx): Ruxolitinib

Ser: Serine

SF3B1: Splicing factor 3b subunit 1 gene

SH2B3: SH2B adaptor protein 3 gene

shRNA: Short-Hairpin RNA

siRNA: ARN de interferencia

SIRT1: Sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog)1 gene

SMD: Síndrome mielodisplásico

Src: Family of non-receptor tyrosine kinases

SRSF2: Serine and arginine rich splicing factor 2 gene

STAT: Signal transducer and activator of transcription (STAT) protein family

TBS: Tris-buffered saline buffer

TBS-T: Tween20-Tris-buffered saline buffer

TCF/LEF: Transcription factors TCF/ lymphoid enhancer binding factor 1

TE: Trombocitemia Esencial

TEMED: Tetramethylethylenediamine

TET2: Tet methylcytosine dioxygenase 2 gene

TIPA: Transcription-independent p53-induced apoptosis

TKIs: Tirosine Kinase Inhibitors

TP53 (o p53): Tumor protein 53 gene

TPO: Thrombopoietin

U2AF1: U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1 gene

UV: Ultraviolet radiation

WB: Wester Blot

Wt: wild-type

WT1: Wilms tumor 1, transcription factor gene

β -ACTINA: β -actin gene

Δ p63: Splice variant of p63 protein

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. INTRODUCCIÓN A LAS NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS

Las neoplasias hematológicas son un conjunto heterogéneo de enfermedades malignas (cánceres) en las cuales los tejidos afectados son la sangre, la médula ósea y/o los ganglios linfáticos. Su origen se debe a la expansión clonal de las células madre hematopoyéticas, siendo el estado de diferenciación y la naturaleza de las células afectadas lo que determina el fenotipo de la enfermedad. Atendiendo a este último criterio, la Organización Mundial de la Salud (OMS) las clasifica en neoplasias hematológicas de la línea mieloide y neoplasias hematológicas de la línea linfoide¹. A diferencia de lo que se observa en el caso de los tumores sólidos, las causas más frecuentes de estos trastornos son las translocaciones cromosómicas, además, como los tres tejidos involucrados están conectados mediante el sistema inmune, una enfermedad maligna hematológica que afecte a uno de ellos, afectará también en mayor o menor medida a los otros dos. Todo ello conlleva a un abordaje exclusivo en el diagnóstico y tratamiento de las neoplasias hematológicas.

1.1.1. Las neoplasias mieloides

Las neoplasias mieloides son los trastornos clonales de la hematopoyesis (**figura 1.1**) que afectan a las células madre de la línea mieloide e incluyen tres categorías clínico-patológicas: leucemia mieloide aguda (LMA), síndromes mielodisplásicos (SMD) y neoplasias mieloproliferativas (NMP). No obstante, dicha clasificación presenta ciertas incongruencias, y existen casos de síndromes que presentan características propias tanto de los SMDs como de los NMPs, por ello

se agrupan en una categoría aparte denominada síndromes mielodisplásicos/mieloproliferativos (SMD/NMP)¹⁻⁶

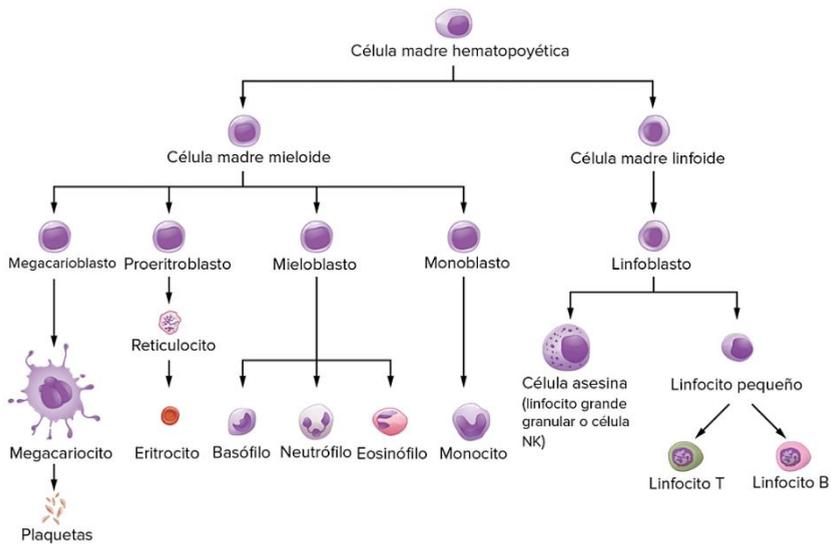


Figura 1.1 Diagrama de la hematopoyesis

1.1.2. Las neoplasias mieloproliferativas crónicas (NMPs)

Dentro de las neoplasias mieloides, las NMPs se caracterizan por una hiperproliferación clonal medular de las células hematopoyéticas de la línea mieloide, lo que genera una producción excesiva de alguno de los tipos celulares mieloides adultos (línea granulocítica, eritroide y megacariocítica) y su acumulación en médula ósea y en sangre periférica. Esto se produce como consecuencia de una hipersensibilidad o independencia a la regulación normal por citoquinas y factores de crecimiento, lo que las diferencia de las patologías reactivas. Por lo común, afecta a las fases avanzadas de la diferenciación celular, como dato diferencial con respecto a los síndromes mieloproliferativos agudos^{7,8}.

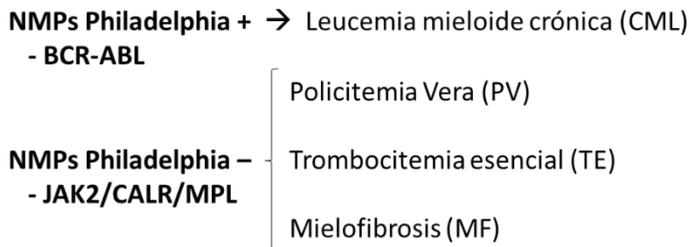
Esta proliferación medular aumentada conlleva una descompensación de los porcentajes de los diferentes tipos celulares en favor de alguno/s de ellos, lo que origina problemas asociados como citopenias, hemorragias, anemia, trombocitosis, etc. Otros síntomas asociados son la esplenomegalia (aumento del tamaño del bazo debido a la infiltración de células sanguíneas) o el aumento del porcentaje de blastos mieloides en médula ósea y sangre.

Las NMPs son por lo general, enfermedades de adultos, con edades de presentación comprendidas entre los 50 y 70 años. Constan de una fase crónica larga que a menudo puede durar bastantes años y pueden cursar con un grado variable de mielofibrosis. En su evolución tienen el potencial de sufrir progresión de la enfermedad y fallo medular debido a hematopoyesis inefectiva, mielofibrosis o transformación en una fase blástica, y posteriormente, en leucemia aguda en una proporción variable de casos, en función del tipo de neoplasia. Esta complicación suele ser letal, dada la elevada frecuencia de resistencia al tratamiento convencional⁹.

Las NMPs se clasifican según un conjunto de datos clínicos, biológicos, histológicos y moleculares. Según la clasificación de la OMS de 2016⁶, se subdividen en: leucemia mieloide crónica (LMC), policitemia vera (PV), trombocitemia esencial (TE), mielofibrosis primaria (MFP), leucemia neutrofílica crónica (LNC), leucemia eosinofílica crónica (sin ninguna otra especificación) y neoplasias mieloproliferativas crónicas no clasificables. No obstante, las cuatro NMPs clásicas son la LMC y las NMPs cromosoma Filadelfia negativas (PV, TE y MFP), que además son las cuatro NMPs más relevantes en la práctica clínica y con las que se procederá en este trabajo.

- Las NMPs clásicas (LMC, PV, TE y MFP):

Las cuatro NMPs anteriores se caracterizan por una hiperproliferación clonal medular de las células hematopoyéticas de la línea mieloide. Dependiendo del tipo celular involucrado (línea eritroide, megacariocítica o granulocítica), hablaremos de un tipo u otro de NMPs. Además, debido a que la LMC está asociada al oncogén *BCR-ABL* que se forma como resultado de la translocación cromosómica t(9;22), y que da lugar al cromosoma Filadelfia (Ph) característico de la enfermedad, las cuatro NMPs clásicas se dividen en NMPs Filadelfia positivas (LMC) y NMPs Filadelfia negativas (PV, TE y MFP).



- 1- La leucemia mieloide crónica (LMC) se corresponde con un aumento descontrolado de alguno o varios elementos precusores de la serie granulocítica, lo que da lugar a una producción excesiva de granulocitos adultos.
- 2- La policitemia vera (PV) consiste en una expansión de las células precursoras de la línea eritroide, lo que conlleva una hiperproducción y acumulación de glóbulos rojos.
- 3- La trombocitemia esencial (TE) conlleva un aumento en la proliferación de la línea megacariocítica, dando lugar a un incremento anormal en el número de plaquetas (trombocitosis).

- 4- En último lugar, la mielofibrosis primaria (MFP) se caracteriza por una proliferación predominante de megacariocitos y granulocitos en la médula ósea que se acompaña de un depósito reactivo de tejido fibroso y de hematopoyesis extramedular.

Como se ha comentado, todas ellas constan de una fase crónica que puede desembocar en una fase blástica y en leucemia mieloide aguda en algunos casos. Además, tanto la PV como la TE pueden evolucionar a mielofibrosis (lo que se denomina MF post-PV o post-TE), y ésta a su vez, a leucemia mieloide aguda⁸.

Las bases moleculares implicadas en la progresión de estas enfermedades son cada vez mejor conocidas y en los últimos años las nuevas técnicas de secuenciación genómica han aportado considerable información acerca de las alteraciones moleculares asociadas con las NMPs así como las mutaciones asociadas a la transformación aguda de éstas. Así, son frecuentes las mutaciones en diferentes genes que codifican proteínas de la maquinaria epigenética, del procesamiento del ARN, así como en determinados genes supresores de tumores y factores de transcripción^{6,10-16}.

Las NMPs no tienen una cura real, y su tratamiento va encaminado al mantenimiento de una situación clínica óptima y a paliar en la medida de lo posible los efectos de la enfermedad, con el objetivo de aumentar la calidad y la esperanza de vida de los pacientes, en un intento de “cronificar” la patología el mayor tiempo posible y evitar la agudización de ésta, que suele ser letal. La excepción la constituye la leucemia mieloide crónica (LMC) que requiere un tratamiento más agresivo.

Para ello, es de vital importancia frenar los efectos causados por las mutaciones y alteraciones genéticas y la aparición de nuevos clones. Actualmente existen terapias dirigidas a las mutaciones conductoras de las NMPs, pese a ello no son suficientes en la mayoría de los casos, ya que existe también un amplio espectro de mutaciones secundarias que puede “impulsar” la leucemización de la enfermedad. Por ello, nuevos estudios moleculares son necesarios con el fin de conocer mejor el trasfondo genético de las NMPs crónicas y de generar terapias combinadas dirigidas también a dichas mutaciones no conductoras, lo cual podría contribuir en el camino hacia la erradicación definitiva de las NMPs¹⁷.

Debido a la gran complejidad de estas patologías y a la importante carga genética de éstas, considerada cada vez más importante tanto para la explicación como para el tratamiento de este grupo de enfermedades, es indispensable situar exactamente el momento en que nos encontramos hoy en día en su conocimiento genético, con el fin de precisar el contexto en que se inserta esta investigación y la medida en que puede contribuir a avanzar en dicho conocimiento. Para ello, resulta necesario echar un vistazo al pasado, para comprender la evolución en el conocimiento de estas enfermedades. Sólo así es posible entender el presente de las NMPs crónicas y poder abordar un futuro mejor en el diagnóstico y tratamiento de este grupo de neoplasias hematológicas.

1.2. EVOLUCIÓN HISTÓRICA EN EL CONOCIMIENTO DE LAS NMPS CRÓNICAS

1.2.1. Las primeras descripciones de los síndromes mieloproliferativos crónicos

Los síndromes mieloproliferativos clásicos (LMC, PV, TE y MFP) fueron descritos por primera vez a lo largo del siglo XIX y principios del siglo XX por diversos autores como Bennett, Virchow, Heuck, Vaquez, Osler, Di Guglielmo and Epstein, siendo la LMC la primera NMP crónica en ser descrita en 1845 por Bennett (**figura 1.2**), y la TE la última en 1934¹⁸⁻²⁴. El anatomista alemán Virchow fue quien acuñó el término “leucemia” en 1847, y fue el primer autor en reconocer diferentes tipos de leucemia, distinguiendo entre leucemia linfática (linfocítica) y leucemia esplénica (granulocítica).

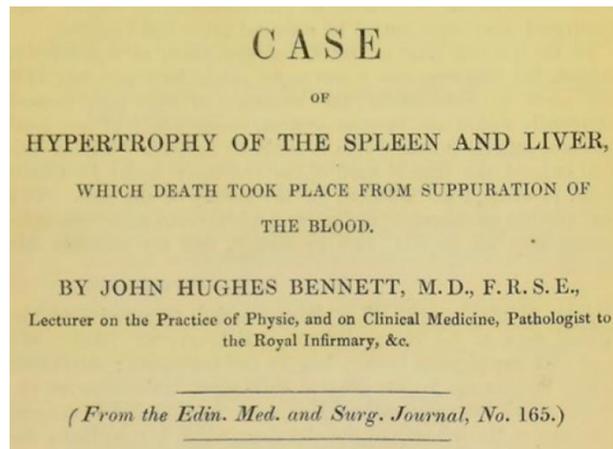


Figura 1.2 Extracto de la publicación original de 1845 de JH. Bennett del Edinburg Medical and Surgery Journal, donde se describe por primera vez la leucemia mieloide crónica.

En 1868, E.C. Neumann fue quien propuso por primera vez que las células sanguíneas se originan en la médula ósea, siendo ésta el lugar donde se alojan las “células ancestrales que dan origen a todas las células sanguíneas circulantes”; y que algunos casos de leucemias esplénicas se originan en la médula ósea y no en el bazo²⁵. Poco después, Paul Ehrlich en 1880 clasificó por primera vez a las leucemias según su origen mieloide o linfoide y fue el primero en promover la teoría de que todas las células sanguíneas se forman a partir de una célula madre hematopoyética común, antecesora de todos los linajes celulares sanguíneos²⁶.

A raíz de estas observaciones, pronto fueron llegando las primeras descripciones de las otras NMPs, de modo que en 1934 las cuatro neoplasias mieloproliferativas clásicas habían sido ya descritas. Con ello comenzaron a aparecer las primeras asociaciones que relacionaban dichas enfermedades entre ellas, hasta que en 1939, Vaughan y Harrison relacionaron la PV, TE y MPF en términos de un mismo origen, destacando que la mieloproliferación trilineal observada en sus pacientes provenía de una célula primitiva reticular común y que se debía a un único estímulo no identificado²⁷.

Sin embargo, no fue hasta 1951 cuando el hematólogo estadounidense William Dameshek, fundador de la revista *Blood*, agrupó por primera vez los cuatro trastornos bajo el término “trastornos mieloproliferativos”, como un grupo de trastornos hematológicos relacionados entre sí, con proliferación medular y características clínicas y patológicas similares²⁸ (**figura 1.3**). Dicho término incluía la leucemia mieloide crónica, policitemia vera, trombocitemia esencial, mielofibrosis primaria y eritroleucemia (síndrome de Di Guglielmo)²⁹, aunque la eritroleucemia se redefinió años después como leucemia eritroide aguda (LEA) o sus variantes.

TABLE I.—The Myeloproliferative Disorders

Syndromes	Myelostimulatory Factor's)				Potential bone marrow
	Bone marrow				Myeloid meta- plasia of spleen and liver
	Erythro- blasts	Granu- locytes	Megakaryocytes	Fibroblasts	
Chronic Granulocytic Leukemia	±	+++	+ to +++	+	++
Polycythemia Vera	+++	++	++ to +++	+ to +++	+ to +++
Idiopathic or Agnogenic Myeloid Metaplasia of Spleen	±	±	+++	+ to +++	+++
Megakaryocytic Leu- kemia	±	±	+++	+	+ to +++
Erythroleukemia (in- cluding diGiuglielmo syndrome)	+++	+	±	±	+ to +++

Degrees of Proliferation: + slight
 ++ moderate
 +++ marked

Figura 1.3 Diagrama de los síndromes mieloproliferativos extraído de la publicación original de 1951 de W. Dameshek, *Some especulations on myeloid neoplasms*.

Las siguientes frases extraídas de la publicación original de Dameshek evidencian la naturaleza de su concepto de NMPs:

“Es posible que estas diferentes condiciones -trastornos mieloproliferativos- sean, de algún modo, manifestaciones variables de la actividad proliferativa de las células de la médula ósea, quizás debido a un hasta ahora desconocido estímulo. Esto podría afectar de modo difuso o irregular a las células de la médula ósea con el resultado de que varios trastornos se produzcan, ya sea de forma clara o en forma de transición”.

Aunque Dameshek pensó que dichos estímulos iniciales desencadenantes de los NMPs consistían principalmente en hormonas esteroideas, hoy en día sabemos que la mayoría de estos estímulos son mutaciones en enzimas tirosina-quinasa, debido principalmente a eventos genéticos ocurridos en las células madre hematopoyéticas.

1.2.2. Los avances en la caracterización molecular de las NMPs. Desde Dameshek hasta Vainchenker.

Dameshek sentó las bases de la biología de los NMPs. Desde entonces hasta ahora el conocimiento de las neoplasias hematológicas ha experimentado con celeridad numerosos cambios, debido principalmente a los nuevos hallazgos en la biología molecular y clínica de dichas patologías, así como a los esfuerzos e iniciativas en el estudio de éstas, lo que ha conllevado numerosas modificaciones y una mayor claridad en la clasificación de estas enfermedades^{13,29-31}.

1- El descubrimiento del cromosoma Filadelfia (Ph)

En 1960, P. Nowell y D. Hungerford descubrieron la existencia de un pequeño cromosoma anormal existente en las células de dos pacientes con leucemia granulocítica crónica. Observaron que no todas las células poseían este cromosoma y que, por tanto, había un porcentaje de células con cariotipo normal, por lo que postularon que dicho pequeño cromosoma, al que llamaron cromosoma Filadelfia (Ph), podía tener una relación causal con la enfermedad³². Dos años más tarde vieron el mismo hallazgo en otros siete pacientes de la misma enfermedad³³, siendo ésta la primera evidencia histórica de un tipo de cáncer asociado a una anomalía genética identificada y confirmando los postulados que ya hizo anteriormente Theodore Boveri en 1914 al afirmar que posiblemente el cáncer estaba asociado a aberraciones cromosómicas³⁴.

2- La confirmación de la naturaleza clonal de las NMPs

Posteriormente al descubrimiento del cromosoma Filadelfia, el grupo de Fialkow utilizó una técnica basada en observar los polimorfismos en el locus de la enzima glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G-6-PD) del cromosoma X (técnica descrita dos años antes por Beutler and Lyon³⁵) para identificar y confirmar por primera vez la naturaleza clonal de la LMC (1967), PV (1976), MFP (1978) y TE (1981). Además, demostraron la presencia de un único isotipo de la enzima en diferentes linajes mieloides e incluso linfoides, demostrando así el origen clonal de estos procesos³⁶⁻⁴¹.

3- La creación del Grupo para el Estudio de la Policitemia Vera

Simultáneamente, en 1967 Louis R. Wasserman creó el primer grupo internacional para el estudio de la policitemia vera (PVSG), cuyo objetivo era estudiar la historia natural de la PV, establecer criterios diagnósticos y dirigir ensayos clínicos a gran escala^{42,43}. Posteriormente, la labor del grupo se amplió también al estudio de la TE⁴⁴. Dicho grupo realizó hasta 14 grandes ensayos clínicos y sentó las bases del diagnóstico y tratamiento unificado en las NMPs, realizando aportaciones hasta 1997, algunas aun válidas hoy en día, como, por ejemplo, el uso del tratamiento con hidroxurea en las NMPs Ph-neg.

4- La caracterización molecular del cromosoma Filadelfia y el descubrimiento de la translocación BCR-ABL, causante de la LMC

Unos años después del descubrimiento del cromosoma Filadelfia, varios grupos se centraron en intentar caracterizar la naturaleza de este pequeño cromosoma. En 1972, JD Rowley describía

que éste era el resultante de una translocación cromosómica entre los cromosomas 9 y 22, y que ésta era causante de la leucemia mieloide crónica⁴⁵. Además, también observó por primera vez otras translocaciones genéticas ocurridas en neoplasias mieloides (como la translocación t8;21), promoviendo el papel crucial de los cambios genéticos en la leucemogénesis.

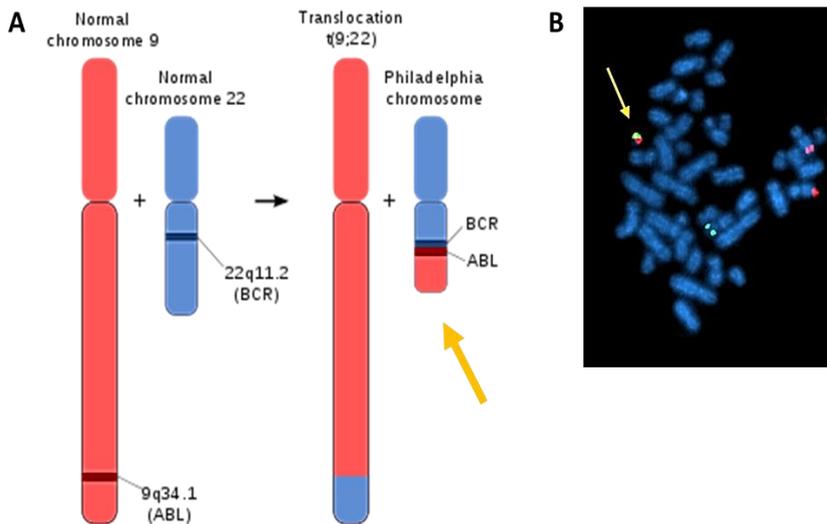


Figura 1.4 A) Esquema de la translocación entre los cromosomas 9 y 22 que da origen al cromosoma Filadelfia y al gen de fusión *BCR-ABL* causante de la LMC.

B) Imagen de hibridación *in situ* fluorescente en la que se aprecia dicha translocación y el cromosoma Filadelfia, donde se observan juntas las señales fluorescentes verde (*BCR*) y roja (*ABL*).

Durante los siguientes años, se realizaron diversas aportaciones en la caracterización de la translocación que daba origen al cromosoma Filadelfia. En 1982, se caracterizó el gen ABL humano y su involucración en la translocación t9;22^{46,47}. Se descubrió también el otro gen implicado (*BCR*) y se realizaron las primeras observaciones de

dicha fusión BCR-ABL en pacientes con LMC^{48,49}; Se caracterizó la proteína resultante de dicha fusión y se identificó como una proteína con actividad tirosina-quinasa aumentada constitutivamente⁵⁰. Además, se observaron dos tipos diferentes de proteína BCR-ABL, la P210⁵¹ que se asoció a la LMC, y la P190 que se observó en leucemia linfoblástica aguda⁵². Por último, en 1990 se demostró que la infección de células madre hematopoyéticas de ratón con el oncogén BCR-ABL producía leucémica mieloide crónica en dichos animales, estableciéndose que dicho oncogén era, *per se*, la mutación causante de la LMC⁵³⁻⁵⁵.

5- El descubrimiento del imatinib: Un cambio de paradigma en el tratamiento del cáncer

Durante décadas, la LMC fue tratada con diversos compuestos químicos como busulfán, hidroxiurea, IFN- α u otros agentes quimioterapéuticos, radiación, etc, pero en ningún momento se llegó a encontrar una alternativa eficaz contra la enfermedad que aumentara la calidad y la esperanza de vida de los pacientes, que era de unos 20 meses en aquellos tiempos. Esto cambió radicalmente cuando en 1996, Brian Druker descubrió el imatinib mesilato⁵⁶, que actúa inhibiendo el sitio de unión al ATP de la tirosina-quinasa resultante de la fusión BCR-ABL. Ello estabiliza la proteína en una forma inactiva permanente, inhibiendo la cascada oncogénica. El descubrimiento del imatinib fue un gran avance en el tratamiento de la LMC. En 2006 se publicó un estudio de seguimiento tras 5 años de tratamiento con imatinib, con valores de supervivencia y tasa de remisión citogenética del 87%, y una remisión molecular de la enfermedad en el 80% de los casos⁵⁷. No obstante, aunque la esperanza y la calidad de vida de los pacientes en fase crónica ha

aumentado considerablemente, sigue siendo necesaria la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas y biomarcadores, ya que el imatinib es menos efectivo cuando la enfermedad evoluciona a la fase blástica⁵⁸; además, en ocasiones pueden surgir resistencias a imatinib debido a mutaciones puntuales en la oncoproteína BCR-ABL, que a veces permanecen sensibles a los inhibidores de segunda generación⁵⁹⁻⁶¹.

El descubrimiento del imatinib supuso un hito en el tratamiento de la LMC y, en general, en el tratamiento del cáncer.

6- La clasificación de la OMS de 2001 de las neoplasias hematológicas:

Debido a la rápida evolución en el conocimiento de las neoplasias mieloides, existía creciente necesidad de recopilar los nuevos hallazgos moleculares acerca de estas patologías. Por ello, en 2001, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó su primera versión para la clasificación de las neoplasias mieloides². Ésta incluía el término creado por Dameshek para la categoría de neoplasias mieloproliferativas crónicas (CMPDs), añadiendo a dicha categoría la leucemia neutrofílica crónica (LNC), la leucemia eosinofílica/síndrome hipereosinofílico (CES/HES), y los síndromes mieloproliferativos crónicos no clasificables (CMPD, unclassificable). Finalmente, las CMPDs fueron consideradas una de las cuatro principales categorías dentro de las neoplasias mieloides crónicas, junto con los SMD, SMD/MPN y la mastocitosis (mast cell disease, MCD).

7- Vainchenker y la era de las mutaciones de JAK2

En los últimos quince años, la biología molecular ha ido progresivamente tomando un papel fundamental en el diagnóstico de

las NMPs. Cada vez se conocen mejor los trastornos genéticos asociados a estas enfermedades, permitiendo una mejor clasificación y un tratamiento más eficaz⁶².

Así, en 2005, se produjo un hallazgo que cambiaría totalmente el panorama del conocimiento y la patogenia de las NMPs Ph-neg (MFP, TE y PV): El grupo de William Vainchenker descubría que la mayoría de los pacientes que padecían NMPs Ph-neg albergaba una mutación genética en el gen *JAK2*⁶³. Curiosamente, el mismo hallazgo fue descrito de manera independiente por otros tres grupos casi simultáneamente⁶⁴⁻⁶⁶. Dicha mutación (*JAK2V617F*) consiste en el cambio de una guanina por una timidina en la posición 1849 (exón 14) del gen *JAK2*. Este gen codifica para una proteína tirosina-quinasa que forma parte de la vía de transducción de señales JAK-STAT, que utilizan los receptores de citoquinas tipo I como el receptor de la EPO, G-CSF, GM-CSF o la TPO. La mutación *JAK2V617F* conlleva el cambio de una valina por una fenilalanina en la posición 617 de la proteína, produciendo una ganancia de función en ausencia del ligando al receptor hematopoyético y conllevando una activación constitutiva de esta ruta de transducción de señales.

La citada mutación se presenta con unas frecuencias de un 95% en los pacientes de PV^{67,68}, y entre un 50 y un 60% en los de TE y MFP. Además, también ha sido detectada en otras neoplasias mieloides, como en NMPs atípicas (hasta en un 30-50% en ciertos casos), en SMD no clásicos (20%) y en ciertos casos de LMA o SMD de novo (3%). La mutación *JAK2V617F* no ha sido detectada en ninguna neoplasia no mieloides.

La mutación *JAK2V617F* sería considerada como la primera mutación conductora de los NMPs, ya que su presencia en las células progenitoras mieloides es suficiente para que se desencadene el

desarrollo de una NMP Ph-neg. Además, dicha mutación sería incorporada como criterio diagnóstico en la siguiente clasificación de las neoplasias mieloides de la OMS¹.

1.2.3. La complejidad genética de las NMPs: Avances en su caracterización molecular desde Vainchenker hasta la actualidad.

1.2.3.1. Otras mutaciones conductoras diferentes a JAK2V617F

A raíz del descubrimiento de la mutación *JAK2V617F*, la caracterización molecular de las NMPs Ph- comenzó a acotarse cada vez más y su estudio ha ido cobrando cada vez más importancia. Esto es fundamental para entender y abordar el funcionamiento de estas patologías, ya que hasta en el 97% de ellas se presentan mutaciones somáticas, muchas de las cuales influyen notablemente en el pronóstico y/o tratamiento de las NMPs¹⁵.

A partir de este momento, las nuevas mutaciones que se irían descubriendo se clasificarían como mutaciones conductoras (su sola presencia es suficiente para el desarrollo de una NMP Ph-neg), o mutaciones secundarias (contribuyen al desarrollo neoplásico y a su gravedad, pero necesitan de más mutaciones, especialmente de una conductora, para que se desarrolle la enfermedad).

- Mutaciones en el gen MPL:

En 2006, el grupo de Gary Gilliland halló una nueva mutación en el gen que codifica para el receptor de trombopoyetina (*MPL*) en algunos casos de MFP negativos para la mutación *JAK2V617F*⁶⁹. La nueva mutación (*MPLW515L*) se une a otras tres que fueron descritas posteriormente en el gen *MPL* también en pacientes negativos para la

mutación de *JAK2* (*MPLW515K*, *MPLW515A* y *MPLW505N*). Todas ellas son mutaciones de ganancia de función que también activan constitutivamente la ruta de transducción JAK-STAT en ausencia de ligando, por lo que las mutaciones en *MPL* se considerarían el segundo grupo de mutaciones conductoras de los NMPs Ph-neg.

Las mutaciones en el gen *MPL* se han descrito en un 5-10% de los casos de MFP y un 1-5% de los casos de TE, mientras que no se aparecen en pacientes de PV, lo que sugiere que éstas mutaciones favorecerían el desarrollo de la línea megacariocítica más que la eritroide⁷⁰. Aunque las mutaciones en *MPL* se observan en pacientes negativos para la mutación *JAK2V617F*, en el mismo año 2006 se detectó que ambas mutaciones podrían coexistir en un pequeño porcentaje de pacientes de MFP⁷¹, lo que indica la gran complejidad genética de estos trastornos clonales de la hematopoyesis.

- Mutaciones en el exón 12 del gen JAK2:

Dos años tras la identificación de la mutación *JAK2V617F*, en 2007, se describieron otras mutaciones en el mismo gen, pero en el exón 12, en casos de PV y eritrocitosis idiopática negativas para *JAK2V617F*⁷². Se observaron hasta cuatro mutaciones distintas en hasta un 3% de los pacientes de PV⁷³ y todas ellas producen un efecto similar al de la mutación *V617F*, activando constitutivamente la ruta JAK-STAT, por lo que las mutaciones en el exón 12 de *JAK2* se consideran también mutaciones conductoras de estas neoplasias. No obstante, estas mutaciones parecen estar asociadas a un fenotipo más eritroide y no se han descrito en casos de TE o MFP.

- *La segunda clasificación de la OMS de las neoplasias hematológicas (2008):*

En septiembre de 2008 se publicó una nueva clasificación de la OMS¹ que incluía los nuevos hallazgos para un mejor diagnóstico de las neoplasias hematológicas. En ella se establece que la diversidad fenotípica de las NMPs crónicas se debe a diferencias en los reordenamientos genéticos o mutaciones que subyacen a la mieloproliferación clonal, añadiendo las nuevas mutaciones en *JAK2* y *MPL* como criterios diagnósticos de las NMPs Ph-neg. Ambas mutaciones se originarían en una célula madre hematopoyética en las etapas tempranas de la diferenciación y conllevan activación constitutiva de la ruta JAK-STAT⁶⁶ (mutaciones conductoras). Son capaces de inducir una PV (*JAK2*) o una MFP (*MPL*) en ratones, y son vulnerables al tratamiento con inhibidores de JAK2⁷⁴. Así pues, el descubrimiento de estas mutaciones supuso un cambio radical en el conocimiento y el diagnóstico de las NMPs cromosoma Ph-^{75,76}.

Durante los años posteriores a dicha clasificación, nuevas mutaciones con prevalencia importante en las NMPs Ph-neg han sido descritas, especialmente la mutación en *CALR*, acotando todavía más el diagnóstico y clasificación de estas patologías.

- *Mutaciones en el gen CALR:*

Las mutaciones en el gen de la calreticulina (*CALR*) son el tercer tipo de mutación más importante para el diagnóstico de las NMPs Ph-neg. Fueron descubiertas recientemente (2013) y afectan al último exón del gen (exón 9), provocando un truncamiento prematuro de la proteína. La proteína CALR mutante se une al receptor MPL, activándolo de forma permanente en ausencia de ligando,

produciendo por tanto activación constitutiva de la ruta JAK-STAT, y formando el tercer grupo de mutaciones conductoras de las NMPs Ph-neg junto a (*JAK2* y *MPL*). Las mutaciones en *CALR* Se han descrito en un 70% de los pacientes con TE y MFP negativos para mutaciones en *JAK2* y *MPL* (25% del total de pacientes con TE y 35% de los pacientes de MFP), por lo que su papel como marcador diagnóstico en los NMPs Ph-neg es fundamental^{77,78}.

- *Mutaciones conductoras de los NMPs Ph-neg: JAK2, MPL y CALR:*

Las mutaciones en los genes *JAK2*, *MPL* y *CALR* son capaces de producir por sí mismas el desarrollo de un NMP Ph-neg, y son mutaciones exclusivas de estas enfermedades. Por ello se denominan mutaciones conductoras (*driver mutations*) de los NMPs Ph-neg. Actúan sobre la misma ruta de señalización, la ruta JAK-STAT, y mediante estas tres mutaciones es posible diagnosticar el 95% de los casos de NMP Ph-neg, evidenciando la importancia de dicha ruta en el desarrollo de estas patologías, independientemente de si la mutación conductora se encuentra en *JAK2*, *MPL* o *CALR*^{14,17,78}.

La ruta JAK-STAT se activa mediante los tres principales receptores mieloides de citoquinas EPOR, MPL y G-CSFR, los cuales están relacionados con la eritropoyesis, trombopoyesis y granulopoyesis, respectivamente. Las mutaciones en *JAK2* afectan a los tres tipos de receptores/procesos, lo que explica que se puedan encontrar en PV, TE y MFP. Por otro lado, las mutaciones en *MPL* y *CALR* actúan sobre el receptor de trombopoyetina MPL, por ello sólo se encuentran presentes en TE y PMF¹⁴ (**figura 1.5**).

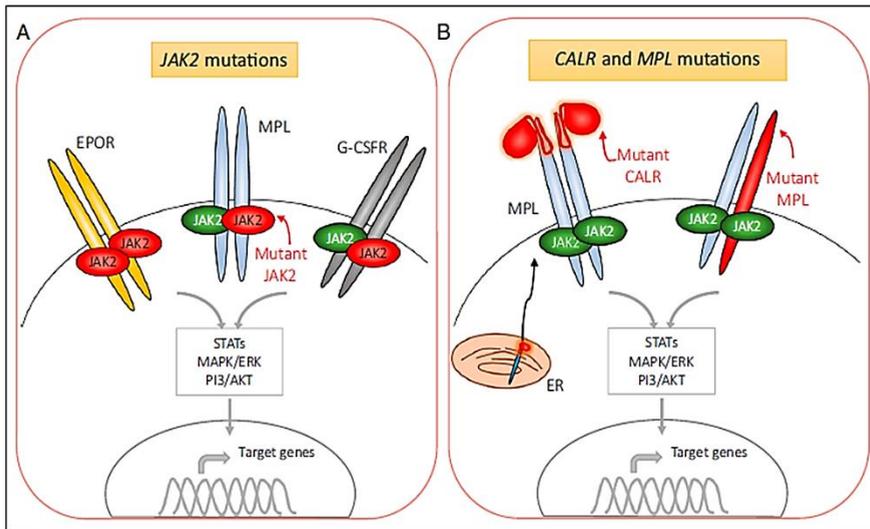


Figura 1.5 Las mutaciones en *JAK2*, *CALR* y *MPL* conducen a una mieloproliferación excesiva mediante la activación constitutiva de la ruta JAK-STAT. A) La forma mutante de *JAK2* (rojo) se activa constitucionalmente y produce niveles variables de proliferación y diferenciación eritroide y megacariocítica y, en menor medida, granulocítica. B) Las mutaciones en *CALR* y *MPL* resultan ambas en una activación de *JAK2* por medio de la activación de *MPL*. Las proteínas *CALR* mutadas se unen a los receptores *MPL* en el retículo endoplasmático, durante la síntesis de éstos. (extraído de Nangalia, J and Green, A, 2017).

Para entender el modo en el que las mutaciones conductoras influyen en el fenotipo de la enfermedad (en su fase crónica), en la **figura 1.6** se muestra un esquema de cómo las mutaciones en *JAK2/CALR/MPL* “conducirían” la hematopoyesis hacia una mayor trombocitosis (donde el extremo sería la TE) o eritropoyesis (máximo nivel en la PV). Entre ambos extremos habría un amplio espectro en el que también se vería afectada en mayor o menor grado la granulopoyesis. El fenotipo final de la enfermedad estaría influenciado por el tipo concreto de mutación conductora y la línea germinal, la aparición de otras mutaciones somáticas, así como otros factores entre los que se encuentra la homocigosidad de las mutaciones, el

sexo del individuo y factores específicos como el nivel de eritropoyetina, el nivel de hierro, o la función renal.

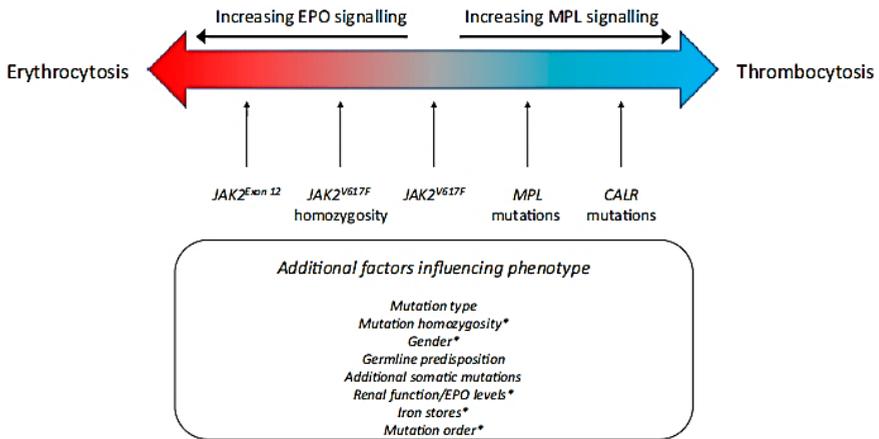


Figura 1.6 Presentación clínica de la fase crónica de los NMPs en relación al tipo de mutación conductora (extraído de Nangalia, J and Green. A, 2017).

Las mutaciones en *JAK2/CALR/MPL* serían incorporadas más adelante como criterio diagnóstico fundamental en la clasificación de las neoplasias hematológicas de la OMS del año 2016⁶.

A pesar de todo lo anterior, existe un 10% de los casos de TE y MFP que son negativos para las tres mutaciones anteriores, lo que se denomina NMPs Ph-neg “triple negativas”^{78,79}. En este 10% de pacientes, aún no son conocidas las causas conductoras de la enfermedad, siendo un grupo especial en el que cada paciente presenta un conjunto diferente de mutaciones no conductoras¹⁷.

1.2.3.2. Mutaciones no conductoras (secundarias) descritas en las NMPs Ph negativas.

Debido a la complejidad genética de estas patologías, existen otras muchas mutaciones somáticas que, aunque ni conductoras ni exclusivas de los NMPs, contribuyen a la patogenia, diagnóstico y pronóstico de estas enfermedades. Bien porque están relacionadas directamente con los tres conductores de la enfermedad (activando la misma ruta, como *SH2B3* y *CBL*), bien porque activan otras rutas relacionadas⁸⁰. En consecuencia, es importante averiguar la contribución de estas otras mutaciones en la patogenia de los NMPs.

Existe un elevado número de genes que pueden presentar mutaciones no conductoras y, aunque su prevalencia en los pacientes de NMPs no es tan importante como la de *JAK2/MPL/CALR*, casi todos los pacientes con NMPs presentan al menos una de ellas. Puesto que muchos de estos genes se han asociado a una mayor probabilidad de agudización de la enfermedad (*EZH2*, *ASXL1*, *TP53*), su estudio conjunto por secuenciación es importante para el conocimiento del proceso leucemogénico y es de gran relevancia en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de estas patologías^{14,81}. De hecho, más del 50% de los pacientes con PV o TE presentan una o más de éstas mutaciones aparte de las mutaciones conductoras^{82,83}, incrementándose este porcentaje hasta un 81% y un 93,5% en el caso de los pacientes con MFP, o con MF post-PV o post-TE⁸³⁻⁸⁵.

Así, la heterogeneidad y el pronóstico de los NMPs clásicos están determinados por un perfil genético en el que influye el tipo de mutación conductora, su asociación con otras mutaciones, y el orden de aparición, siendo cada caso molecularmente único¹⁴. Así, es interesante señalar los datos de un reciente estudio de 2016¹⁶ en el que se realizó un panel de secuenciación de 28 genes típicamente

alterados en estas patologías en un grupo de 100 pacientes (40 pacientes con TE, 30 PV, 30 MFP), mostrando los resultados que el 53% del total de los pacientes presentaban mutaciones en dos o más de los genes analizados.

Según la función de los genes afectados, se pueden clasificar éstos en varios grupos: genes involucrados en la señalización intracelular, en el procesamiento del ARN mensajero, en la regulación epigenética, y genes que codifican para factores de transcripción.

En el mismo estudio se vio que los genes involucrados en el procesamiento del ARN mensajero (*SF3B1*, *SRSF2* y *U2AF1*) se encontraban mutados con mucha más frecuencia en MFP que en TE, mientras que no existían casos de mutaciones en estos genes en PV. Los genes involucrados en el procesamiento de la cromatina *ASXL1* y *EZH2* se encontraban mutados también con mucha más frecuencia en MFP respecto a TE y PV; y los genes encargados de la metilación del ADN (*DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2* y *TET2*) se presentaban mutados con mucha más frecuencia en PV, y mucho menos en TE y MFP.

Cabe señalar que desde el año pasado se ha establecido que la aparición de mutaciones somáticas (así como aberraciones cromosómicas) en los pacientes con NMPs Ph-neg, es directamente proporcional a la edad de los individuos (**figura 1.7**). Así, a mayor edad, mayor probabilidad de aparición y acumulación de mutaciones somáticas puntuales (asociado normalmente a peor pronóstico)⁸⁶.

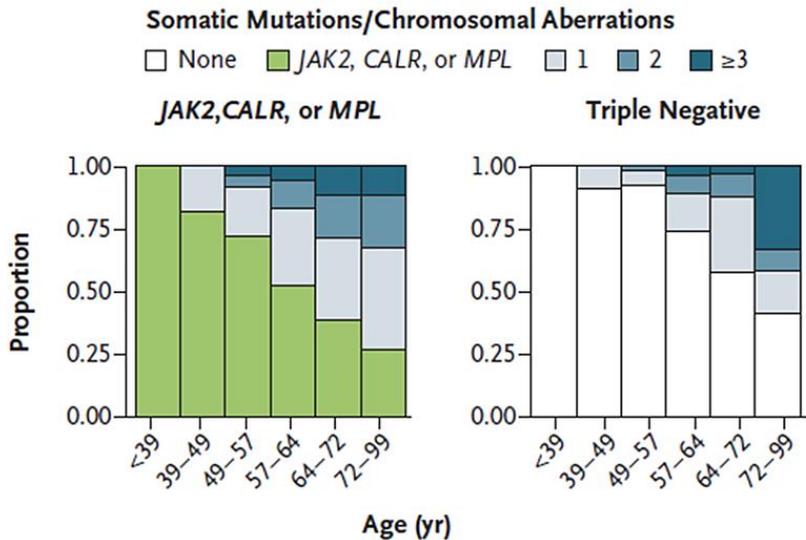


Figura 1.7 Frecuencia de aparición de mutaciones somáticas y aberraciones genéticas en pacientes con NMPs Ph-neg según la edad de los individuos. En blanco, sin mutación; en verde, mutación conductora (*JAK2/CALR/MPL*); En azul, presencia de 1, 2 o ≥ 3 mutaciones somáticas no conductoras. Extraído de *J. Grinfeld, J. Nangalia. 2018*).

Clasificación de las Mutaciones secundarias más frecuentes:

1- Genes implicados en señalización intracelular:

LNK (SH2B3): Las mutaciones en *LNK* son importantes en la hematopoyesis regulando negativamente a *JAK2*^{11,12,87}. Se describen con baja frecuencia en pacientes de TE, MFP y eritrocitosis; y con una mayor frecuencia en transformaciones a leucemia aguda (13%).

CBL: Este gen interviene en la ubiquitinación, internalización y degradación de receptores activados (*MPL, KIT* y *FLT3*) y de proteínas tirosina-quinasas (incluida *JAK2*). Se detectan mutaciones en *CBL* en un 5-10% de pacientes con MF, mientras que su presencia en PV o TE es muy rara¹⁰⁻¹². Además, se han encontrado mutaciones en este gen en

un 13% de las leucemias agudas post-NMP⁸⁸, pudiendo ser importante en la transformación leucémica.

2- Genes implicados en la regulación epigenética:

TET2: Gen con un papel importante en la desmetilación de citoquinas. Presenta mutaciones en un 14% de las NMPs Ph-neg, siendo éstas menos frecuentes en la TE que en la PV o MFP, donde llega a estar mutado en un 20% de los casos^{10,78,89}. Las mutaciones de *TET2* podrían ser importantes en el inicio de la hematopoyesis clonal tras el envejecimiento, junto con las de *ASXL1* y *DNMT3A*⁹⁰⁻⁹².

DNMT3A: Codifica para una proteína metiltransferasa y se presenta mutado en un 10% del total de pacientes con NMPs Ph-neg. La prevalencia en MFP y en casos de transformación blástica es del 15%. La frecuencia en TE es de un 3% y en PV, de un 7%^{12,93,94}.

ASXL1: Implicado en el remodelamiento de la cromatina. Presenta mutaciones en un 13-20% de los pacientes de MFP. La frecuencia de estas mutaciones en PV y TE es menor del 5%¹⁰⁻¹².

IDH e *IDH2*: Implicados en la transformación de NADP+ a NADPH y relacionados con la inhibición (hipermetilación) de los genes de la familia *TET* (como *TET2*). Las mutaciones en *IDH1/2* y *TET2* son mutuamente excluyentes y ambas tienen patrones similares de hipermetilación, indicando que ambos genes podrían actuar sobre el mismo mecanismo leucemogénico en las NMPs Ph-neg. Las mutaciones en *IDH1/2* son raras en la fase crónica (0,8-4,2%), pero se presentan en un 22% de las NMPs en fase blástica y se asocian con la transformación mielofibrótica y con un mal pronóstico^{10,12,95-99}.

EZH2: Codifica para una metiltransferasa y forma parte del complejo de genes represores de la transcripción (PcG). Presenta mutaciones en un 8% de las NMPs Ph-neg, donde se asocia como supresor de tumores. En MPF la incidencia es del 6-13%, mientras que en PV es del 1-3%. Está asociado a mal pronóstico^{11,100,101}.

3- Genes implicados en el procesamiento del ARN mensajero:

SF3B1, *SRSF2* y *U2AF1*: Se detectan mutaciones en estos genes principalmente en MFP, aunque también en PV y ET en fases avanzadas, pero no han sido asociados con la transformación blástica^{12,84,102-104}. En el caso de *U2AF1*, la frecuencia total en los pacientes de NMPs Ph-neg es menor del 3%. En el caso de *SF3B1*, ésta es de un 10% (4-7% en MFP y 3% en TE). En cuanto a *SRSF2*, la prevalencia es de un 17% de los casos de MFP y parece que podrían estar asociados con un peor pronóstico, siendo su frecuencia de hasta un 19% en los casos de LMA post-NMP.^{105,106}

4- Genes que codifican para factores de transcripción:

En las NMPs se han encontrado múltiples CDRs (regiones comunes delecionadas) que afectan a veces a un solo gen, siendo este el caso de los genes *RUNX1*, *IKZF1*, *CUX1*, *TP-53* o *ETV6* entre otros. *IKZF1* y *CUX1* se encuentran ambos en el cromosoma 7, cromosoma donde son muy comunes las deleciones en las NMPs y en general en los trastornos hematológicos^{107,108}.

El gen *IKZF1* (*Ikaros*) está implicado en la diferenciación linfoide. No obstante, se han descrito deleciones para dicho gen en un

21% de pacientes de NMPs Ph-neg en fase blástica, aunque no en fase crónica^{10,11}, por lo que se asocia a la transformación leucémica.

El gen *RUNX1* (*AML1*) tiene un papel clave en la hematopoyesis y leucemogénesis, y es uno de los genes más frecuentemente desregulados en leucemia. Se encuentra muy frecuentemente sobreexpresado en pacientes con NMPs crónicas y se asocia a la transformación leucémica, estando mutado hasta en un 15-30% de los casos de LMA post-NMP^{8,109-112}.

El gen *NF-E2* ha sido recientemente descrito como posible diana mutacional en pacientes con NMPs crónicas, aunque su frecuencia mutacional es baja, de sólo un 2-3% de los casos de PV y MFP¹¹³. No obstante, *NF-E2* se encuentra sobreexpresado en una gran proporción de pacientes de NMPs, y se asocia a una cooperación con *JAK2V617F* y a un aumento del fenotipo de las NMPs¹¹⁴. La sobreexpresión de *NF-E2* ha sido asociada a la expresión de *RUNX1*. De hecho, ambos genes interactúan entre sí siendo este último junto con su cofactor *CBF-β* el que media la sobreexpresión de *NF-E2*. Se han visto casos en NMPs en las que un funcionamiento aberrante de *RUNX1* (o de *CBF-β*) desemboca en una sobreexpresión de *NF-E2*, contribuyendo a la fisiopatología de las NMPs^{113,115-117}.

El gen supresor de tumores *TP-53* es uno de los genes más asociados a la progresión de las NMPs y a un peor pronóstico. Las deleciones en *TP-53* son raras en la fase crónica (1,6%), pero su frecuencia aumenta dramáticamente durante la transformación leucémica, hasta un 27-30% en las LMAs post-NMPs. Las mutaciones heterocigotas suelen ocurrir en la fase crónica, mientras que las homocigotas se dan frecuentemente en las LMAs post-NMPs⁸.

5- Nuevos candidatos a biomarcadores descritos en el último año:

En este mismo año 2019, se ha descrito el posible papel como biomarcador de nuevos genes relacionados con el pronóstico o la clasificación de las NMPs, como *PTEN*, *WT1*, *GATA-1*.

PTEN es un gen supresor de tumores que suele estar desregulado, inhibido o delecionado en muchos cánceres. En la LMC, el oncogén *BCR-ABL* regula negativamente a *PTEN*, lo cual influye en la progresión de la enfermedad. Muy recientemente se ha descrito un polimorfismo en este gen que se encuentra en los grupos de más riesgo. Dicho polimorfismo (denominado *PTEN-long*, por la mayor longitud del transcrito) se ha asociado al mal pronóstico de la LMC y al mayor riesgo de progresión de la enfermedad¹¹⁸.

El factor de transcripción *WT1* participa en el desarrollo de muchas enfermedades. Recientemente se ha observado altamente expresado en las NMPs Ph-neg, especialmente en aquellas con peor pronóstico. La expresión más alta se da en PMF, seguida por la PV y TE. Además, aumenta durante la progresión mielofibrótica o leucémica (llegando al pico de expresión en la LMA), mientras que se mantiene estable cuando éstas no progresan. Por ello, *WT1* es un gen a tener en cuenta en el pronóstico y seguimiento de las NMPs¹¹⁹.

Por último, el factor de transcripción hematopoyético *GATA-1* (el cual regula a *NF-E2*) determina la diferenciación de los linajes eritroide y megacariocítico durante la hematopoyesis. Se ha observado que su expresión es muy alta en TE, mientras que es baja en MF. Además, es independiente de las terapias citorreductoras y del estado mutacional del individuo, pudiendo ser importante como biomarcador en TE y para la diferenciación diagnóstica de TE y MF¹²⁰.

En la **figura 1.8** se muestra un esquema de algunos de los genes involucrados en la fisiopatología y en la transformación leucémica de las NMPs PH-neg.

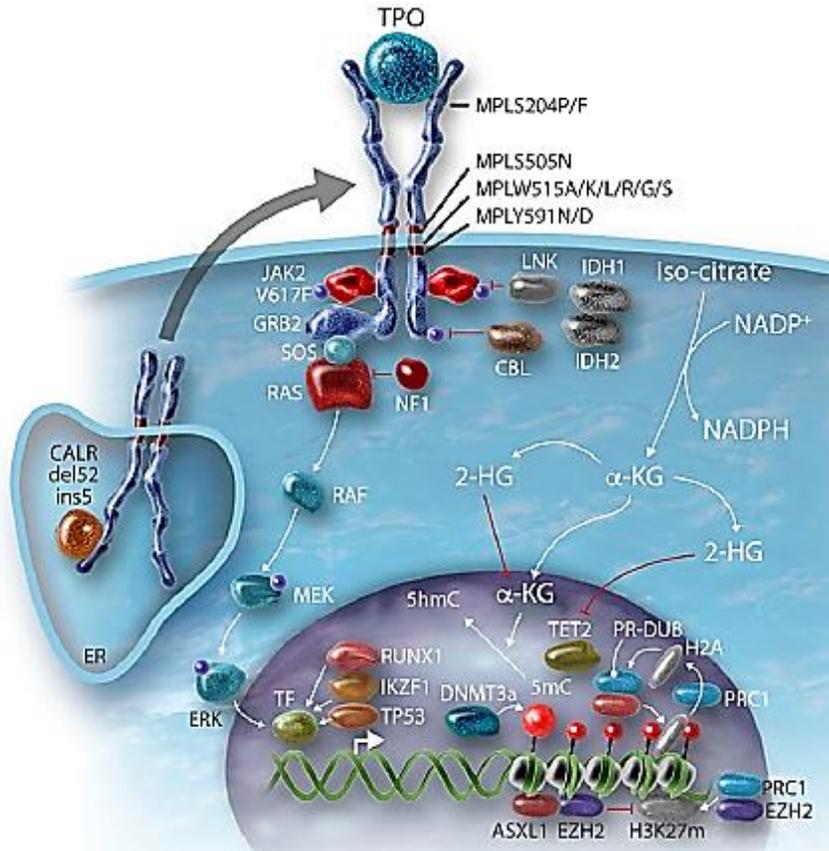


Figura 1.8 Esquema de la relación entre los genes involucrados en la regulación epigenética y en la transformación leucémica de los NMPs Ph-neg (extraído de Vainchenker W. and Kralovics R. 2017).

1.3. LAS NMPs CRÓNICAS EN LA ACTUALIDAD

Debido a la creciente complejidad de la fisiopatología de las NMPs crónicas, especialmente las NMPs Ph-neg, la OMS publicó en 2016 la última versión de su clasificación de las neoplasias mieloides⁶, la cual recoge todos los hallazgos moleculares descritos anteriormente. Del mismo modo, en 2018 la *European LeukemiaNet* publicó su última guía de recomendaciones para el diagnóstico y el manejo clínico y molecular de las NMPs Ph-neg.

Mientras que en clasificaciones anteriores se establecía que las mutaciones *JAK2/CALR/MPL* eran de tipo clonal, originándose de manera temprana en clones mayoritarios de la hematopoyesis, actualmente se conoce también la existencia de algunos casos en los que estas mutaciones conductoras son adquiridas posteriormente en la jerarquía clonal, y son precedidas de otras aberraciones moleculares, los llamados eventos “pre-*JAK2*”^{10-12,121,122}. Así, el orden de aparición de algunas mutaciones en relación con las mutaciones conductoras influye en el desenlace final de la enfermedad. Por ejemplo, algunos estudios han demostrado que el orden de adquisición de *JAK2V617F* con respecto a las mutaciones en los genes *TET2* y *DNMT3A* influye en la biología de las células madre y células progenitoras, la evolución clonal, la forma en la que la enfermedad se presenta, la respuesta a las terapias y su resultado clínico^{14,123,124}.

Según las últimas clasificaciones, el diagnóstico de la LMC se puede conocer hasta en el 99% de los casos debido a la presencia de la translocación BCR-ABL, y el diagnóstico molecular de las NMPs Ph-neg se puede realizar en el 95% de los casos mediante secuenciación de los genes *JAK2*, *MPL* y *CALR* (**figura 1.9**). No obstante, cada vez existe mayor unanimidad en cuanto a la importancia de las mutaciones

no conductoras en el diagnóstico y el pronóstico de las NMPs, así como en la respuesta a los tratamientos.

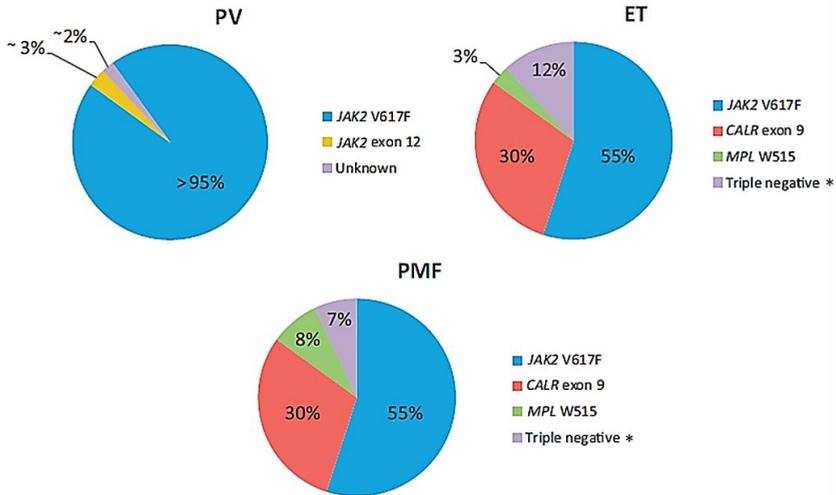


Figura 1.9 Frecuencias aproximadas de las mutaciones conductoras (JAK2/CALR/MPL) en los NMPs Ph-neg (extraído de G.C. Caponetti, A. Bagg. 2019).

* Los casos triple negativos pueden albergar también mutaciones somáticas no conductoras.

Esto se debe no sólo a que el patrón mutacional de las NMPs es diferente en cada una de ellas¹⁶, sino también a que las diferentes mutaciones tienen distinta importancia dependiendo de la neoplasia de que se trate, e incluso dentro de la misma, el patrón mutacional ayuda a distinguir las diferentes opciones en las que ésta se puede presentar, su pronóstico o la posible resistencia al tratamiento. Por ejemplo, las mutaciones en *ASXL1*, *SRSF2*, e *IDH2* son de mal pronóstico en PV; las mutaciones en *SH2B3*, *SF3B1*, *U2AF1*, *TP53*, *IDH2*, y *EZH2*, junto con una elevada carga mutacional de JAK2V617F son de

mal pronóstico en TE; y, por último las mutaciones en *ASXL1*, *SRSF2*, *EZH2*, y *IDH1/2* son indicadoras del pronóstico de la MF^{125,126}.

Debido a que las NMPs crónicas son “tumores líquidos”, su observación y seguimiento sólo puede realizarse por citometría de flujo o mediante cuantificación y secuenciación de los marcadores moleculares y sus frecuencias alélicas. La cuantificación de la carga alélica es una medida indirecta de la carga tumoral, siendo de gran importancia en el diagnóstico, durante el tratamiento y tras éste, permitiendo conocer la respuesta y la carga residual tras la terapia, así como anteponerse a posibles recaídas. Cuando las frecuencias alélicas para estas mutaciones son menores del 5%, sólo pueden ser detectadas mediante secuenciación masiva NGS (*next generation sequencing*). Por todo ello, la clasificación de la OMS otorga una elevada relevancia al análisis genético para el diagnóstico y pronóstico en las NMPs crónicas, recogiendo en su clasificación de 2016 las mutaciones descritas y reconociendo la importancia pronóstica de algunas de ellas como *TP53*, *ASXL1* y *EZH2*⁶.

1.3.1. Clasificación actual de las neoplasias mieloproliferativas

Según una serie de datos moleculares, fisiológicos, clínicos e histológicos y basándose en la clasificación de la OMS de 2016, es posible clasificar a las neoplasias mieloproliferativas en siete grupos distintos (se excluye la mastocitosis en esta clasificación respecto a la de 2008) (**tabla 1.1**).

Tabla 1.1 Clasificación de la OMS de las NMPs (2016)

Neoplasias mieloproliferativas (MPN)

- 1- Leucemia mieloide crónica (LMC), BCR-ABL+
- 2- Leucemia neutrofilica crónica (LNC)
- 3- Policitemia vera (PV)
- 4- Mielofibrosis primaria (MFP)
 - 4.1- MFP en fase inicial/prefibrótica
 - 4.2- MFP en fase establecida
- 5- Trombocitemia esencial (TE)
- 6- Leucemia eosinofílica crónica (sin otra especificación)
- 7- MPN no clasificable

1.3.1.1. La leucemia mieloide crónica (LMC)

La leucemia mieloide crónica (también llamada leucemia mielógena o granulocítica crónica) se caracteriza por una proliferación descontrolada de las células hematopoyéticas mieloides de origen granulocítico en la médula ósea y es uno de los cánceres mejor caracterizados molecularmente hasta la fecha. Su firma molecular es la translocación recíproca entre los cromosomas 9 y 22, que da lugar al cromosoma Filadelfia característico de la LMC. Dicha translocación resulta en la fusión de los genes *BCR* (cr.22) y *ABL* (cr.9), lo que origina el oncogén *BCR-ABL* que da lugar a la proteína de fusión con mismo nombre. Esta proteína de 210 KDa (p210) posee actividad tirosina-quinasa constitutiva y es la causante de la enfermedad^{6,7}. Así, la LMC es la única NMPs en la que la presencia de una anomalía genética constituye un criterio *sine qua non* de diagnóstico, estando presente en más de un 99% de los casos¹²⁷. La patogenia de la LMC está muy estudiada, sin embargo, se desconoce el mecanismo que origina dicha translocación.

La LMC es más frecuente en adultos, con una media de edad al diagnóstico de entre 60 y 65 años en Europa, aunque es considerablemente más baja en países con una población general más joven. Es más común en hombres que en mujeres. Además, las mujeres tienen una supervivencia mayor a la enfermedad. La incidencia global de la LMC es de 1-2 casos nuevos por cada 100.000 habitantes al año en todo el mundo, sin ninguna diferencia racial o étnica apreciable¹²⁸. Sin embargo, algunos estudios han reportado que la enfermedad es más común en países desarrollados, posiblemente debido a la mayor esperanza de vida de sus habitantes. La prevalencia global de la LMC es de entre 10 y 12 individuos diagnosticados con LMC por cada 100.000 habitantes, aunque está aumentando cada vez más debido al aumento de la esperanza de vida que se ha conseguido con la terapia dirigida¹²⁹, lo que podría ser un problema de salud pública en el futuro. Solamente en EE.UU, se prevé que para el año 2030 el número de individuos diagnosticados con LMC sea de 100.000, el doble que en 2016^{130,131}.

Clínicamente, la leucemia mieloide crónica se divide en tres fases, fase crónica, fase acelerada y fase blástica o crisis blástica⁷:

- a) Fase crónica: Hasta el 50% de los pacientes son asintomáticos al comienzo de esta fase, y cuando los síntomas comienzan a aparecer, suelen ser no específicos: esplenomegalia, fatiga, pérdida de peso, sudoración nocturna, anemia y en algunos casos hemorragias o trombosis debido a disfunción en la producción celular. Esta fase dura unos 4 o 5 años en ausencia de tratamiento y se caracteriza por una leucocitosis moderada en sangre, $\leq 10\%$ de blastos, incremento de granulocitos en médula ósea y disminución del tamaño de los precursores eritroides y megacariocíticos. En un 90% de los casos aparece también basofilia y eosinofilia. La presencia de enfermedad

extramedular es rara, excepto en bazo e hígado. El 90-95% de los pacientes diagnosticados con LMC se encuentran en esta fase^{127,128}.

- b) Fase acelerada: De seis a ocho meses. En esta fase surgen nuevas alteraciones moleculares como la aparición de un segundo cromosoma Ph, trisomía del cromosoma 8 o delección p17-, o diversas mutaciones en genes relacionados con la transformación leucémica. Clínicamente se produce un aumento persistente (sin respuesta a terapia) de granulocitos en sangre y médula, principalmente en sus formas más maduras; Se observa hasta un 19% de blastos en sangre/médula y un 20% de basófilos en sangre, anemia y trombocitopenia, así como persistencia o incremento de la esplenomegalia. Pueden aparecer también resistencias a las terapias, así como mutaciones en *BCR-ABL*.
- c) Fase blástica: La progresión a esta fase se da entre los 3-5 años desde el diagnóstico en pacientes no tratados y puede ser a través o no de una fase acelerada identificable. Es una fase muy agresiva de la enfermedad que desemboca en LMA en un 80% de los casos. El 20% restante evoluciona a LLA, con mejor pronóstico. Se caracteriza por presentar un porcentaje de blastos en médula ósea o sangre periférica $\geq 20\%$, (a veces formando grumos) o presencia de enfermedad extramedular con células inmaduras (por ej, sarcoma mielóide)^{6,7,132}.

Las células positivas para *BCR-ABL* son muy inestables genéticamente y tienen predisposición a desarrollar múltiples y heterogéneas anormalidades genéticas, lo que resulta en la transformación del fenotipo leucémico pasando por las diferentes fases de la enfermedad hasta llegar a leucemia aguda. La progresión

puede ser debida a factores relacionados con *BCR-ABL*, como mutaciones puntuales en el dominio quinasa asociadas a la resistencia al tratamiento con TKIs (inhibidores tirosina-quinasa), o debida a factores independientes que supongan aberraciones citogenéticas adicionales que conlleven evolución clonal.

Muy recientemente (2019), se ha observado que el riesgo de acumulación de mutaciones de mal pronóstico en la LMC es superior en pacientes mayores de 45 años, y dentro de este grupo, en los varones. El mismo estudio describió también el polimorfismo en el gen supresor de tumores *PTEN* (*PTEN-L* rs1257378) como factor de riesgo asociado a mal pronóstico¹¹⁸ como se vio anteriormente.

Actualmente, el tratamiento de la LMC se basa en la terapia con inhibidores específicos de la quinasa *BCR-ABL*. Desde el comienzo de los tratamientos con TKIs y a raíz del descubrimiento del imatinib, la calidad y esperanza de vida de los pacientes con LMC ha aumentado enormemente, llegando a ser similar a la de individuos sanos mientras se mantiene la fase crónica de la enfermedad^{7,133}. Mediante el tratamiento con TKIs, se consigue remisión citogenética completa y liberación de la progresión de la enfermedad en un porcentaje muy alto de pacientes en fase crónica. Además, las respuestas suelen ser largas en el tiempo, con tasas de supervivencia bastante altas (>75%) tras varios años de tratamiento con TKIs^{134,135}.

Hoy en día, existen tres TKIs para el tratamiento de primera línea de la LMC: Imatinib, nilotinib y dasatinib. Con ellos, la supervivencia promedio tras 5 años es del 85-95%. La mayoría de los pacientes restaura una hematopoyesis normal, aunque la fase acelerada de la LMC puede aparecer sin presencia de síntomas específicos (incremento de la anemia, esplenomegalia e infiltración de otros órganos). La fase blástica puede aparecer también,

presentándose como una leucemia aguda con empeoramiento de los síntomas constitucionales, hemorragias, fiebre e infecciones.

Existen diferentes generaciones de TKIs con potenciales y características distintas. El tratamiento hoy en día se basa en su utilización de manera individual o en combinación, siendo también posible la combinación de los TKIs con algún otro agente como el citado IFN α o la hidroxiaurea^{136,137}, dependiendo de las condiciones individuales del paciente y del grado de respuesta al tratamiento. Hoy en día, la LMC es monitorizada constantemente a nivel molecular y citogenético, siendo esto parte fundamental del tratamiento. Diversas técnicas de genética molecular como la hibridación in situ fluorescente, la PCR cuantitativa o la secuenciación masiva permiten evaluar la gravedad de la enfermedad (carga molecular de *BCR-ABL*, número de cromosomas Filadelfia, aparición de anomalías genéticas que confieren mal pronóstico o aparición de mutaciones en *BCR-ABL* que confieren resistencias a los TKIs). Las respuestas citogenética y molecular al tratamiento también son evaluadas mediante estas técnicas continuamente, lo que permite adelantarse al avance de la enfermedad y cambiar de estrategia cuando es necesario. Esto es vital, ya que se conocen más de 100 mutaciones diferentes en el dominio quinasa de *BCR-ABL* que confieren resistencia al tratamiento con TKIs. Resulta especialmente llamativa la mutación *T315I*, la cual confiere resistencia a todas las terapias con TKIs, excepto a la terapia con el inhibidor de tercera generación ponatinib^{132,138}.

Como última opción de tratamiento existe el trasplante hematopoyético. La cantidad de pacientes de LMC en fase crónica sometidos a trasplante medular ha decrecido considerablemente desde el desarrollo de los TKIs. No obstante, sigue siendo importante en aquellos pacientes resistentes a varios TKIs, aquellos con la mutación *T315I*, o aquellos con alto riesgo de transformación

leucémica. Por el contrario, el trasplante es la única alternativa cuando se ha desarrollado la fase blástica y debe realizarse rápidamente cuando la LMC evoluciona a su fase acelerada¹³².

En resumen, la LMC a día de hoy no tiene una gravedad muy elevada mientras se encuentre en fase crónica, debido a la variedad de inhibidores de *BCR-ABL* disponibles, así como al conocimiento de la patogenia y las bases moleculares de la enfermedad y a los mecanismos de detección y seguimiento de ésta. El verdadero problema de la LMC radica en la probabilidad relativamente alta de que se agudice, desembocando en LMA, lo cual suele ser letal debido a su agresividad, a las múltiples aberraciones genéticas rápidamente adquiridas y a la resistencia a los tratamientos^{7,132,139,140}. Es pues de gran interés aumentar el conocimiento de los procesos conductores de dicha transformación leucémica, así como ahondar en la búsqueda de nuevos biomarcadores que pronostiquen la transformación y de dianas moleculares para hacer frente a dicho proceso de agudización.

1.3.1.2. Policitemia vera (PV)

Dentro de los NMPs ph-neg, la PV se caracteriza por un aumento en la proliferación medular de precursores eritroides que da lugar a una acumulación excesiva de glóbulos rojos en la sangre. Aunque también puede presentar leucocitosis y trombocitosis¹⁴¹. La PV es de inicio gradual, sin síntomas obvios al comienzo y de desarrollo lento. Debido al exceso de hematíes, la sangre se espesa, causando una circulación lenta (a veces hiperviscosidad) y pueden surgir diversos problemas asociados como: coágulos, ataques cardíacos o accidentes cerebrovasculares.

La PV no tiene cura y puede llegar a ser grave, aunque un tratamiento adecuado puede ayudar a aliviar los síntomas y complicaciones de la enfermedad. Con el tiempo, existe el riesgo de que avance y se convierta en otras neoplasias más graves, como MF, o que se produzca el proceso de transformación a leucemia aguda¹⁴¹.

Esta enfermedad no es frecuente y cuando se presenta afecta principalmente a varones, siendo la edad mediana de diagnóstico los 60 años y considerándose rara antes de los 40. En España, su incidencia es de unos 4-6 casos por millón de habitantes y año.

Del mismo modo que en el resto de NMPs, los pacientes en fase crónica de la enfermedad pueden tener una supervivencia relativamente alta siempre que reciban el tratamiento adecuado y se controlen los efectos secundarios asociados: la mediana de la supervivencia en pacientes ≥ 60 años con un tratamiento correcto es superior a 14 años, frente a los 18 meses en el caso de pacientes no tratados^{142,143}. En el caso de pacientes más jóvenes (≤ 40 años) la mediana de la supervivencia es de hasta 35 años^{85,144}.

Molecularmente, el 95-97% de los pacientes de PV presenta la mutación *JAK2V617F*, y un 3%, mutaciones en el exón 12 de *JAK2*⁸⁵. La frecuencia de aberraciones en el cariotipo es de un 15-20%, normalmente asociado a mal pronóstico^{85,143}. En cuanto al resto de mutaciones no conductoras, éstas se encuentran en un 53% de los pacientes, siendo las más frecuentes *TET2* (22%), *ASXL1* (12%) y *SH2B3* (9%). Los porcentajes respectivos de pacientes con 1, 2 o ≥ 3 mutaciones son de 30%, 20% y 3%⁸³.

Los criterios actuales para el diagnóstico de la PV se basan en aspectos relacionados con la proliferación eritroide y el aumento de hemoglobina, así como con la presencia de mutaciones en *JAK2*, tal y como se detalla en la clasificación de 2016 de la OMS.^{6,145}

Puesto que la principal causa de muerte en la PV son las complicaciones secundarias como trombosis o hemorragias, los tratamientos están encaminados a evitarlas en la medida de lo posible y mantener una situación clínica óptima. El riesgo de sufrir eventos trombóticos es de un 30-50%, y el de sufrir hemorragias de un 15-30%. El tratamiento también presta atención a la posibilidad de que la enfermedad evolucione a mielofibrosis (3-10% de los casos) o a leucemia aguda u otras neoplasias más graves (20%).

El tratamiento de la PV se basa en la reducción rápida de la masa eritrocitaria mediante diversos métodos y la corrección de factores de riesgo cardiovascular (diabetes, hipertensión, colesterol alto, tabaquismo...). En casos de riesgo alto o resistentes a la terapia, se emplea el tratamiento citorreductor (quimioterapia). Los fármacos principales en la terapia de la PV son la hidroxiurea y el ruxolitinib:

La hidroxiurea (HU) es el agente citorreductor más utilizado para tratar la PV y la elección normal de primera línea, consiguiendo controlar la enfermedad en el 90% de los pacientes. En aquellos casos de intolerancia o resistencia a la HU (15-24%¹⁴⁶), el tratamiento de segunda línea es el ruxolitinib (Ruxo). Éste es un inhibidor selectivo de las quinasas JAK1/JAK2, inhibiendo la vía de señales JAK-STAT activada constitutivamente en las NMPs-Ph-neg. El 60% de los pacientes tratados con Ruxo consiguen controlar el hematocrito de forma mantenida. Además, en una alta proporción de casos se observa reducción de síntomas asociados y de la esplenomegalia¹⁴⁷⁻¹⁴⁹. Por último, existen otros fármacos para casos más específicos, pacientes de edad más joven o más avanzada o resistencia a la terapia, como IFN α , anagrelida, busulfán o fósforo radiactivo¹⁵⁰⁻¹⁵³.

Pese a los tratamientos anteriores y del mismo modo que en el resto de NMPs, la PV no tiene cura. Aunque se controle la aparición

de efectos asociados existe un riesgo de evolución a MF o LMA que es mayoritariamente letal. Los procesos involucrados en la transformación aguda o mielofibrótica de la PV tampoco son conocidos. Se sabe que la carga alélica de las mutaciones en *JAK2*¹⁵⁴, y el incremento de la leucocitosis juegan un papel importante, pero igual que en el resto de NMPs, está claro que la evolución genética asociada a la leucemización tiene un rol fundamental¹⁵⁵. Los genes *ASXL1*, *SRSF2*, *IDH2* han sido especialmente asociados al riesgo de transformación a MF-post PV^{83,142}.

1.3.1.3. Trombocitemia esencial (TE)

Dentro de las NMPs Ph-neg, la TE se caracteriza por una hiperproliferación clonal medular de precursores megacariocíticos, y por tanto, producción excesiva de plaquetas en médula y sangre, lo que conlleva problemas asociados como trombosis y hemorragias¹⁴¹.

Como el resto de NMPs crónicas, la TE no tiene cura, pero con un tratamiento adecuado la supervivencia de los pacientes con TE es muy similar a la de los individuos sanos. La mediana de la supervivencia es de 20 años en pacientes ≥ 60 años y de unos 35 años en pacientes más jóvenes^{85,144}. Las principales complicaciones de la TE se deben también a los efectos secundarios asociados, siendo los más importantes los accidentes cerebrovasculares, ataques cardíacos o sangrado excesivo. Igual que en las otras NMPs, un porcentaje de los casos de TE puede evolucionar hacia neoplasias más agresivas, concretamente a MF-post TE (10%) o a LMA (4%)^{141,156}.

Epidemiológicamente, la TE es poco frecuente (1-3/100.000 habitantes), aunque en España es la NMP crónica más frecuente junto con la LMC, siendo la incidencia en nuestro país de 20 casos por millón

de habitantes. Por lo general aparece en adultos, a partir de los 50-60 años, aunque un 15% de los casos pueden ocurrir antes de los 40 años, además, afecta más a mujeres que a hombres (60-40%). Las causas de su aparición se desconocen, pero se sabe que es un trastorno adquirido no hereditario, con una gran carga genética.

Un 85% de los casos de TE presentan alguna de las mutaciones conductoras (*JAK2V617F*, *MPL* o *CALR*). La más frecuente es *JAK2V617F* (55-60% de los casos), seguida de las mutaciones en *CALR* (20-25%) y en *MPL* (5%). El 10-15% restante de los casos se consideran TE triple negativas^{141,154,157,158}. En cuanto a mutaciones no conductoras, su frecuencia de aparición en TE es del 53%, siendo las más frecuentes *TET2* (16%), *ASXL1* (11%), *DNMT3A* (6%) y *SF3B1* (5%). El porcentaje de pacientes con 1, 2 y ≥ 3 mutaciones es del 41%, 8% y 4%, respectivamente. Las alteraciones en el cariotipo son raras en TE (<10%) y su valor pronóstico no ha sido demostrado^{83,159}.

Los síntomas de la TE dependen del estado evolutivo de ésta. Inicialmente puede no presentar síntomas hasta en el 50% de los casos, y si existen, pueden ser no específicos como la esplenomegalia o los debidos a trastornos de la microcirculación (hasta un 40%); trombosis (25%) (especialmente arteriales); y hemorragias (5%)¹⁵⁶.

Para el diagnóstico de TE se utilizan los criterios establecidos por la OMS en 2016, basados fundamentalmente en información relativa al aumento de plaquetas, trombocitosis, y presencia de mutaciones *JAK2V617F/MPL/CALR*⁶, así como cuantificación de la carga alélica de la mutación *JAK2*¹⁶⁰ (valores $\geq 40\%$ pueden indicar un caso de MF en estado prefibrótico o de TE “enmascarada”)^{8,161}.

En cuanto al tratamiento, igual que en la PV, éste consiste en antiagregantes y fármacos encaminados a mantener una situación clínica óptima, minimizando la probabilidad de sufrir eventos

trombóticos o hemorrágicos, así como efectos secundarios asociados. En los casos de alto riesgo, se usan agentes citorreductores: La hidroxiurea es el fármaco normal como primera línea¹⁶², aunque en pacientes ≤ 40 -50 años se usa en algunos casos anagrelide o IFN α .

Hasta un 20% de los pacientes desarrollan resistencia o intolerancia a la HU, lo que supone mal pronóstico y mayor riesgo de transformación aguda. En dichos casos, la segunda opción es el anagrelide, y como tercera, busulfán o IFN α , según la edad^{163,164}.

En cuanto a la transformación de la enfermedad, se desconocen las causas de este proceso, sin embargo, existen varias mutaciones en ciertos genes que podrían significar una mayor probabilidad de progresión y un peor pronóstico, como vimos anteriormente. La carga alélica de la mutación *JAK2V617F* se ha asociado a un peor pronóstico, mayor riesgo trombótico y mayor probabilidad de transformación mielofibrótica¹⁵⁴. En 2017, Tefferi y Barbui propusieron las mutaciones en los genes *MPL*, *SH2B3*, *SF3B1*, *U2AF1*, *TP53*, *IDH2*, y *EZH2* como mutaciones importantes para la transformación de la TE^{83,142}.

1.3.1.4. Mielofibrosis (MF)

La MF es la última de las NMPs Ph-neg, caracterizada por un depósito de tejido fibroso en médula ósea y proliferación predominante de megacariocitos y granulocitos. Debido a la producción excesiva de tejido fibroso por los fibroblastos, se produce desplazamiento de células madre de la médula ósea a la sangre, donde colonizan órganos a distancia (metaplasia mieloide) produciéndose hematopoyesis extramedular (fundamentalmente bazo e hígado). Como consecuencia, aparece anemia (hasta en 80% de los casos) que

puede llegar a ser grave y con eritrocitos deformes, células inmaduras en circulación y esplenomegalia^{8,165}.

La MF puede aparecer de *novo* como mielofibrosis primaria, MFP (también llamada mielofibrosis idiopática), o bien aparecer como transformación post-PV o post-TE, presentando un cuadro clínico indistinguible al de la MFP¹⁶⁶. Sin embargo, algunos estudios han identificado diferencias moleculares entre la MFP y la MFP post-PV/TE, especialmente en cuanto a la presencia de mutaciones no conductoras. Por ejemplo, mayor porcentaje de mutaciones en genes encargados del procesamiento del ARN mensajero (especialmente en U2AF1) en MFP respecto a MF post-PV/TE (33 vs 6%)⁸⁴.

La MFP tiene dos fases clínica e histológicamente diferenciables, la pre-fibrótica o inicial y la de MFP establecida^{1,6,8}.

Es una enfermedad muy poco frecuente. La incidencia en países desarrollados es de 5-7 casos/millón de habitantes/año. Predomina en pacientes de edad avanzada, con una media de edad al diagnóstico de 65 años. Es más frecuente en hombres y muy ocasionalmente se diagnostica en la infancia.

La supervivencia de los pacientes de MF es la más baja dentro de todas las NMPs crónicas, sin embargo, ha ido aumentando con los años y en la actualidad la mediana de la supervivencia es de unos 7 años. No obstante, existe una gran heterogeneidad, habiendo pacientes que fallecen tras 1-2 años mientras que otros pueden vivir hasta los 20 años. En pacientes ≤ 40 años, la mediana de la supervivencia es de 20 años¹⁴⁴. Las principales causas de muerte son la evolución a LMA (20%), la progresión de la enfermedad a estadios más graves con intenso debilitamiento y caquexia, hemorragias, hipertensión portal, trombosis o aparición de segundas neoplasias⁸.

Molecularmente, más del 70% de los pacientes presentan mutaciones conductoras: en *JAK2* (50-60%), *CALR* (20-30%) o *MPL* (5-10%)¹⁶⁷. Existe también un grupo de pacientes triple negativos ($\leq 10\%$). En cuanto a las mutaciones no conductoras, éstas están presentes en un 81% de los casos de PMF, siendo las más frecuentes las de *ASXL1* (36%), *TET2* (18%), *SRSF2* (18%) y *U2AF1* (16%)⁸³. Las mutaciones en *IDH1/IDH2*, *SF3B1*, *DNMT3A*, *EZH2* y *CBL* también son frecuentes aunque en menor medida^{6,81,85}. El porcentaje de pacientes con 1, 2, 3 y ≥ 4 mutaciones es de 35%, 26%, 10% y 9%, respectivamente. Además, un 33-43% de los pacientes muestra cariotipo anormal, lo que se relaciona con menor supervivencia^{83,85}.

La MF es la NMP crónica más grave, y tampoco tiene cura. Presenta un inicio lento, a menudo sin síntomas durante años (30% de los casos), aunque con el tiempo puede comenzar a progresar rápidamente llegando a ser muy grave o evolucionar a LMA.

Cuando comienzan los síntomas, estos pueden ser no constitucionales debido al aumento del metabolismo (30%), síntomas ocasionados por la anemia (25%) que con el tiempo se vuelven más graves, síntomas debidos a la esplenomegalia (20%), o síntomas derivados de la proliferación anormal mieloide como trombosis (7%), infecciones recurrentes, prurito, dolor óseo o gota.

Para el diagnóstico de la MF, los criterios actuales son también los descritos por la OMS en 2016⁶, los cuales distinguen entre MF en fase inicial y en fase establecida y también entre MFP y MF post-PV/TE. Se basan sobre todo en la composición medular, grado de fibrosis, presencia de mutaciones conductoras o de algún otro marcador clonal (como *ASXL1*, *EZH2*, *TET2*, *IDH1/IDH2*, *SRSF2* o *SF3B1*), esplenomegalia, síndrome leucoeritroblástico o LDH sérica.

El pronóstico de la MF, depende de múltiples factores como la edad, síntomas constitucionales, anemia, leucocitosis o trombocitosis intensas, aumento $\geq 2\%$ de blastos en sangre, requerimiento de transfusiones o cariotipos desfavorables. Sin embargo, la gran novedad es el significado pronóstico de algunas alteraciones moleculares: Las mutaciones en *CALR* tienen una influencia favorable, mientras que los pacientes triple negativos (7-10%) tienen especialmente mal pronóstico¹⁶⁷. Dentro de las mutaciones no conductoras, las más desfavorables son las de *ASXL1* y *SRSF2*, aunque las de *EZH2*, *CBL*, *RUNX1*, *SH2B3*, *IDH1/2* y otros genes como *KIT* y *CEBPA* también se consideran adversas, así como la presencia de aberraciones en el cariotipo⁸³.

La gran variabilidad clínica y molecular de la MF hace que la terapia sea muy variable. Los tratamientos actuales son paliativos y no curan la enfermedad, estando a menudo limitados por la edad avanzada de los pacientes, lo que imposibilita una terapia agresiva.

La única opción terapéutica con potencial curativo es el trasplante alogénico. Sin embargo, debido a su agresividad, efectos adversos y a la elevada edad de los pacientes, sólo un 10% de éstos son candidatos a ello¹⁶⁸. En el resto de casos, las terapias van dirigidas a mejorar la anemia y las manifestaciones hiperproliferativas y síntomas asociados. En el caso de la anemia existen múltiples y diversas estrategias usadas en la actualidad, mientras que para las manifestaciones hiperproliferativas (trombosis, leucocitosis, esplenomegalia...) las opciones usadas son sobre todo el tratamiento citorreductor y la inhibición de la vía *JAK-STAT*¹⁶⁹.

Como agente citorreductor, la HU es el único con un papel importante en la terapia de la MF¹⁷⁰, ya que otros agentes citorreductores tienen demasiadas contraindicaciones. En cuanto a la

inhibición de la vía *JAK-STAT*, el ruxolitinib es el único fármaco aprobado por las autoridades europeas para los pacientes con MF, mejorando la calidad de vida y la supervivencia de los pacientes, aunque, no es suficiente por sí sólo para erradicar la MF^{171,172}.

A raíz de todo lo anterior, es evidente la necesidad real de búsqueda de nuevas dianas terapéuticas y biomarcadores en la MF, así como la importancia de estudiar las alteraciones moleculares que podrían ayudar a detectar y frenar el proceso de agudización y de transformación a LMA, en la MF y en el resto de las NMPs crónicas.

1.4. TRANSFORMACIÓN AGUDA DE LAS NMPs CRÓNICAS

Como se ha descrito, todas las neoplasias mieloproliferativas tienen cierto riesgo de evolucionar hacia la transformación aguda de la enfermedad y desembocar en LMA. Esta fase de agudización se caracteriza por su gran heterogeneidad clínica y hematológica y su pronóstico desfavorable, siendo la mediana de vida cuando se alcanza esta fase de entre 3 y 5 meses, tanto en LMC como en las NMPs Ph-neg. Una vez se alcanza la fase aguda de la enfermedad, la única alternativa con posibilidad de curación es el trasplante alógeno, el cual no puede llevarse a cabo en la gran mayoría de casos. La transformación aguda supone el riesgo más alto en las NMPs, por ello el tratamiento de éstas siempre tiene como objetivo cronificar la enfermedad y evitar que evolucione a su fase aguda^{8,132}.

A diferencia del amplio conocimiento existente sobre la patogénesis de la fase crónica de las NMPs, los mecanismos implicados en su progresión aguda son bastante desconocidos. Se desconocen las causas de la transformación, así como los mecanismos moleculares

involucrados, pudiendo surgir la agudización de la enfermedad súbitamente, o a través de una fase acelerada identificable. Como se ha visto, ciertas alteraciones y mutaciones genéticas suelen producirse con bastante frecuencia en esta fase de agudización, por lo que su estudio podría arrojar cierta claridad al proceso de evolución leucémica de las NMPs crónicas¹⁷³.

Es evidente que las alteraciones de la biología celular presentes en la fase crónica de las NMPs (proliferación aumentada, inestabilidad genómica, inhibición de la apoptosis) contribuyen a la transformación aguda de la enfermedad. Dichas alteraciones facilitan la supervivencia y rápida multiplicación de los clones neoplásicos, así como la rápida acumulación de mutaciones en su genoma, hasta que finalmente, alguno de ellos adquiriera una ventaja proliferativa sobre el resto, desencadenando la fase aguda de la patología^{121,174,175}.

1.4.1. Transformación aguda de la LMC

Es difícil calcular el riesgo real de que la LMC se transforme a LMA, ya que el pronóstico de la LMC depende de múltiples factores, y además no siempre se alcanza la fase blástica. No obstante, en aquellos casos en los que es alcanzada, el riesgo de transformación a LMA es de un 80%. Aproximadamente, un 50% de los pacientes en fase crónica evolucionan a la fase de crisis blástica (CB) a través de la fase acelerada, mientras que el 50% restante lo hace directamente a través de la fase crónica (**figura 1.10**), sin pasar por una fase intermedia clara. En torno a un 5% de los pacientes de LMC son diagnosticados directamente en la CB, lo que sugiere la existencia de una fase crónica subclínica que ha pasado desapercibida.

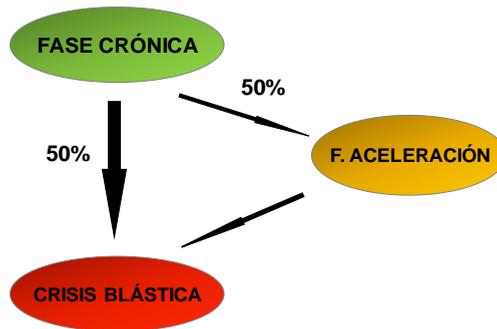


Figura 1.10 Fases clínicas de la LMC

Una vez se alcanza la CB (>20% de blastos en sangre/médula), la mediana de la supervivencia pasa a ser de unos 5 meses. Los blastos pueden expresar marcadores de cualquier linaje, (indicando que el clon original deriva de una célula madre muy indiferenciada), aunque son mayoritariamente de fenotipo mielóide (70-80%), evolucionando en estos casos a LMA. No obstante, un 20% de los casos presentan un fenotipo linfóide y evolucionan a leucemia linfocítica aguda. Las CB de estirpe eritroide son mucho más raras.

En la fase inicial, menos de un 10% de los pacientes presentan alteraciones moleculares alternativas al cromosoma Ph, mientras que en la fase aguda, este porcentaje aumenta hasta un 60-80%, siendo estas nuevas anomalías muy variadas¹⁷⁶⁻¹⁸².

En cuanto a alteraciones cromosómicas, las más frecuentes son la duplicación del cromosoma Ph, trisomía del cromosoma 8, aparición del isocromosoma 17q y trisomía del cr.19. En menor medida se pueden observar otras monosomías (7, 17), trisomía del cr.21), alteraciones en el cr.3, pérdida del cr.Y o pérdida de material genético (cr. 7, 9, 19). Los cariotipos suelen ser complejos, demostrando la existencia de múltiples subclonas¹⁸³⁻¹⁸⁸.

Las alteraciones moleculares más frecuentes en esta fase son: inhibición de genes supresores de tumores, hipermetilación, activación de oncogenes y/o genes anti-apoptóticos y alteración de mecanismos reparadores del ADN. En esta fase también aumenta el porcentaje de mutaciones en la quinasa BCR-ABL (80% de los casos). Recientemente se han encontrado también mutaciones en genes de regulación epigenética, procesamiento del ARNm y factores de transcripción, siendo algunos de estos genes los mismos que aparecen con frecuencia mutados en las NMPs Ph-neg^{174,175,181,182,189}.

De los genes supresores de tumores, *TP53* (cr.17) es el más frecuentemente alterado en la fase de transformación de la LMC, existiendo deleciones, mutaciones o reordenamientos en un 20-30% de los pacientes en esta fase. Las alteraciones en *P16* (cr.9) también se asocian a la patogénesis de la progresión de la LMC, estando alterado en un 15% de los casos y siendo la alteración más frecuente en la fase de transformación de la LMC de estirpe linfoide (20-50%)^{174,181,190-193}. El gen *BCR-ABL* media también una inhibición de la apoptosis mediante la expresión de los genes anti-apoptóticos de la familia *BCL-2*, además, su presencia citoplasmática parece proteger a las células ph-positivas de la muerte celular programada^{194,195}.

La hipermetilación de los promotores de ciertos genes también es una anomalía común en la fase de transformación de la LMC, como la del gen *c-ABL* (9q34), implicado en la t(9;22). Éste se asocia específicamente a la progresión de la LMC, contribuyendo a la inestabilidad genética de esta fase (inhibe la reparación del ADN y la inducción de apoptosis mediante la modulación de *TP53-MDM2*)¹⁹⁶⁻¹⁹⁹. El gen de la calcitonina también se encuentra frecuentemente hipermetilado (60-80%) durante la transformación, aunque su papel en la progresión leucémica es dudoso²⁰⁰⁻²⁰². Por último, el gen del retinoblastoma, *Rb* (13q14), suele encontrarse inhibido en una gran

proporción de casos de transformación aguda de la LMC (18%), no encontrándose alterado en la fase crónica^{203,204}.

Recientemente, estudios de secuenciación génica en pacientes en fase de transformación de la LMC han identificado una serie de genes que se encuentran mutados con asiduidad, siendo algunos de estos genes los mismos que aparecen mutados en los casos de transformación aguda de los NMPs Ph-neg, lo que indica una vez más la amplia relación entre la transformación de las NMPs crónicas.

Las mutaciones en *RUNX1* son, junto con las mutaciones en *TP53*, las más frecuentes en la fase de transformación de la LMC, encontrándose hasta en un 33% de los casos según la bibliografía. Hasta 10 mutaciones distintas han sido identificadas en *RUNX1*, las cuales desregulan la diferenciación mieloide, aceleran la transformación leucémica e inhiben la forma nativa de *RUNX1*^{182,205,206}.

Un estudio de 2011 en el que se analizaron 39 pacientes en fase de transformación aguda de la LMC, detectó que el 76,9% de ellos presentaba mutaciones al menos en un gen, aparte de la t(9;22)¹⁸². Los resultados mostraron mutaciones frecuentes en *RUNX1* (33,3%), *ASXL1* (20,5%), *IKZF1* (17,9%), *WT1* (15,4%), *NRAS* (5,1%), *KRAS* (5,1%), *TET2* (7,2%), *CBL* (2,6%), *TP53* (2,6%), *IDH1* (7,7%), así como ciertas deleciones en *CBFβ* y *C-MYC*. La mutación más frecuente, *RUNX1*, se asociaba con mutaciones en otros genes en el 61,5% de los casos; las mutaciones en *ASXL1* se asociaban con la CB de estirpe mieloide, y las de *IKZF1*, con la linfoide. Curiosamente, apenas se detectaron mutaciones en *TP53*, en contraste con la bibliografía. Además, se vio que en aquellos casos en los que se disponía de muestras de fase crónica y de fase de agudización, las mutaciones en *RUNX1*, *IKZF1* y *ASXL1* aparecían únicamente en la fase aguda, indicando que estas mutaciones surgen durante la fase de

transformación, mientras que las mutaciones en los genes *WT1* e *IDH1* se encontraban en ambas fases.

Por otra parte, otros estudios han detectado también reordenamientos en *CBF-β*, lo cual unido a las mutaciones en *BCR-ABL* se considera de mal pronóstico²⁰⁷.

En cuanto a la activación de oncogenes en esta fase, el más importante es la sobreexpresión de *BCR-ABL*, por un aumento en su transcripción o debido a la duplicación del cr. Ph (20-30% de los casos)^{208,209}. Otro de los oncogenes frecuentemente sobreexpresado es *C-MYC* (cr.8), hasta en un 20% de los casos, frente al 0% en la fase crónica de la enfermedad. Este gen tiene un efecto antagónico a *TP53*²¹⁰⁻²¹⁴. Por otro lado, el gen *EVI-1*, (cr.3), se encuentra sobreexpresado en un 5-15% de los casos de transformación aguda, bloqueando la diferenciación mieloide normal, mediante interferencia con los factores de transcripción *GATA*²¹⁵⁻²¹⁸. Los genes de la familia *RAS* tendrían también un papel fundamental entre las alteraciones producidas por la proteína BCR-ABL, encontrándose mutados en un 7% de los casos de transformación^{182,219,220}. Recientemente, la sobreexpresión de otros genes como *HOXA9* o *GATA-2* ha sido también relacionada negativamente con la progresión leucémica de la LMC^{221,222}.

Las numerosas alteraciones observadas se deben en gran medida a la inestabilidad genética creciente de las células Ph-positivas, la cual puede deberse a su vez a las alteraciones de los mecanismos reparadores del ADN^{175,182}: Por ejemplo, BCR-ABL contribuye a la inhibición de proteínas reparadoras de ADN como el complejo quinasa dependiente de ADN (DNA-PKcs), la más importante proteína reparadora de ADN en mamíferos²²³. Existe también una correlación inversa en la expresión de *BCR-ABL* y *BRCA-1*, gen implicado en el mantenimiento de la integridad del genoma²²⁴. Además, la

hipermetilación de *c-ABL*, como se ha visto, contribuye también a dicha inestabilidad.

Durante la fase de transformación existe también una serie de mecanismos que producen una ventaja proliferativa en las células leucémicas (igual que ocurre en las otras NMPs)^{225,226}: Por ejemplo, la sobreexpresión de la enzima telomerasa²²⁷⁻²²⁹, el bloqueo de la diferenciación celular (las células inmaduras poseen mayor capacidad proliferativa) debido a la inactivación progresiva de la proteína *C/EBPα*, principal regulador de la diferenciación granulocítica^{230,231}; O la adquisición de capacidad de auto renovación en los progenitores grano-monocíticos a través de la activación anómala de la vía de la *Wnt/β-Catenina*, contribuyendo a su potencial leucémico²³².

En último lugar, las células Ph-positivas en su fase aguda son capaces de inhibir la respuesta inmunitaria^{233,234} y presentan diversas formas de resistencia fármacológica^{132,182,197,235}.

En la **tabla 1.2** se encuentran recogidas las alteraciones moleculares más frecuentes en la fase de transformación de la LMC.

Tabla 1.2 Mutaciones en la evolución de la LMC

Gen alterado	Localización	Frec. fase crónica	Frec. fase aguda
<i>P16</i>	9p21	0%	15%
<i>Rb</i>	13q14	0%	18%
<i>MYC</i>	8q24	0%	20%
<i>EVI1</i>	3q26	0%	10%
<i>IKZF1</i>	7p12	0%	18%
<i>RUNX1</i>	21q22	0%	28-33%
<i>TP53</i>	17p13	0%	20-30%
<i>ASXL1</i>	20q11	0%	20%
<i>IDH1</i>	2q34	-	7,70%
<i>WT1</i>	11p13	-	15,40%
<i>TET2</i>	4q24	-	8%
Familia genes <i>RAS</i>	11p15, 12p12, 1p22	0%	5-7%

1.4.2 Transformación aguda de las NMPs cromosoma Ph negativos

La fase de transformación aguda de las NMPs Ph-neg es muy similar a la de la LMC, aunque existen algunas excepciones. En las NMPs Ph-neg también pueden ocurrir tres fases, una fase crónica, una fase avanzada que no siempre se presenta (empeoramiento de las citopenias y de los síntomas constitucionales), y una fase de crisis blástica o agudización de la enfermedad (>20% blastos en sangre/médula) y que precede a la transformación a LMA. Sin embargo, en éstos casos, el riesgo de transformación aguda es menor que en la LMC, aunque no por ello menos grave, siendo el riesgo de transformación del 5-10% en la PV y TE, y de un 20% en la MFP^{8,108,236}.

Como particularidad de estas enfermedades Ph-neg, y como se ha visto anteriormente, tanto la PV como la TE pueden evolucionar primero a mielofibrosis (MF post-PV o post-TE), siendo éste un estado prefibrótico que precede a una MF secundaria establecida (clínicamente indistinguible de la MFP, aunque con un patrón molecular diferente). La PV y la TE pueden evolucionar a LMA pasando o no por esta fase prefibrótica, mientras que, en el caso de la MF, ésta puede constar de su fase inicial prefibrótica, la fase de fibrosis establecida y, finalmente, evolucionar o no a LMA^{6,8,173}.

En el caso de las NMPs Ph-neg, cuando se produce el proceso de leucemización, los blastos proliferantes son de estirpe mieloide (sobre todo subtipos FAB M6 y M7), por ello éstas neoplasias se transforman en la inmensa mayoría de los casos a LMA, aunque excepcionalmente pueden evolucionar también a otras neoplasias mieloides como síndromes mielodisplásicos (SMD). Sin embargo, las NMPs Ph-neg muy raramente se transforman en neoplasias linfoides (a diferencia de la LMC, donde dicha probabilidad es del 20%)^{62,108,173}.

El pronóstico de los pacientes con NMPs Ph-neg en fase de transformación es infausto, con una supervivencia mediana de sólo 3 meses desde el diagnóstico de esta fase. El único tratamiento con potencial curativo es el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos, sin embargo, debido a que muy pocos individuos son candidatos a recibirlo, en la gran mayoría de casos el tratamiento es únicamente paliativo. Éste suele consistir en inhibidores de *JAK2* (ruxolitinib), quimioterapia, agentes hipometilantes (como decitabina), o combinaciones de éstos. No obstante, la esperanza de vida raramente supera los 8-10 meses en los mejores casos. Incluso en los pacientes que reciben un trasplante, la supervivencia a los tres años de recibirlo es sólo de entre un 16-33%. Todo ello evidencia el pésimo pronóstico de la fase aguda de estas neoplasias, y denota la necesidad urgente de nuevas investigaciones y terapias en el contexto de la agudización de estas enfermedades^{8,173,237-241}.

La patogénesis de la transformación es en gran medida desconocida. De hecho, la transformación aguda de pacientes *JAK2V617F*-positivos puede producirse indistintamente en progenitores con o sin dicha mutación, sugiriendo que en ocasiones la leucemia se origina previamente a la adquisición de *JAK2V617F*²⁴².

Del mismo modo que en la fase aguda de la LMC, existe una serie de alteraciones citogenéticas, moleculares y celulares que se observan con frecuencia en la fase de transformación aguda de las NMPs Ph-neg. Además, los progenitores leucémicos en estos casos, también han desarrollado mecanismos que favorecen su auto renovación, mediante ventajas en la proliferación, inhibición de la apoptosis y de los mecanismos reparadores del ADN, inhibición de la respuesta inmunitaria y resistencia farmacológica²³⁶.

En el ámbito citogenético, se ha visto que la mayoría de los pacientes ($\geq 50\%$) en esta fase presentan aberraciones cromosómicas. A grandes rasgos predomina el cariotipo complejo, con elevada presentación de alteraciones en los cromosomas 5, 7 y 17p. Las alteraciones en los cromosomas 1q y 9q se asocian con la progresión a MF secundaria o a fase acelerada. Por otra parte, los cambios en los cromosomas 6p, 19q, 22q y 3q también se asocian con la progresión final a LMA-post NMP^{8,108}. La alta frecuencia de cariotipos complejos es una característica típica de la fase aguda de las NMPs, debido principalmente a la larga evolución clonal de estas enfermedades⁸⁸. Un ejemplo de esto se puede observar en un reciente estudio (2019) del grupo de S.Y. Kim, el cual demostró que, mientras la frecuencia de aberraciones cromosómicas en pacientes con NMP Ph-neg en fase crónica era del 30%, tras una media de 12,5 años de seguimiento el porcentaje de aberraciones se incrementaba hasta un 75%²⁴³.

En cuanto al aspecto molecular, un estudio de 2018 en que se secuenciaron los genes más frecuentemente mutados durante la leucemización de las NMPs Ph-neg en un grupo de 75 pacientes mostraba que el espectro de mutaciones en *JAK2/CALR/MPL* era del 57, 20 y 9% respectivamente, y había un 13% de pacientes “triple negativos”. Además, un 85% de los individuos presentaba otras mutaciones aparte de las conductoras, y hasta un 37% albergaba 3 ó más de ellas²⁴⁴. Por otra parte, otro trabajo del mismo año secuenció un panel de 54 genes en 122 pacientes en fase acelerada (AP) y blástica (BP), ofreciendo unos resultados muy similares: se vio que la frecuencia de presentación de mutaciones no conductoras en pacientes con 1, 2, 3 ó ≥ 4 de ellas era del 15%, 13%, 25% y 46%, respectivamente²⁴⁵. Resulta llamativo que en la fase crónica de las NMPs este fenómeno ocurre al contrario, así, los casos más frecuentes eran los de 1 sola mutación, mientras que la frecuencia de pacientes

con 2, 3 ó más de tres mutaciones se iban reduciendo progresivamente. Así, en un trabajo de 2017, se vio que las frecuencias de aparición de 1, 2 ó ≥ 3 mutaciones eran del 99%, 46% y 34%, respectivamente; es decir, mientras que la frecuencia de presentación de ≥ 3 mutaciones es del 74% en fase de transformación, este porcentaje es sólo del 34% en fase crónica²⁴⁶.

Es por tanto evidente el amplio perfil mutacional y la complejidad molecular durante la fase aguda de las NMPs, debido a la larga evolución clonal a la que se ven sometidos los progenitores mieloides, siendo dicho perfil mutacional mucho mayor que en la fase crónica, y siendo los casos más frecuentes aquellos que albergan tres o más mutaciones secundarias^{88,241,244,245}.

Con todo, los genes más frecuentemente mutados en la fase de transformación de las NMPs Ph-neg (**tabla 1.3**) son: *ASXL1*, *TP53*, *RUNX1*, *IDH1/IDH2*, *IKZF1*, *TET2*, *SRSF2*, *DNMT3A*, *EZH2* y *CBL*. Otros genes que presentan mutaciones, aunque en menor medida, son *FOXP1*, *CUX1*, *ETV6* y *NRAS/KRAS*. Por último, algunos genes presentan exclusividad mutua, siendo el caso de *TP53*, *RUNX1*, *LNK*, *EZH2*, *SRSF2* Y *NRAS/KRAS*.^{88,106,108,244,245,247}.

Estos eventos mutacionales pueden ocurrir posteriormente a la adquisición de las mutaciones conductoras y de forma tardía en la evolución clonal de los progenitores mieloides, siendo característicos de la fase de transformación. Sin embargo, también pueden aparecer en estadios tempranos, incluso antes de la aparición de las mutaciones conductoras. Por ello, dependiendo del momento de aparición de las mutaciones, estos genes podrían tener un papel pronóstico elevado, con baja o nula carga mutacional en la fase crónica en comparación con la fase aguda, como es el caso de *TP53*, *RUNX1*, *IDH1/2*, *TET2* o *EZH2*^{245,247,248}.

Tabla 1.3 Mutaciones en la evolución de las NMPs Ph-neg

Gen alterado	Localización	Frec. fase crónica	Frec. fase aguda
JAK2	9p24	55-96%	50-60%
CALR	19p13	0-30%	10-20%
MPL	1p34	3-10%	5-10%
SH2B3 (LNK)	12q24	1-6%	10%
IDH1/2	2q33/15q26	1-4%	13-22%
IKZF1	7p12	0%	21%
RUNX1	21q22	0%	16-30%
TP53	17p13	2-3%	16-36%
TET2	4q24	5-17%	17-26%
CBL	11q23	0-10%	13%
ASXL1	20q11	5-20%	18-47%
DNMT3A	2p23	3-10%	15%
SRSF2	17q25	0-17%	13-22%
EZH2	7q35-q36	1-13%	15%

* El recuadro rojo indica los genes que albergan mutaciones con una frecuencia significativamente mayor en la fase de transformación respecto a la fase crónica, pudiendo actuar como biomarcadores de esta fase.

Todos los trabajos hasta la fecha coinciden en que uno de los genes más importantes en determinar el desenlace de la fase aguda de las NMPs es *TP53*. Las mutaciones en dicho gen están asociadas a mal pronóstico y menor supervivencia y están muy relacionadas con la LMA post-NMP^{244,245,249}. Se han observado casos en fase crónica en los que la carga mutacional de *TP-53* es muy baja (1-3%) durante varios años, antes de que éstas evolucionen a LMA y ocurra su expansión clonal. Por tanto, los pacientes con mutaciones en *TP-53* deben ser monitorizados frecuentemente para asegurar que la carga mutacional no se incrementa^{121,244}. En línea con lo anterior, se ha observado que el inhibidor de *TP-53*, *MDM4*, se encuentra frecuentemente amplificado en la fase leucémica de las NMPs, pero no en la LMA de

novo, lo que corrobora que la disminución de la actividad de *TP53* es básica en el proceso de leucemización⁸⁸.

Algo similar ocurre en relación a *RUNX1*: las mutaciones en este gen son muy bajas (0-4%) en la fase crónica de las NMPs Ph-neg, mientras que este valor se puede incrementar progresivamente hasta un 30% en la fase aguda. El mismo estudio de 2018 mencionado anteriormente demostraba que las mutaciones en *RUNX1* conllevan una menor supervivencia y que deben considerarse como mutaciones indicadoras de la transformación leucémica, así como especialmente de mal pronóstico en estas neoplasias²⁴⁴. Por ello es importante la monitorización de ambos genes (*TP53* y *RUNX1*) entre otros, durante el transcurso de las NMPs^{88,108,121,249}.

En cuanto al factor de transcripción *Ikaros* (*IKZF1*), las deleciones en él son un evento tardío en la evolución clonal, posterior a la adquisición de *JAK2V617F*, que promueven una mayor susceptibilidad a la transformación leucémica. *IKZF1* está relacionado con la ruta JAK-STAT, por lo que su deficiencia contribuiría a la transformación leucémica en aquellos casos de leucemogénesis inducida por la mutación *JAK2V617F*²⁵⁰. En relación con las mutaciones en *TET2*, se ha observado que, aunque éstas pueden ser un evento anterior a la aparición de *JAK2V617F* hasta casi en el 50% de los casos, éstas surgen exclusivamente durante el proceso de leucemización, por lo que tienen también un elevado factor pronóstico, del mismo modo que las mutaciones en *IDH1/IDH2*, casi exclusivas de esta fase transformadora. En contraposición, las mutaciones en *ASXL1*, aunque son muy frecuentes en la fase aguda, se encuentran con frecuencia en ambas fases, por lo que su papel como biomarcador de la fase aguda no es relevante^{121,247,251}.

Es sabido que la LMA *de novo* es citogenética y molecularmente diferente a la LMA post-NMP. Esto fue demostrado en 2012 por un estudio del grupo de *R. Kralovics* que comparaba los perfiles mutacionales de ambas neoplasias. Además, el hecho de que ciertas mutaciones observadas en estas neoplasias tengan exclusividad mutua refleja que la LMA post-NMP y la LMA *de novo* siguen rutas leucémicas diferentes. *Kralovics, et al.* vieron que la frecuencia de aberraciones citogenéticas es mayor en la LMA-post NMP, especialmente aquellas que afectan a genes de respuesta al daño en el ADN como *TP53* y *CUX1*, y confirmaban que las mutaciones en *TP53* están fuertemente asociadas a la LMA post-NMP, indicando por sí solas mal pronóstico y menor supervivencia⁸⁸.

Resulta especialmente llamativo que muchos de los genes que se encuentran mutados en la fase de transformación de las NMPs Ph-neg, albergan también mutaciones en la fase transformadora de la LMC (*TP53*, *RUNX1*, *IDH1*, *IKZF1* y, en menor medida, *CBL*). Esto evidencia la similitud de la transformación leucémica en las NMPs crónicas y abre la puerta a la investigación del papel que pueden tener estos genes en su proceso de leucemización.

1.5. EL COMPLEJO *RUNX1/CBF-B/HIPK2/EP300/TP53*

1.5.1. *RUNX1* y *TP53*, genes frecuentemente mutados en la fase de transformación de las NMPs crónicas

Hemos visto cómo *TP53* y *RUNX1* se encuentran alterados con frecuencia en la progresión leucémica de las NMPs crónicas, independientemente de si éstas poseen o no el cromosoma Filadelfia. En todos los casos, dichos genes son marcadores de mal pronóstico y

menor supervivencia, y constituyen una de las alteraciones más frecuentes tanto en la fase transformante como en la LMA post-NMP ya establecida. Del mismo modo, aunque en menor medida, también existen casos en los que las alteraciones en el cofactor de *RUNX1*, *CBF- β* están presentes durante la agudización de las NMPs crónicas y la leucemogénesis^{207,252}. Es evidente pues, que ambos genes *TP53* y *RUNX1* (así como su cofactor *CBF- β*) tienen un papel muy relevante en este proceso de leucemización.

1.5.1.1. Tumor Protein p53 (TP53)

Como se ha descrito, *TP53* es un gen supresor de tumores, alojado en la región 13 del brazo largo del cromosoma 17 (17q13), con un importante papel oncogénico cuando su función se ve alterada o inhibida. Tal es el caso, que en 1989 fue descrito como el mayor evento molecular en cáncer, ya que presenta alteraciones en su estructura en hasta un 50% de los cánceres conocidos y está inhibido en muchos otros. Es por tanto el gen supresor de tumores más estudiado y conocido en la actualidad, con un papel clave en la respuesta al daño al ADN: *TP53* reconoce el daño ocasionado en el ADN y produce un arresto del ciclo celular, apoptosis y senescencia, protegiendo a las células de las mutaciones en su genoma. Además, *TP53* se expresa en todos los tejidos del organismo. Por todo ello, comúnmente se le denomina gen “guardián del genoma”²⁵³⁻²⁵⁵.

Además de su función supresora de tumores, se ha visto también que ciertas mutaciones en su estructura le confieren una actividad oncogénica extra, que confiere a las células mutadas nuevas características, como proliferación aberrante, quimiorresistencia, desregulación de la arquitectura tisular, migración, invasión y metástasis²⁵⁴. Así, se ha observado que las formas mutantes de *TP53*

inhiben a otros dos genes de la misma familia que también tienen funciones supresoras de tumores, *TP63* y *TP73*, mientras que la forma nativa de *TP53* no interacciona en este sentido con dichos genes. Aunque los roles de *TP53* en cáncer han sido estudiados exhaustivamente, los mecanismos por los cuales puede llegar a mutar son bastante desconocidos. Estudios en ratones han demostrado además que la reversión de la actividad normal de *TP53* conlleva en muchos casos la restauración de su actividad anti tumoral y la consiguiente muerte por apoptosis de las células tumorales²⁵⁶. En este sentido, diversas investigaciones se han centrado también en el gen *MDM4*, un potente inhibidor de *TP53* que se encuentra sobreactivado en muchos cánceres, incluidas las NMPs crónicas^{254,256}.

TP53 es una de las dianas moleculares más importantes en cáncer, y también en el campo de la onco-hematología. Como hemos visto, sus alteraciones son uno de los biomarcadores más frecuentes durante la transformación de las NMPs crónicas, siendo la frecuencia de presentación de alteraciones en torno a un 30% en todas ellas.

1.5.1.2. *RUNX1* y *CBF- β*

Por otra parte, el factor de transcripción *RUNX1* (*Runt-related transcription factor 1*) también llamado *AML1*, *PEBP2alpha* o *CBF2alpha*, alojado en la región 22 del brazo largo del cromosoma 21, es indudablemente uno de los genes más importantes en el desarrollo hematopoyético y uno de los genes más asociados al desarrollo leucémico, habiéndose descrito diversas translocaciones, inversiones y mutaciones que afectan a este gen en las neoplasias hematológicas, incluidas las leucemias post-NMP^{109,257,258}.

El gen *CBF-β* (*core-binding factor beta*), alojado en la región 22 del brazo largo del cromosoma 16, codifica para el cofactor de transcripción asociado a *RUNX1*. La proteína CBF-β se une a *RUNX1* e incrementa su estabilidad metabólica y afinidad por el ADN, formando el complejo de transcripción heterodimérico *RUNX1-CBF-β*. Tras su formación, CBF-β media el reclutamiento de la quinasa HIPK2, cuya fosforilación es necesaria para la activación de *RUNX1* y de la actividad transcripcional del complejo. La fosforilación de *RUNX1* es dependiente de su unión con CBF-β, así como de la unión de éstos al ADN. Sin estas dos condiciones, CBF-β no recluta a HIPK2 y la fosforilación no se produce^{109,259,260}. Las translocaciones de *CBF-β* (inv16, proteína CBF-beta/MHY11) ocurren en el 5% de las LMAs *de novo*, aunque son excepcionales en las leucemias post-NMP^{113,245,246}.



Figura 1.11 Complejo de transcripción *RUNX1-CBF-β* como activador de la diferenciación celular de las células madre hematopoyéticas.

La función de *RUNX1* depende en gran medida de su capacidad para unirse e interactuar con multitud de factores y reguladores transcripcionales, siendo estas interacciones las que le permiten realizar diferentes funciones en diversas rutas. Aparte de ejercer como factor de transcripción, *RUNX1* también puede actuar como represor transcripcional, u organizador molecular, regulando a un gran número de genes de una manera específica de tejido. Entre estos “compañeros de trabajo”, se encuentran coactivadores, corepresores y reguladores

hematopoyéticos muy importantes, como el citado HIPK2, EP300, CBP, MOZ, C/EBP α , mSin3A o GATA1^{109,260}.

RUNX1-CBF- β juega un papel clave en el desarrollo hematopoyético embrionario (**figura 1.12**), donde ejerce un rol regulador fundamental: Actúa en diferentes rutas activando o inhibiendo genes relacionados con la proliferación y diferenciación de las células madre hematopoyéticas embrionarias, controlando su habilidad para diferenciarse en elementos hematopoyéticos definitivos. Ratones knock-out para *RUNX1* mostraron múltiples defectos en la hematopoyesis y en la diferenciación mieloide, así como ausencia total de hematopoyesis fetal en el hígado, muriendo a los 12,5 días de edad^{258,261}. Del mismo modo, ratones knock-out de *CBF- β* muestran un fenotipo muy similar al anterior, evidenciando que

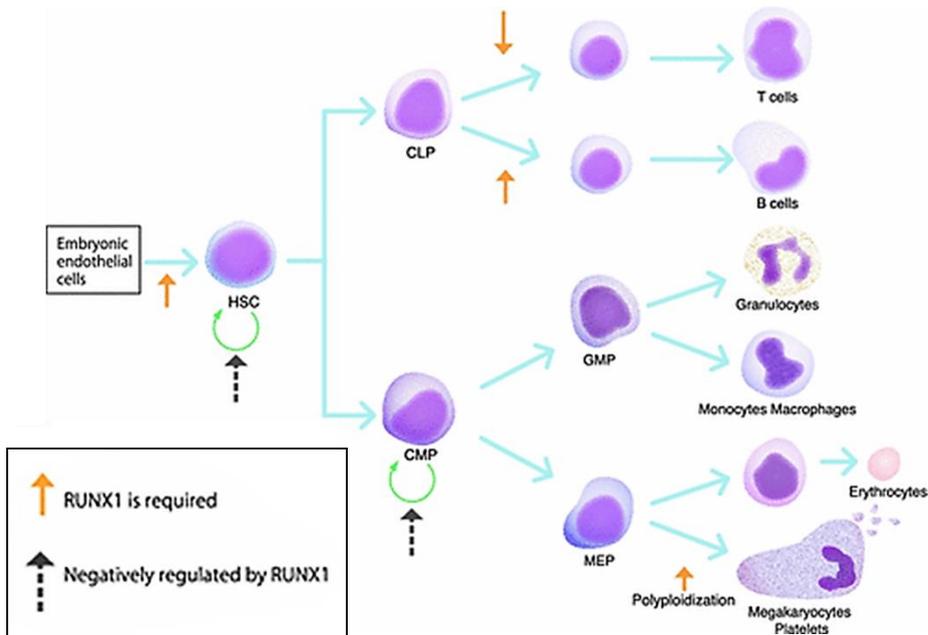


Figura 1.12 Vías del proceso hematopoyético activadas (naranja) o inhibidas (negro) por el complejo *RUNX1/CBF- β* .

ambos genes son necesarios para la función correcta de este complejo transcripcional en la hematopoyesis²⁶⁰.

Las alteraciones en la actividad de *RUNX1-CBF-β* están asociadas con la leucemogénesis y son comunes en las neoplasias hematológicas, especialmente en LMA²⁶⁰. Estas alteraciones conducen a un bloqueo de la diferenciación que conlleva un aumento proliferativo de los progenitores mieloides, susceptibles a la rápida adquisición de mutaciones secundarias que, eventualmente, pueden producir el desarrollo de una patología hematológica^{109,258}.

Por todo ello, es indiscutible el rol fundamental de *RUNX1-CBF-β* en el desarrollo hematopoyético embrionario normal y en el desarrollo de las células madre definitivas. No obstante, su papel en la hematopoyesis adulta es más desconocido¹⁰⁹. Se han encontrado deficiencias en la hematopoyesis adulta de ratones al inhibir *RUNX1* o *CBF-β*, así como múltiples efectos patológicos si su función normal es alterada. Esto se debe principalmente a que este dúo interacciona y regula múltiples genes relacionados con la señalización de los factores de crecimiento mieloides (*IL-3*, *GM-CSF*, *M-CSF*, *c-MPL*, *PU.1*) y linfoides (*receptores de las células T*, *CD11a*, *blk*, *Iga*), por lo que su ausencia produce una cascada de desregulación en múltiples rutas¹⁰⁹.

En 2004, el grupo de *Sun, et al.* demostró que ratones haploinsuficientes para *RUNX1* mostraban un mayor número de células madre hematopoyéticas (LSK), pero, por el contrario, un número mucho menor de células madre hematopoyéticas funcionales a largo plazo (LT-HSCs), denotando posibles funciones de *RUNX1* en la hematopoyesis adulta²⁶². Desde entonces, varios estudios con ratones knock-out para *RUNX1* han demostrado que los fenotipos observados difieren de la hematopoyesis normal: se observa expansión de las poblaciones de células madre hematopoyéticas y de progenitores

mieloides, trombocitopenia, linfopenia y fenotipo mieloide en hígado y bazo. Además, a pesar del aumento proliferativo, las células madre con knock-out de *RUNX1* tienen una discapacidad funcional en cuanto a injerto y repoblación medular en experimentos de trasplante con ratones irradiados²⁶³⁻²⁶⁵.

Por otra parte, Jacob *et al.* describieron que la carencia total de *RUNX1* causa un fenotipo de agotamiento de las células madre que conlleva finalmente una hematopoyesis aberrante. Esto se debe a una interrupción de las interacciones entre las células madre y el nicho hematopoyético, causado por la imposibilidad de que *RUNX1* interactúe con genes encargados de este proceso, como *Cxcr4*²⁶⁶.

Además, algunos estudios han descrito un rol protector de *RUNX1* frente a ciertas lesiones oncogénicas. *RUNX1* estaría asociado a los procesos que forman parte de la maquinaria celular protectora de las células madre/progenitoras hematopoyéticas, la cual induce apoptosis o senescencia cuando estas sufren alguna lesión. Un estudio del grupo de *Yoshiaki Ito* demostró que la inhibición de *RUNX1* en los progenitores hematológicos en un contexto de lesiones oncogénicas causadas por *NRAS*, inhibía dicha maquinaria protectora, por lo que las células no entraban en apoptosis ni senescencia y tampoco se diferenciaban, contribuyendo a la leucemogénesis²⁶⁷.

Es evidente pues, que *RUNX1-CBF- β* es también importante en la hematopoyesis adulta, sin embargo sus funciones concretas no se conocen bien y se precisan más investigaciones al respecto.

En cuanto a las alteraciones de *RUNX1-CBF β* observadas en las leucemias humanas, éstas son variadas y tendrían una función leucemogénica. Comprenden desde mutaciones puntuales en *RUNX1*, sobreexpresión o delección, translocaciones, trisomía del cromosoma 21, reordenamientos en el cr.16 (inversiones o translocaciones), e

incluso expresión diferencial de las isoformas de *RUNX1*. Todas estas alteraciones afectarían a la actividad normal de este dúo y muchas de ellas son suficientes para inducir una neoplasia hematológica. En la fase aguda de las NMPs, las alteraciones observadas incluyen mutaciones puntuales, sobreexpresión de *RUNX1*, reordenamientos de *CBF- β* y expresión diferencial de las isoformas de *RUNX1*^{110,115,252,257,258,268}.

Con estos precedentes, uno de los pilares fundamentales como punto de arranque de este trabajo es que se ha observado que proteínas *RUNX1* con mutaciones leucemogénicas no pueden ser fosforiladas por *HIPK2*, por lo que el complejo transcripcional *HIPK2*-*RUNX1*-p300 no se forma y no se realiza su actividad transcripcional. Igualmente, la proteína leucemógena *CBF- β* -*SMMHC* también inhibe esta fosforilación “secuestrando” a *HIPK2* y evitando su interacción con *RUNX1*. Por todo ello, diversos autores han postulado que algunos procesos leucemogénicos podrían deberse concretamente a la ausencia de fosforilación de *RUNX1* por parte de *HIPK2*²⁶⁰.

RUNX1 tiene varias isoformas, siendo tres de ellas las más frecuentemente expresadas (*a*, *b* y *c*). Hay mucha controversia respecto al rol que juega cada una en la hematopoyesis normal y maligna. Las isoformas *b* y *c* parecen ser las dos isoformas funcionales, sin embargo, mientras que algunos autores describen a la isoforma *b* como la más importante y comúnmente expresada en los tejidos hematopoyéticos, otros grupos otorgan este papel a la isoforma *c*^{269,270}. La isoforma *a* (exclusiva de primates) es más corta y presenta un codón de stop y ausencia del exón 8 (**figura 1.13**)^{109,271}.

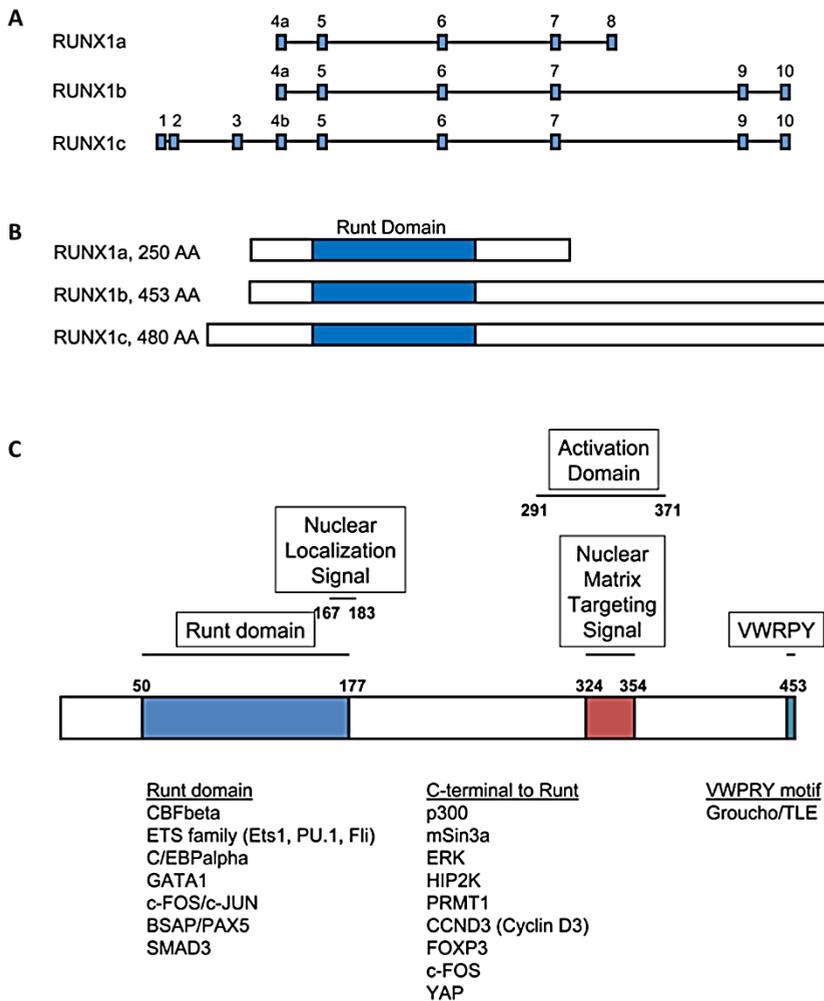


Figura 1.13 A) Principales isoformas transcripcionales de *RUNX1* y exones presentes en las isoformas *a*, *b* y *c*. B) Secuencia de aminoácidos de las tres isoformas principales. En azul se muestra el dominio runt, homólogo en todas ellas. C) Representación de los diversos motivos de *RUNX1*. En la parte de arriba se muestran los dominios de actividad de *RUNX1*. En la parte de abajo, las principales interacciones con otros genes.

Diversos trabajos han demostrado una expresión diferencial de estas tres isoformas durante el desarrollo hematopoyético embrionario, observando durante todo éste una expresión constante

de las isoformas *a* y *b*. la isoforma *c* sólo se expresa durante la determinación definitiva de las células madre hematopoyéticas, por lo que actuaría en este momento. Sin embargo, a pesar de todo ello, estas diferencias no se aprecian en células madre hematopoyéticas adultas²⁷².

La sobreexpresión de la isoforma *a* se asocia a las leucemias humanas. Tiene un efecto inhibitorio sobre la isoforma *b* debido a que la isoforma *a* carece del dominio de transactivación necesario para su función normal en la hematopoyesis^{268,273}. La expresión de *RUNX1a* genera una ventaja proliferativa en los progenitores mieloides e inhibe la diferenciación granulocítica, además, su expresión se incrementa conforme las neoplasias hematológicas progresan en su evolución clonal. Se han encontrado pacientes que poseen tanto mutaciones en *RUNX1* como sobreexpresión de su isoforma *a*^{261,274}. Se ha visto también que la expresión de *RUNX1a* en ratones trasplantados refuerza el establecimiento y expansión de la colonia de células madre hematopoyéticas, mientras que la inhibición dominante de *RUNX1a* sobre *RUNX1b* resulta en monopoyesis²⁷⁵⁻²⁷⁸.

Así pues, los niveles de expresión de las diferentes isoformas de *RUNX1* parecen jugar un papel importante en la hematopoyesis normal y maligna^{268,269}, sobre todo teniendo en cuenta que recientemente se ha demostrado que las mutaciones en genes reguladores del procesamiento del ARNm, como las que ocurren en la fase aguda de las NMPs, podrían ser las responsables, en parte, de la expresión diferencial de las isoformas de *RUNX1*. A este respecto, se observó hace dos años como mutaciones en *SRSF2* producen un aumento específico de la expresión de la isoforma “*a*” de *RUNX1*²⁶⁹.

1.5.2. Regulación de la actividad de *RUNX1-CBF-β* y *TP53*: El complejo regulador *HIPK2-EP300*

Hemos visto como las alteraciones genómicas o funcionales en *RUNX1* y/o *TP53* se observan en una proporción significativa de las NMPs en estado de transformación aguda. Por otra parte, hemos visto que dichas alteraciones son excepcionales en la fase crónica, lo que sugiere la posible implicación de *RUNX1* y/o *TP53* en la patogénesis de la progresión leucémica de estas enfermedades, cuyas bases moleculares son actualmente bastante desconocidas.

Con todo, *RUNX1* y *p53* no actúan aisladamente, sino que para su regulación transcripcional requieren la presencia de las proteínas *p300* y *HIPK2*. Éstas regulan la actividad de *RUNX1* y *p53* mediante modificaciones postraduccionales (fosforilación y acetilación), controlando dos rutas claves en los procesos leucémicos: la proliferación y diferenciación celular de los progenitores mieloides dependientes de *RUNX1*, y los procesos de respuesta al daño celular, resistencia farmacológica y apoptosis en el caso de *TP53*^{109,260,279}.

Aunque se sabe que dichas proteínas interactúan entre sí, la única información al respecto describe principalmente interacciones entre sólo dos o tres de ellas, y siempre en neoplasias distintas a las NMPs. Por tanto, son muy desconocidas a día de hoy las actividades e interrelaciones de dichos genes en el contexto de las NMPs.

Para más relevancia, *HIPK2* se encuentra en el cromosoma 7, y como se vio, las alteraciones del cromosoma 7 son muy frecuentes en la fase de transformación de las NMPs crónicas, especialmente las deleciones, e incluso la monosomía. Estas alteraciones están asociadas a mal pronóstico y a menor supervivencia^{88,111,185}. En una serie española reciente se veía como más de un tercio de los pacientes con

NMPs transformadas a LMA tenían pérdidas del brazo largo del cromosoma 7²⁸⁰, lugar donde se ubica el gen *HIPK2* (7q32-q34). No es extraño pensar, pues, que debido a dichas alteraciones en el cromosoma 7, la función de *HIPK2* se vea afectada y, por consiguiente, la función de aquellas proteínas reguladas por éste.

Aparte de las vías de regulación de *TP53* y *RUNX1*²⁸¹, *HIPK2* y *EP300* participan en múltiples rutas relacionadas con el cáncer, de modo que su funcionamiento anómalo podría contribuir de diferentes formas al desarrollo de una neoplasia agresiva.

En cuanto al estado de *HIPK2* y *EP300* en las NMPs, la información disponible es muy limitada. En dos estudios de tamaño muestral reducido no se registró ninguna mutación de EP300 en pacientes con NMPs^{282,283}. Por otra parte, no hay datos acerca del estado de *HIPK2* en las NMPs (aparte de las deleciones en el cromosoma 7), si bien la frecuencia de mutaciones de este gen en otras neoplasias mieloides es baja: del 2% y del 1,25% en las LMAs *de novo* y en los SMDs, respectivamente²⁸⁴.

1.5.2.1. *HIPK2* (Homeodomain-interacting protein kinase 2)

El gen *HIPK2*, descubierto en 1998, está alojado en la región 34 del brazo largo del cromosoma 7 (7q34) y codifica para una proteína nuclear serina-tirosina quinasa que interactúa específicamente con factores de transcripción homeodominio. Pertenece a la familia de quinasas DYRK, y dentro de ella, a la familia de proteínas HIPK, junto con *HIPK1* y *HIPK3*²⁸⁵⁻²⁸⁷.

HIPK2 tiene múltiples vías de actuación, siendo clave en muchas rutas celulares y ha sido descrito como un gen con elevada importancia en cáncer y en el desarrollo^{288,289}. Participa en múltiples

vías de regulación génica, regula la transcripción de diversos factores de transcripción y fosforila a un gran número de genes relacionados con procesos de muerte celular y de respuesta al daño en el ADN (p53, p63, p73, MPL, CtBP1, MDM2, etc), estando relacionado con mecanismos oncogénicos, así como de resistencia farmacológica y resistencia a la quimioterapia^{279,290-292}. De hecho, la expresión de *HIPK2* restaura la quimio sensibilidad, mientras que su inhibición induce quimiorresistencia²⁸¹. Del mismo modo, cuando *HIPK2* es degradado, se inhibe la apoptosis, mientras que ésta puede ser restaurada si se bloquea la degradación de *HIPK2*. Esto sugiere a *HIPK2* como diana potencial en la terapia oncogénica, sobre todo teniendo en cuenta que promover la apoptosis de células cancerosas es la principal razón detrás del uso de la quimioterapia o de la terapia ionizante^{293,294}.

En línea con su papel oncoprotector, *HIPK2*, es también capaz de regular la angiogénesis y de prevenir la invasión y metástasis tumoral, mediante la regulación de diferentes vías de señalización celular como Wnt/ β -catenina, o la vía MAPK-JNK²⁸¹. Además, participa en la regulación de la respuesta celular ante las especies reactivas de oxígeno, regulando la activación de genes oxidantes y antioxidantes y promoviendo la apoptosis en respuesta a condiciones de hipoxia, como las que se dan en el ambiente tumoral²⁹⁴⁻²⁹⁶.

HIPK2 también está relacionado con la diferenciación y proliferación^{297,298}. En concreto, se ha asociado también a la rama mieloide, especialmente durante la hematopoyesis fetal, mediante fosforilación de *RUNX1* y *EP300*^{260,299}. Además, *HIPK2* interviene en la ruta Wnt/ β -catenina, inhibiendo los genes *TCF/LEF* vía fosforilación de β -catenina, regulando así la proliferación y diferenciación celular^{294,300}. De hecho, se ha observado un incremento en la expresión de *HIPK2* durante la diferenciación mieloide inducida por G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor), lo cual indicaría que mutaciones en *HIPK2*

conllevarían la desregulación de la correcta hematopoyesis mieloide, facilitando la patogenia de la leucemia²⁸⁴.

Por último, *HIPK2* es requerido en la división celular, específicamente en la citocinesis. Así, en un contexto de inhibición de *HIPK2*, este proceso no puede llevarse a cabo, ocasionándose células tetraploides, con gran inestabilidad cromosómica o aneuploidía, lo que favorece el desarrollo tumoral^{294,298}.

Debido a todo ello, *HIPK2* ha sido descrito como “gen vigilante” o como gen supresor de tumores: su inactivación promueve la tumorigenicidad, mientras que su activación inhibe el crecimiento tumoral.^{281,298}.

Entre los factores o condiciones que incrementan la actividad de *HIPK2* se encuentran un gran número de agentes causantes de daño al ADN, como las radiaciones ultravioleta (UV) o ionizante (IR), diferentes agentes quimio terapéuticos, la acumulación de zinc o la hipoxia. De manera llamativa, se han encontrado diferentes extractos en hierbas utilizadas en la medicina tradicional china que incrementan la actividad de *HIPK2*, bien mediante inhibición del factor inducible de hipoxia-1 (*HIF-1*), bien mediante activación de la ruta *HIPK2/p53*, promoviendo la apoptosis de las células cancerosas y la supresión de la migración e invasión (**figura 1.14**)^{281,301,302}.

Como se ha visto, las deleciones en regiones del brazo largo del cromosoma 7 (7q), incluyendo las que afectan a *HIPK2*, son eventos comunes en las neoplasias mieloides. No obstante, existe poca información sobre las mutaciones de *HIPK2* en estas neoplasias.

Un estudio del grupo de *Li et al.* demostró que existían con frecuencia mutaciones en *HIPK2* en pacientes con LMA y SMD (su frecuencia en NMPs no ha sido estudiada). Se vio que las mutaciones

en *HIPK2* tenían un efecto similar al de las deleciones 7q, de manera que, pese a que los individuos con *HIPK2* mutado presentaban en su mayoría un cariotipo normal, el fenotipo final era muy similar al de las deleciones en 7q. Esto se debe a que las formas mutadas de *HIPK2* producen un efecto dominante negativo sobre la proteína *HIPK2* wt. En concreto, afectan a la localización de las proteínas *HIPK2* y *RUNX1* dentro del núcleo, no permitiendo que ambas proteínas interactúen. Por otra parte, tampoco se forma el complejo p300-*RUNX1*. Así pues, aunque la capacidad de fosforilación de *HIPK2* no se ve afectada, no se permite sin embargo una correcta activación de los mecanismos transcripcionales de *RUNX1* dependientes de *HIPK2*-p300. Por último, en el mismo trabajo también se observó una incapacidad en la activación de p53 dependiente de *HIPK2* y una disminución de los procesos transcripcionales p53 dependientes²⁸⁴.

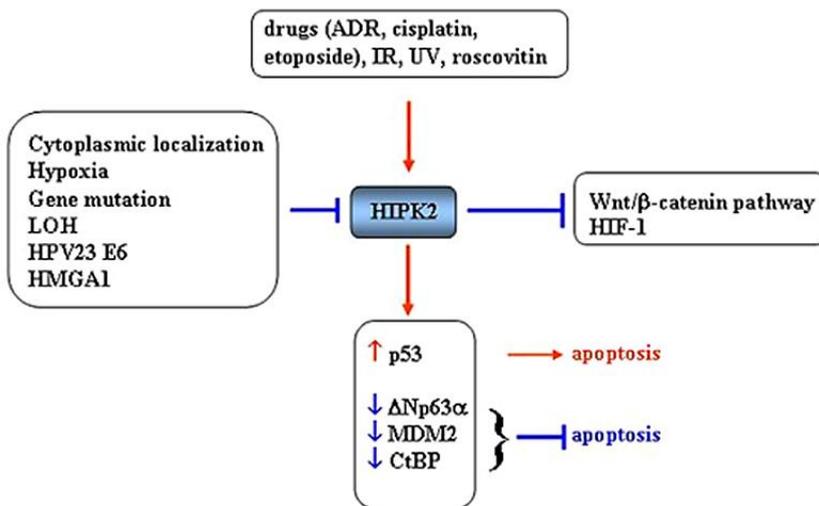


Figura 1.14 Principales rutas activadas/inhibidas por *HIPK2* en relación con el cáncer. Se muestran también los agentes genotóxicos activadores de *HIPK2*, así como las condiciones que pueden inhibir su expresión. Extracto de *D’Orazi et al. 2012*.

Todo esto evidencia aún más el requerimiento de *HIPK2* como gen regulador en los procesos hematopoyéticos normales y malignos dependientes de *EP300-RUNX1-CBF β* y *TP53*.

Se describe a continuación la interacción de *HIPK2* con *TP53* y *RUNX1-CBF- β* . Las interacciones con *EP300* se expondrán *a posteriori*.

- Interacción *HIPK2*-p53:

En condiciones de estrés celular, hipoxia y/o daño irreparable al ADN, *HIPK2* ejerce un efecto pro-apoptótico mediante la fosforilación de p53 en la serina 46, produciendo su activación y siendo dicha fosforilación necesaria para activar la apoptosis^{303,304}. Esto puede ocurrir también en condiciones en las que la actividad de *HIPK2* se encuentre alterada mediante mutaciones activadoras u otras aberraciones que la activen constitutivamente. Así, *HIPK2* juega un papel fundamental en la iniciación de la apoptosis mediante la fosforilación directa de p53^{279,290}. Además, *HIPK2* también favorece la apoptosis de manera independiente de p53, mediante inactivación de proteínas represoras de éste en respuesta al daño celular, como los represores de la apoptosis CtBP, Δ p63, o el inhibidor de p53, MDM2, promoviendo también así el proceso apoptótico^{305,306}.

El gen *MDM2* codifica para una proteína ubiquitina-ligasa, la cual marca a proteínas para su posterior degradación. *MDM2* puede bloquear la expresión de p53, pero también puede inhibir a *HIPK2* a través de p53, existiendo un bucle de regulación doble entre *HIPK2*-p53 y MDM2, y siendo MDM2 un regulador de la función proapoptótica de *HIPK2*: Cuando el daño al ADN es severo, *HIPK2* inhibe a MDM2, eliminando el bloqueo de p53 e incrementando su actividad apoptótica, regulada a su vez por *HIPK2* mediante la

fosforilación de la Ser46. No obstante, en aquellas condiciones en las que el daño al ADN es reparable, el propio p53 es capaz de inhibir la acción de fosforilación de HIPK2 sobre sí mismo, mediante la interacción con MDM2. Esto conlleva la degradación de HIPK2 y protege a p53 de la fosforilación, previniendo la apoptosis.^{293,307,308}.

La interacción HIPK2-p53 es posible gracias a la migración al núcleo celular de la proteína HIPK2, posibilitando la interacción y fosforilación de p53. Existen vías reguladoras que pueden alterar la localización de HIPK2, haciendo que pase a ser citoplasmática, lo que conlleva la detención de dicha interacción y la consecuente inhibición del proceso apoptótico. Esto ocurre, por ejemplo, cuando quinasas de la familia Src fosforilan a HIPK2, cambiando su localización y deteniendo el proceso apoptótico³⁰⁹. Por otra parte, se ha visto también cómo las mutaciones en *HIPK2* pueden alterar su localización y provocar la desregulación de la ruta *HIPK2-p53*²⁸⁴.

Por último, algunos autores como *Mao et al*, han sugerido que la capacidad de *HIPK2* como gen supresor de tumores a través de la activación de p53, depende de la presencia en las células de ambos alelos de *HIPK2*, por lo menos en algunos tipos de cáncer. Por ejemplo, en linfoma, la delección de uno de los dos alelos es suficiente para que las células desarrollen tumores en respuesta a radiación, observándose estas delecciones de *HIPK2* en más de un 30% de los tumores. En este sentido, *HIPK2* sería un gen haploinsuficiente en cuanto a su capacidad para activar la apoptosis a través de p53³¹⁰.

- Interacción HIPK2-RUNX1-CBF- β :

Uno de los genes más importantes en la regulación de la actividad de *RUNX1* es *HIPK2*. Tras la unión de RUNX1 a CBF- β , este

último recluta a HIPK2 y media la fosforilación de RUNX1 en las serinas 249 y 276, las cuales son importantes en la regulación de la capacidad de transactivación de RUNX1. De hecho, se han encontrado proteínas RUNX1 fosforiladas en estos residuos en células progenitoras hematopoyéticas (CD34+), indicando el rol de *HIPK2/RUNX1* en la hematopoyesis. Además, la fosforilación de *RUNX1* incrementa no sólo la estabilidad de éste, sino su afinidad y capacidad de unión al ADN (junto con la unión de CBF- β)^{109,260,311}.

Estudios al respecto de la acción de HIPK2 sobre RUNX1 han revelado que, tras dicha interacción, la forma activa (fosforilada) de RUNX1 interacciona con el coactivador transcripcional p300 y media la fosforilación de éste a cargo de HIPK2. En consecuencia, p-p300 activa la transcripción de los genes diana de *RUNX1*.

En este sentido, es importante la función de CBF- β , tanto en el proceso de reclutamiento de HIPK2 para que fosfore a RUNX1, como en el proceso de reclutamiento de p300 por parte de RUNX1, mediando su fosforilación a cargo de HIPK2. Es decir, la formación del complejo RUNX1-CBF- β y su unión al ADN es un proceso necesario para que se lleven a cabo de manera secuencial la fosforilación de RUNX1 y el posterior reclutamiento y fosforilación de p300^{260,311}.

Se ha observado además que la fosforilación de RUNX1 por HIPK2 reduce su interacción con histonas desacetilasas, así como con el represor transcripcional mSin3A. Es decir, la fosforilación de HIPK2 sobre RUNX1 no sólo incrementa su afinidad por el ADN y la capacidad de activación de sus genes diana, sino que también reduce las interacciones de *RUNX1* con represores transcripcionales^{109,311}.

1.5.2.2. EP300 (E1A-binding protein p300)

EP300, también denominado *KAT3B* o *p300 HAT*, está alojado en la región 13 del brazo largo del cromosoma 22 (22q13) y codifica para una enzima histona acetiltransferasa que regula la transcripción génica mediante remodelación de la cromatina. *p300* realiza esta función mediante su unión con factores de transcripción, por ello se describe comúnmente como coactivador transcripcional^{312,313}.

EP300 tiene también un rol esencial en los procesos de desarrollo y división celular, induciendo la diferenciación celular y previniendo el crecimiento y desarrollo de tumores. Su papel en el desarrollo normal es crítico, antes y después del nacimiento.

p300 también actúa como coactivador de *p53* en la apoptosis y en la regulación de su abundancia intracelular, y funciona como coactivador transcripcional del gen *HIF-1 α* , interviniendo por tanto en la activación de genes ante condiciones de hipoxia. *p300* funciona también como coactivador de *RUNX1* durante la división y diferenciación mieloide, teniendo un papel clave en el desarrollo hematopoyético. De hecho, experimentos en ratones knock-out de *EP300* causan letalidad del feto debido al fracaso total de la hematopoyesis, mientras que ratones con presencia de mutaciones en *EP300* muestran defectos hematopoyéticos muy graves (hipercelularidad en médula y bazo, anemia severa, trombocitosis, hipoplasia eritroide y defectos en el desarrollo linfoide)^{282,314}.

Las mutaciones somáticas en *EP300* se han observado frecuentemente en diferentes tipos de cánceres sólidos, incluyendo cáncer de colon, recto, estómago, mama, páncreas y próstata. Por otra parte, se han encontrado translocaciones afectando a *EP300* en algunas leucemias mieloides agudas, aunque en una frecuencia baja.

En los últimos tres años se ha descrito en LMA que la actividad inusual de *EP300* parece facilitar la leucemogénesis, así como su mantenimiento en el tiempo. Además, experimentos de inhibición de la proteína p300 in vitro demuestran un importante rol de este gen en la patogenia de la LMA, produciendo apoptosis y detención del ciclo celular en las células cancerosas tratadas³¹⁵.

La relación entre las alteraciones en *EP300* y el cáncer es muy clara: las aberraciones en *EP300* impiden la formación de una proteína funcional. Sin p300, las células son incapaces de contener el crecimiento y la división celular, permitiendo la formación del tumor.

p300 interacciona con multitud de genes y participa en múltiples vías relacionadas con los procesos anteriores. Entre esos genes se incluyen *TP53*, *RUNX1* y *HIPK2*.

- Interacción p300-p53-HIPK2:

p300 funciona como coactivador de *TP53*, uniéndose a éste mediante su dominio SRC1 y activando la transcripción de sus genes diana. De hecho, la acetilación de la lisina 382 por p300 es necesaria para la activación completa de la actividad transcripcional de p53³¹⁶, favoreciendo la activación de la cascada apoptótica e incrementando la respuesta a agentes causantes de daño al ADN, como la IR^{317,318}.

Sin embargo, para que se produzca la interacción p300-p53, es necesaria la acción de HIPK2, siendo de hecho HIPK2 el encargado de mediar el reclutamiento de p300 hacia p53, así como el reclutamiento de p300 y p53-Lys382 hacia los promotores de los genes apoptóticos. De este modo, para la correcta activación de la apoptosis a través de p53, son necesarias varias condiciones:

- 1) La fosforilación de la Ser46 de p53 a cargo de HIPK2.
- 2) El reclutamiento de p300, mediado por HIPK2, necesario para la interacción p300-p53.
- 3) La acetilación de la Lys382 de p53 a cargo de p300.
- 4) El reclutamiento de p300 y p53Lys382 para la activación de los genes apoptóticos, mediado por HIPK2.

Además, *HIPK2* es capaz de inhibir también a la deacetilasa Sirt1, la cual deacetila a p53 en la misma lisina. De este modo, *HIPK2* no sólo controla la fosforilación de p53, sino que también es capaz de regular la acetilación-deacetilación de éste a través de p300 y Sirt1, regulando totalmente la capacidad transcripcional de p53. En relación con esto, algunos estudios han demostrado que, en ausencia de *HIPK2*, la fosforilación de la Ser46 puede restaurarse mediante el uso de fármacos, pero el reclutamiento de p300 y la acetilación de la Lys382 de p53 no pueden ser restaurados en ausencia de *HIPK2*³¹⁶.

En contraposición a la interacción p300-p53, p300 es capaz de unirse también a *MDM2*, el cual hemos visto que participa en la degradación de p53. De este modo, p300 regula la abundancia intracelular de p53, activando su degradación cuando se encuentra en exceso, y controlando por tanto el exceso de apoptosis³¹⁹.

- Interacción p300-RUNX1-HIPK2:

Como se ha comentado, p300 es un coactivador transcripcional de *RUNX1*. Así, p300 se une a *RUNX1* formando el complejo transcripcional p300-RUNX1-CBF- β y regula la expresión de genes relacionados con la proliferación y diferenciación mieloide³¹¹.

Sin embargo, para que eso suceda se requiere la presencia estricta de *HIPK2*, la cual interacciona con *RUNX1* y p300 y fosforila a

ambos, formando un complejo transcripcional. De hecho, la fosforilación de p300 a cargo de HIPK2 está dirigida por la forma ya activada de p-RUNX1-CBF- β tras su interacción con HIPK2. Tras está ésta, p-RUNX1 puede actuar sinérgicamente con otros factores de transcripción también fosforilados por HIPK2 (c-myb, C-EBP α , PU.1, c-jun, c-fos, etc) para mediar del mismo modo la fosforilación de p300.

En resumen, RUNX1 no sólo recluta a HIPK2 (con la ayuda de CBF- β) hacia p300, sino que funciona también como una subunidad reguladora de HIPK2, mediando la fosforilación de p300 a cargo de éste, así como la acetilación por parte de p300 y la transcripción de sus genes diana. Además, todos estos procesos requieren la unión de CBF- β a RUNX1. Experimentos de inhibición de CBF- β , demuestran que si éste no está presente, no se lleva a cabo la fosforilación de RUNX1 ni tampoco la de p300, dependiente de la vía de RUNX1²⁶⁰.

La necesidad de *HIPK2* como regulador del complejo se evidencia en embriones de ratones que expresan la proteína dominante negativa de HIPK2, en los que todo este proceso queda inhibido. Además, experimentos en los que se sustituyeron las serinas de RUNX1 fosforiladas por HIPK2 (Ser249 y Ser276) por otros aminoácidos, dieron por resultado una ausencia de fosforilación por HIPK2 en RUNX1 y en p300, así como una ausencia casi total de activación de la transcripción por parte del complejo p300-RUNX1. Asimismo, embriones de ratón deficientes para *HIPK2* (junto con *HIPK1*), muestran también ausencia de fosforilación en RUNX1 y p300 y graves defectos en la hematopoyesis primitiva/ definitiva, vasculogénesis, angiogénesis y cierre del tubo neural. Todos estos efectos son similares a los observados en los embriones de ratones deficientes para *EP300*, evidenciando la importante relación de estos genes formando un complejo regulador de la hematopoyesis³¹¹.

Por último, se ha visto también que la interacción de HIPK2 con p300 regula positivamente la función del primero: La interacción *HIPK2*-p300 conlleva la acetilación de HIPK2, dando lugar a un aumento de su estabilidad y de su expresión proteica. Además, esta interacción mutua también reduce la ubiquitinación y degradación de HIPK2, favoreciendo su expresión. Esto fue comprobado mediante inhibición de p300, dando lugar a un descenso final en la expresión proteica de HIPK2. Por otra parte, experimentos recientes (2017) de co-expresión de p300, demostraron como la habilidad de HIPK2 para inducir apoptosis mediante la fosforilación de p53 se veía incrementada al aumentar la acetilación de p300 sobre HIPK2, mostrando una importante función reguladora de p300 sobre la actividad en respuesta al daño al ADN de HIPK2³²⁰.

1.5.3. El complejo *RUNX1/CBF- β /HIPK2/EP300/TP53*. Resumen

Es sabido en la actualidad que estos cinco genes interactúan entre ellos, y que muchas de estas interrelaciones se producen en el seno de las neoplasias hematológicas. No obstante, la mayoría de la información disponible describe relaciones únicamente entre dos o tres de sus componentes, haciendo por tanto referencia a la regulación de procesos individuales concretos, habiéndose descrito, además, en otras neoplasias diferentes a las NMPs.

Hasta la fecha, sólo existe un estudio de 2008 que explora la posibilidad de que cuatro de estos genes formen una cascada de activaciones con el fin de regular la transcripción a cargo de *RUNX1* en la hematopoyesis/leucemogénesis²⁶⁰, siendo ésta la única función estudiada de dichos genes en ese trabajo. Además, los autores exploran estos roles sólo en la LMA asociada a defectos en *RUNX1*-

CBF-β, como por ejemplo las LMAs inducidas por la translocación *RUNX1-ETO* o por la proteína *CBF-β* mutante (β -SMMHC).

En dicho estudio se confirma *in vitro* el modo en el que las proteínas HIPK2, EP300, RUNX1 y *CBF-β* colocalizan y se activan unas a otras de modo secuencial, hasta que se alcanza en último lugar la regulación transcripcional por parte de RUNX1. En la discusión, los autores sugieren que las posibles alteraciones en la función de esos cuatro genes descritas en la literatura en diferentes casos de LMA, podrían producir defectos en dicha cascada reguladora, favoreciendo una incorrecta transcripción a cargo de *RUNX1* que favorezca en última instancia procesos asociados a la leucemogénesis. No obstante, no comprueban dicha hipótesis en su trabajo.

La ruta que proponen está representada en la **figura 1.15** y sería la siguiente: El primer evento de la cascada es la unión RUNX1-*CBF-β*. Tras ello, *CBF-β* media el reclutamiento de HIPK2, el cual fosforila y activa a RUNX1. Una vez RUNX1 está activado (p-RUNX1), el dúo RUNX1-*CBF-β* media el reclutamiento de p300 y su fosforilación a cargo de HIPK2, siendo ambos genes, RUNX1 y *CBF-β*, necesarios en este proceso. Por último, una vez RUNX1 y p300 están activos (fosforilados), RUNX1 dirige a p300 hacia sus genes diana, controlando su expresión mediante su acetilación por parte de p300.

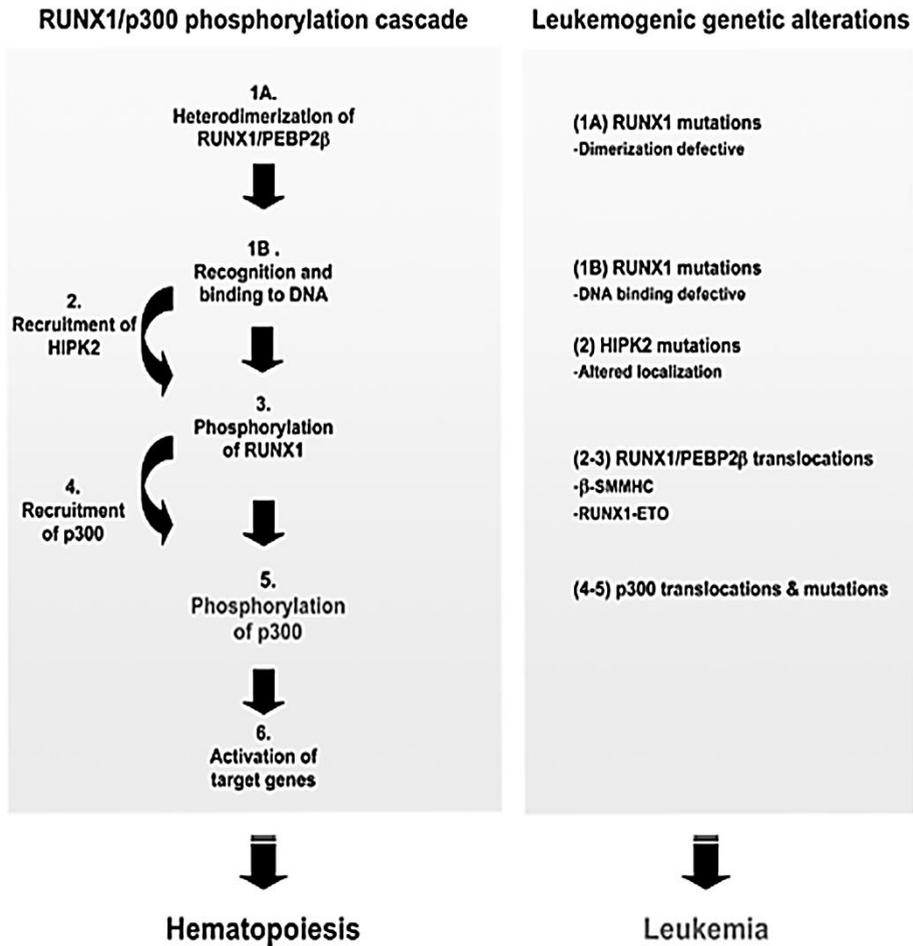


Figura 1.15 El panel izquierdo representa la ruta activadora de la hematopoyesis según la activación secuencial de los genes del complejo RUNX1-CBFβ/HIPK2/p300. A la derecha se muestran las alteraciones moleculares conocidas en las neoplasias hematológicas que afectarían a esta ruta, favoreciendo la leucemogénesis. (Extraído de *Wee et al. 2008*).

A la vista de la información disponible hasta ahora, recogida en las anteriores páginas, puede concluirse que los rápidos avances en el conocimiento molecular de los procesos leumogénicos en la última década se han basado, sobre todo, en identificar nuevas alteraciones génicas en estos procesos y estudiar sus interacciones dentro de las rutas reguladoras específicas en cada caso, aunque se ha prestado quizás menos atención al ámbito particular de las NMPs.

La relevancia reguladora que se aprecia en algunos de estos genes, como *HIP2* y *EP300*, sobre factores de transcripción como RUNX1-CBF- β y p53, junto con la cascada descrita en el último trabajo referenciado durante la leucemogénesis de la LMA asociada a defectos en *RUNX1*, permiten proponer un paso más allá en el desarrollo del conocimiento acerca de la patogénesis de las NMPs agudizadas. Así, se formulan en el capítulo siguiente las hipótesis y los objetivos que se abordan en esta tesis doctoral.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. HIPÓTESIS

Hemos visto cómo las alteraciones en la función normal de TP53 y RUNX1-CBF- β parecen jugar un papel importante en la evolución leucémica de las NMPs crónicas, lo que se confirma con el hecho de que dichas alteraciones se observan en un elevado porcentaje de pacientes en estado de transformación aguda.

Debido a que tanto la actividad de TP53 como la de RUNX1-CBF- β son reguladas continuamente mediante modificaciones post translacionales como fosforilación o metilación, cabe pensar que la función anómala de ambos genes en estas neoplasias pudiera deberse también a alteraciones en aquellos genes encargados de regular su actividad, o bien a alteraciones en su propia estructura que les impidiera ser regulados por los primeros.

Esta hipótesis cobra fuerza si observamos que durante el proceso hematopoyético normal y maligno, tanto *RUNX1* como *TP53* son regulados por el mismo complejo regulador: *HIPK2-EP300*. Recordemos que una anomalía en el funcionamiento de *TP53* puede llevar a una desregulación de los procesos de apoptosis en respuesta al daño en el ADN, es decir, las células malignas “serían incapaces” de detectar los daños en su genoma y no entrarían en el programa de muerte celular programada. Por otra parte, anomalías en RUNX1-CBF- β conllevarían un aumento proliferativo de los progenitores mieloides y una incapacidad para diferenciarse en células funcionales adultas.

Así pues, la presencia en las células hematopoyéticas de fallos en la actividad de *HIPK2-EP300*, o de alteraciones en *TP53* y *RUNX1-CBF- β* que impidan que sean regulados por *HIPK2-EP300*, podría

suponer el siguiente panorama: células progenitoras con una actividad proliferativa aumentada, incapaces de diferenciarse a elementos hematopoyéticos funcionales, e inmortales por las vías normales de apoptosis, así como incapaces también de detectar el daño en su genoma. Por tanto, quedando altamente expuestas a la posibilidad de acumulación rápida de mutaciones, debido también a su capacidad proliferativa aumentada. Es decir, estaríamos indudablemente ante procesos relativos a una neoplasia hematológica.

Hemos visto, además, cómo las alteraciones del cromosoma 7 (incluso en la región donde se ubica *HIPK2*) son también eventos frecuentes en la fase de transformación de las NMPs crónicas, especialmente las deleciones, e incluso la monosomía; y que dichas alteraciones están asociadas a mal pronóstico y menor supervivencia. Así, es factible pensar que, debido a dichas alteraciones en el cromosoma 7, la función de *HIPK2* se vea afectada y, por consiguiente, la función de *p300*, *p53* y *RUNX1-CBF-β*, ya que, en esta vía reguladora, *HIPK2* ocuparía el escalón más alto, activando mediante fosforilación al resto de componentes del complejo (excepto *CBF-β*).

De este modo, *HIPK2* estaría regulando (junto con *EP300*) varios procesos clave en la progresión leucémica de las NMPs. Todo ello sin tener en cuenta, además, que ambos genes tienen también otras funciones importantes en cáncer y participan en diversas rutas relacionadas con los procesos de desarrollo normal y maligno, incluida la hematopoyesis/leucemogénesis.

Por ello, la hipótesis general de este trabajo es que estos cinco genes formarían un complejo transcripcional con una actividad reguladora en la hematopoyesis, de modo que las alteraciones en alguno de sus miembros podrían incidir sobre las actividades del resto de componentes. Dicha desregulación, tendría además un papel clave

en el proceso patológico y en la leucemogénesis, especialmente durante la transformación neoplásica de las NMPs crónicas.

Dos de los miembros del complejo tendrían una actividad activadora/reguladora (*HIPK2* y *EP300*) mediante sus funciones tirosina-quinasa y acetil-transferasa, actuando sobre el resto de componentes de modo bilateral, por lo que el complejo tendría una función doble. Por una parte, *HIPK2* y *p300* interaccionarían con el dúo *RUNX1-CBF-β*, regulando los procesos de crecimiento, supervivencia y diferenciación celular de los progenitores mieloides. Por otra parte, *HIPK2* y *p300* interaccionarían con *p53*, regulando la respuesta al daño en el ADN, los procesos de apoptosis y la resistencia farmacológica.

Por ello, nuestra segunda hipótesis es que una actividad anormal de *RUNX1* o *p53* en las NMPs agudizadas podría deberse no sólo a la presencia de alteraciones en su estructura, sino también a la presencia de aberraciones en la función de aquellos genes que los regulan, *HIPK2-EP300*. Así, casos en las que se observa una función aberrante de *RUNX1* o *TP53* podrían deberse a la existencia de una desregulación del complejo como unidad funcional, la cual podría terminar causando los mismos efectos observados en casos individuales de aberraciones en *RUNX1* o *TP53*. Dicha desregulación, además, podría ser debida a alteraciones citogenéticas de sus componentes, las cuales producirían una función anormal de los procesos dependientes de *RUNX1* y *TP53*, favoreciendo el desarrollo leucemogénico.

Siendo así, nuestra tercera hipótesis consiste en que, si el complejo resulta estar desregulado en las NMPs, cabría pensar que manipulando biológicamente la actividad de sus componentes se podría influir en dichos procesos leucemogénicos, produciendo

efectos antiproliferativos, apoptóticos o de interrupción del ciclo celular en muestras celulares de NMPs agudizadas.

Por último, debido a que el complejo tendría funciones de respuesta al daño celular y estaría involucrado en los procesos de resistencia farmacológica, nuestra cuarta hipótesis consiste en que, manipulando la actividad de sus componentes, podríamos influir también sobre el modo en el que las células responderían a las terapias que se usan normalmente en la práctica clínica de dichas patologías.

2.2. OBJETIVOS

El objetivo principal de la presente tesis doctoral pretende evaluar el rol del complejo RUNX1/CBF- β /HIPK2/p300/p53 en la evolución leucémica de las neoplasias mieloproliferativas crónicas, lo que permitiría, si se confirman las hipótesis formuladas, avanzar en el conocimiento de los mecanismos patogénicos de dicha transformación e identificar nuevas dianas potenciales para la introducción de fármacos en la terapéutica de estas enfermedades.

Todo ello se desglosa en varios objetivos específicos, que son los siguientes.

1. Profundizar en la caracterización molecular y en el conocimiento de la actividad de los genes *RUNX1*, *CBF- β* , *EP300*, *HIPK2* y *TP53* como miembros de un complejo regulador único en las NMPs agudizadas, así como explorar la presencia y frecuencia de alteraciones citogenéticas de sus componentes en dichas patologías.
2. Estudiar los posibles efectos de una desregulación artificial de la integridad del complejo sobre varias rutas clave de la transformación

leucémica como son la proliferación, la apoptosis o la interrupción del ciclo celular.

3. Explorar el rol del complejo en los procesos de respuesta farmacológica a las terapias convencionales en función de los cambios inducidos artificialmente en su actividad.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. CULTIVO CELULAR

3.1.1. Líneas celulares

En este trabajo se utilizaron seis líneas celulares leucémicas humanas, las cuales fueron obtenidas de diferentes fuentes. Así, la línea celular HEL se obtuvo de la *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, VA, EEUU); las líneas celulares SET-2 y KU-812 fueron obtenidas de la *German Collection of Microorganisms and Cell Cultures* (DSMZ – Leibniz Institute); la línea celular MEG-01 se obtuvo de la *European Collection of Authenticated Cell Cultures* (ECACC); Por último, las líneas celulares K-562, HL-60 y fueron amablemente cedidas por el *Institute of Molecular Genetics* (IMG, Praga).

Todas ellas poseen alteraciones moleculares características de las NMPs, excepto la línea celular HL-60, la cual procede de un paciente con LMA (FAB M2).

En cuanto a las cinco líneas restantes, tres de ellas (MEG-01, KU-812 y K-562) proceden de pacientes con LMC en crisis blástica y son positivas para la translocación BCR-ABL. La línea celular SET-2 procede de una trombocitemia esencial en fase de transformación megacarioblástica, y posee la mutación *JAK2V617F*. La línea celular HEL procede de la médula ósea de un paciente con eritroleucemia y alberga también la mutación *JAK2V617F*.

Por último, en este trabajo también se utilizó la línea celular modificada Phoenix Amphotropic, la cual fue usada para los ensayos de transfección e infección, y que fue también cedida amablemente por el *Institute of Molecular Genetics* (IMG, Praga). Dicha línea celular se trata de una modificación de las células 293T que incluye a los genes

GAG/POL, los cuales contienen la información para la síntesis de la cápside viral, necesarias para la producción de retrovirus^{321,322}.

3.1.1.2. Reactivos y condiciones de cultivo

Todas las células fueron cultivadas siguiendo las condiciones estándar de cultivo a 37°C en un incubador saturado de humedad y con un flujo continuo de aire con un 5% de CO₂. Las células se cultivaron en una cabina de flujo laminar y bajo condiciones de completa esterilidad.

Las líneas celulares leucémicas fueron cultivadas con el medio de cultivo comercial RPMI 1640, suplementado con un 10-20% de Suero Bovino Fetal (según las instrucciones para cada línea), y con un 1% del combinado de antibiótico Penicilina/Estreptomicina. Aquellas líneas celulares leucémicas infectadas con el constructo pRFP-C-RS se crecieron con un suplemento adicional de Puromicina al 2% (2 mg/mL), de manera que únicamente aquellas células que habían integrado el plásmido en su genoma eran capaces de crecer, seleccionando así las correctamente infectadas.

Por último, la línea celular Phoenix Ampho, se cultivó en el medio comercial DMEM, siendo suplementada también con un 10% de suero bovino fetal y un 1% del combinado de antibiótico.

3.1.2. Cultivo de muestras celulares de pacientes y donantes control

En este estudio se utilizaron muestras celulares de sangre periférica y/o médula ósea de individuos afectados con NMP y de individuos control (sin neoplasia). En el primer caso las muestras procedían de individuos recién diagnosticados, que no habían recibido

ningún tratamiento previo y que no tenían antecedentes de neoplasia hematológica. En el segundo caso, las muestras procedían de individuos a los que se les había realizado una extracción de médula previa sospecha de alguna patología, y que finalmente resultaban estar sanos; y también de individuos donantes voluntarios (sangre periférica en este caso).

Así pues, las muestras obtenidas se dividieron en:

- Grupo control: Formado por 11 individuos sin neoplasia.
- Pacientes con LMC: Formado por 3 pacientes con LMC.
- Pacientes con NMP ph-neg: Formado por 14 pacientes, los cuales se dividían en 6 pacientes de MF, 5 pacientes de TE, un paciente con PV y dos pacientes con NMP Ph-neg no clasificable.

Todas las muestras se obtuvieron frescas y recién extraídas. A continuación, se realizó la separación en las distintas fases mediante el reactivo *Lymphoprep (STEMCELL Technologies)* para identificar y aislar las distintas poblaciones celulares. Tras ello, se recogió minuciosamente la porción celular correspondiente a los granulocitos, la cual se lavó con PBS y fue puesta en cultivo. Dicho cultivo se realizó del mismo modo que el de las líneas celulares mencionado anteriormente, aunque en este caso el medio se suplementó con un 20% de suero bovino fetal y con un 1% de piruvato sódico.

La información de los 28 individuos utilizados en este estudio se encuentra recogida en el **ANEXO I**, en las **tablas 4.9, 4.10 y 4.11**.

3.2. ENSAYOS FUNCIONALES

3.2.1. Viabilidad/Proliferación Celular (MTS)

Para realizar las mediciones de proliferación/viabilidad tras los diferentes tratamientos, se sembraron las células en grupos de tres pocillos por condición, con una cantidad de 10.000 células/pocillo, en una placa de 96 pocillos. Posteriormente, cada grupo de tres pocillos se trató con el tratamiento en cuestión y, una vez transcurrido el tiempo de tratamiento o crecimiento deseado, se midieron los valores de proliferación/viabilidad mediante el kit comercial de la casa comercial *Promega, CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay*. A los 100 μ L de cada pocillo se añadieron 20 μ L de este reactivo, y se incubó durante 1-4 horas en oscuridad. Transcurrido el tiempo de incubación, las placas fueron medidas mediante un espectofotómetro a una longitud de onda de 490nm. Los valores obtenidos fueron normalizados respecto al blanco previamente calculado, para finalmente obtener los valores de absorbancia, que son proporcionales e indicativos de los valores de viabilidad y proliferación celular.

3.2.2. Proliferación celular a largo plazo (contaje manual)

Para los experimentos de proliferación celular a tiempos de cultivo mayores de 48h-72h, el procedimiento utilizado fue diferente. En este caso, las células se sembraron en placas de 6 pocillos, usando también grupos de tres pocillos por cada condición a evaluar y añadiendo 50.000 células en 1ml de medio de cultivo por cada pocillo. Posteriormente se añadían los diferentes tratamientos o condiciones y se dejaban cultivar las células durante el tiempo deseado. En nuestro caso, las células fueron contadas manualmente cada dos días de

cultivo. Así, cada 48h, las células de los tres pocillos correspondientes a cada condición eran recogidas en diferentes tubos, centrifugadas y resuspendidas en un ml de medio de cultivo fresco. Después, una pequeña cantidad celular de cada muestra era teñida mediante el colorante Azul Tripán, y contada en una cámara *neubauer*, obteniendo los diferentes valores correspondientes al número celular/ml. A continuación, las células eran de nuevo sembradas en las placas e incubadas durante dos días más hasta la siguiente medición.

Los valores de número celular obtenido para cada medición eran el valor resultante de realizar la media aritmética de los tres pocillos de cada condición.

3.2.3. Estudio del patrón de ciclo celular

3.2.3.1. Estudio del de ciclo celular en líneas celulares

Para poder observar los patrones de ciclo celular de las diferentes líneas celulares tras los distintos tratamientos realizados, se utilizó el reactivo comercial Yoduro de Propidio (PI), el cual se une al ADN, permitiendo cuantificar el material genético mediante citometría de flujo.

Las células se sembraron en placas de 12 pocillos, añadiendo 75.000 células en 0,5ml de medio por pocillo junto con el tratamiento en cuestión. Tras el tratamiento durante 12 o 24h, las células se recogieron y resuspendieron en etanol frío, el cual permite permeabilizarlas para que el PI pueda llegar hasta el ADN, dejándolas posteriormente a una temperatura de -20°C *overnight*. Previamente al análisis mediante citometría de flujo, las células fueron lavadas con PBS y resuspendidas en 200 μl de tampón de la solución tampón, la cual contiene PI y RNAsa (*PI/RNase solution, Immunostep*). Tras ello, se

incubaron durante 30 minutos a 4°C en oscuridad, para posteriormente, ser analizadas mediante el citómetro (*BD FACSVÉRSE, BD Bioscience*).

3.2.4. Estudios de apoptosis

3.2.4.1. Estudios de apoptosis en líneas celulares

Para la realización de los estudios de apoptosis mediante citometría de flujo, se sembraron las células en placas de 12 pocillos, sembrando 50.000 células en 0,5ml de medio de cultivo por pocillo. Tras la adición del tratamiento correspondiente, las placas se cultivaron durante 24h y tras este tiempo, las células fueron recogidas, lavadas, centrifugadas y resuspendidas en una solución previamente preparada de tampón de apoptosis. Dicha solución se componía de PBS, buffer de apoptosis (*Annexin V Binding Buffer 10X, Immunostep*), PI (*PI solution, Immunostep*) y Annexina V (*FITC Annexin V, Immunostep*). Tras ello, las células se cultivaron en presencia de dicha solución durante 15-20 minutos a 4°C en oscuridad para, posteriormente, ser analizadas mediante citometría de flujo (*BD FACSVÉRSE, BD Bioscience*).

3.2.4.2. Estudios de apoptosis en muestras celulares procedentes de pacientes/donantes control

Para el caso de las muestras celulares en cultivo procedentes de pacientes y donantes control, el modo de proceder fue el mismo con algunas excepciones. En primer lugar, se aumentó el número de células sembradas en cada pocillo a 75.000 – 100.000 siempre que fue posible, debido a la mayor vulnerabilidad de las células humanas en

cultivo. En segundo lugar, la apoptosis se analizó siempre a las 24h de tratamiento. Por último, las células fueron también incubadas, dependiendo del caso, con otros anticuerpos, para poder distinguir las diferentes poblaciones celulares de la médula ósea/sangre periférica (principalmente CD45). Los anticuerpos se añadieron a la solución final del tampón de apoptosis en las cantidades convenientes según el número celular y fueron obtenidos de las casas comerciales *Immunostep* o *BD Bioscience*.

3.3. ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

3.3.1. Extracción de ADN de muestras celulares

La extracción de ADN a partir de líneas celulares se realizó siguiendo los pasos del kit comercial *DNeasy Blood & Tissue Kit* (#69504, *Qiagen*). Posteriormente, éste fue cuantificado mediante el uso del *NanoDrop* (*ND-1000 Spectrophotometer*).

3.3.2. Extracción de plásmidos bacterianos

3.3.2.1. Extracción de Bacterial Artificial Chromosome (BACs)

Para realizar la extracción de plásmidos de gran tamaño, los cuales se usaron más tarde para el diseño y ensamblaje de sondas de FISH no comerciales, se utilizó el kit comercial *NucleoBond Xtra BAC* (#740436.25, *Macherey-Nagel*).

3.3.2.2. Extracción de plásmidos de pequeño tamaño

Para realizar la extracción de los plásmidos pMSCV-IRES-GFP, pCL.Ampho y pRFP-C-RS se utilizaron los kits comerciales *GeneJET*

Plasmid Midiprep Kit (#K0482, Thermo Scientific), y Zippy Plasmid Miniprep Kit (#D4019, Zymo Research)

3.4. EXTRACCIÓN DE ARN

3.4.1. Extracción mediante Trizol/Cloroformo

Para la extracción del ARN, se recogieron y lavaron las células con PBS frío mediante centrifugación a 4°C y 1500rpm en una microcentrífuga. Tras ello, se eliminó el PBS y se añadió 1ml de *Trizol Reagent (#15596-026, ThermoFisher Scientific)*, resuspendiendo la muestra en dicha solución hasta que quedó totalmente homogénea. Inmediatamente después se añadieron 100 µL de cloroformo y se mezcló la solución rápidamente invirtiendo los tubos unas 5-6 veces. Tras ello, se dejó reposar la muestra unos 3 minutos.

Para recoger la fracción de solución en la que se encuentra el ARN se centrifugó a 13.000 rpm (16200 g) durante 15 minutos a 4°C, y se recogió la fracción transparente resultante de la centrifugación. Ésta se trasvasó a un tubo nuevo al que se le añadieron 250 µL de isopropanol. A continuación, se mezcló mediante agitación del tubo y se incubó durante 2-4 h a -20°C.

Transcurrido el tiempo de incubación se centrifugó a 13.000 rpm (16.200 g) durante 15 minutos a 4°C, y se eliminó el sobrenadante, obteniendo el precipitado donde se encuentra el material genético. Para eliminar los restos de isopropanol se realizó un lavado con 500 µL etanol 75% frío. Posteriormente se volvió a centrifugar la muestra a 13000 rpm (16200 g) durante 15 minutos a 4°C, y se eliminó el sobrenadante, resuspendiendo finalmente la muestra en 20-50 µL de H₂O libre de RNasas.

La cuantificación del ARN aislado se determinó mediante el uso del *NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer)*.

3.5. PCR CONVENCIONAL

Para el diseño de los oligonucleótidos se utilizó el programa informático *GenomeCompiler*. La lista completa de los oligonucleótidos utilizados en este estudio se encuentra en el **ANEXO II**, en la **tabla 3.1**.

Para la realización de las diferentes PCRs convencionales, se utilizó el kit comercial *Aptamer Hot Start PPP Master Mix (#A615, Top-Bio)*, siendo el siguiente el mix utilizado para las reacciones de PCR:

Tabla 3.2. Mix utilizado para la realización de PCR convencional

Componentes	Volumen
<i>Aptamer Hot Start Master Mix</i>	6 μ L
<i>Oligonucleótido Forward (10mM)</i>	0.5 μ L
<i>Oligonucleótido Reverse (10mM)</i>	0.5 μ L
<i>ADN molde</i>	1 μ L
<i>H₂O libre de DNasa</i>	4 μ L

3.6. RETROTRANSCRIPCIÓN DEL ARN A cADN

3.6.1. Tratamiento con DNAsa I

Para la eliminación del ADN residual de la muestra, se utilizó el kit de *DNAsa I* comercial (#18068015, *ThermoFisher Scientific*), cuya enzima DNAsa I actúa digiriendo el ADN presente en la muestra.

Una vez preparado el mix según las instrucciones de la casa comercial, se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se inactivó la enzima añadiendo 1 μ l de EDTA 25mM al resto de componentes, y se calentó la solución durante 10 minutos a 65°C.

3.6.2. Retrotranscripción

Para la realización de la retrotranscripción se utilizó el kit *High-Capacity cADN Reverse Transcription Kit* (#4368814, *ThermoFisher Scientific*), y se siguió el protocolo de la casa comercial para preparar el mix necesario. A continuación se pusieron los diferentes tubos en un termociclador, el cual se programó de la siguiente forma: un primer paso de 25°C durante 10 minutos, seguido por un segundo paso de 37°C durante 120 minutos, y finalizado con un ciclo a 85°C durante 5 minutos. Finalmente, las muestras se conservaron a 4°C.

3.7. PCR CUANTITATIVA

En nuestro caso, el sistema utilizado para la realización de la PCR cuantitativa fue el sistema *SYBR Green* (*PowerUp™ SYBR® Green Master Mix*, #A25918, *ThermoFisher Scientific*). La mezcla de reacción

consta del reactivo comercial de SYBR Green, los cebadores de la región a amplificar, y el cADN o ADN molde.

Tabla 3.3. Mix de PCR cuantitativa utilizado

Componente	Volumen
<i>PowerUp SYBR Green Master Mix</i>	5 μ L
<i>Oligonucleótido Forward (10mM)</i>	0.5 μ L
<i>Oligonucleótido Reverse (10mM)</i>	0.5 μ L
<i>ADN (10-25 ng)</i>	2 μ L
<i>H₂O</i>	2 μ L
<i>Volumen TOTAL</i>	10 μ L

Una vez realizado el mix para cada muestra, se programó el termociclador *QuantStudio* de *Applied Biosystems* de la siguiente manera: Un primer ciclo de 50°C durante 2 minutos, seguido de un segundo ciclo a 95°C durante 10 minutos. A continuación, tres pasos que se repetían durante 40 ciclos, y que constaban de un primer paso de desnaturalización del ADN a 95°C durante 15 segundos, un paso de alineamiento y elongación (cuya temperatura dependía de la T_m de cada par de cebadores) de un minuto, y un paso de extensión de los fragmentos a 72°C durante un minuto. Finalmente, tras terminar el programa, las muestras se conservarían a 4°C.

3.8. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Para la extracción proteica de muestras celulares, éstas fueron en primer lugar centrifugadas y lavadas con PBS frío, al que se le añadió previamente el reactivo comercial *Pierce Protease and Phosphatase Inhibitor Mini Tablets (#A32959, ThermoFisher)* para evitar la defosforilación de la muestra. Tras ello, los pellets fueron resuspendidos en una solución fría del reactivo comercial *RIPA Lysis and Extraction Buffer (#89900, ThermoFisher Scientific)* al que también se le añadió el inhibidor de fosfatasas y proteasas anterior. Posteriormente, las muestras fueron sonicadas mediante 5 ciclos de 10 segundos a una intensidad de pulso del 40%, dejando reposar 50 segundos tras cada sonicación. Durante todo el procedimiento las muestras se mantuvieron en hielo para evitar la degradación proteica.

Finalmente, las muestras se centrifugaron a 13.000 rpm durante 30 minutos, y tras ello se recogió el sobrenadante. Una pequeña parte de éste se separó para la cuantificación de proteínas, mientras que el resto se conservó inmediatamente a -80°C.

La cuantificación proteica se realizó mediante el kit comercial *Pierce BCA Protein Assay Kit (#23227, ThermoFisher Scientific)*, siguiendo el protocolo de la casa comercial.

3.9. WESTERN BLOT

Para la realización de la electroforesis de proteínas inicial, se usó el sistema de geles y cubetas de la casa comercial Clever, siendo los geles de poliacrilamida utilizados en este trabajo de entre un 4% y un 10% de acrilamida. En cuanto a los reactivos utilizados para la síntesis de los geles, la acrilamida fue obtenida de la casa comercial *Bio-Rad (30% Acrylamide/Bis Solution, 19:1 #1610154)*, los tampones

de Tris y la solución de SDS utilizados fueron preparados manualmente en el laboratorio, mientras que los reactivos persulfato amónico (PSA) y TEMED fueron obtenidos de la casa comercial *Sigma Aldrich* (#215589-100G-D y #T22500-5ML, respectivamente). Por último, el tampón de carga utilizado al cargar las muestras fue preparado también manualmente en el laboratorio (40% Glycerol, 240 mM Tris/HCl pH 6.8, 8% SDS, 0.04% bromophenol blue, 5% beta-mercaptoethanol).

Las muestras fueron cargadas en cantidades de entre 25-40 μ g y la electroforesis se realizó con un voltaje constante de 120V durante 1,5-2horas.

La transferencia se realizó a 120V durante 1-2 horas dependiendo del tamaño proteico en cada caso. Las muestras se transfirieron a membranas de PVDF (#1620177, *Bio-Rad*). El reactivo de transferencia utilizado fue obtenido de la casa comercial *Bio-Rad* (#1610734). El buffer TBS fue realizado manualmente en el laboratorio, y el *Tween20* se obtuvo de la casa comercial *Sigma Aldrich* (#P9416-100ML, *Sigma Aldrich*).

El bloqueo de las membranas se realizó durante al menos una hora con una solución de TBS-T con BSA al 5% (#A2153-50G).

Los anticuerpos primarios utilizados se disolvieron en soluciones de TBS-T con BSA al 1% y 0,1% de azida de sodio (#08591-1ML-F). A continuación, se detallan los anticuerpos primarios utilizados en este trabajo:

Tabla 3.4. Anticuerpos de western blot utilizados

Gen	Dilución	#REF	Casa Comercial
<i>HIPK2</i>	1:2000	AV32586	Sigma Aldrich
<i>RUNX1</i>	1:1000	PA5-38014	Abcam
<i>p-RUNX1 (Ser276)</i>	1:500	ab182659	Abcam
<i>P53</i>	1:5000	PLA0072	Sigma Aldrich
<i>p-P53 (Ser46)</i>	1:1000	ab76242	Abcam
<i>CBF-β</i>	1:500	ab33516	Abcam
<i>EP300</i>	1:500	ab10485	Abcam
<i>GAPDH</i>	1:60000	ab8245	Abcam
<i>β-ACTINA</i>	1:10000	D6A8	Cell signaling

Los anticuerpos primarios se incubaron siempre durante toda la noche a 4°C. Por otra parte, los anticuerpos secundarios utilizados fueron anti-Rabbit (*#A9169-2ML, Sigma Aldrich*) o anti-Mouse (*#P026002-2, Dako Agilent Technologies*), y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en una solución de TBS-T al 2% de BSA.

Por último, el revelado y visualización de los resultados se realizó por quimioluminiscencia mediante el uso del kit comercial Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (*#RPN2232, GE Healthcare Life Sciences*) y el equipo LAS3000.

3.10. HIBRIDACIÓN “IN SITU” FLUORESCENTE (FISH)

Las sondas utilizadas para la detección mediante FISH de los genes *RUNX1*, *TP53* y *CBF- β* , así como las sondas centroméricas de los cromosomas 7 y 16 fueron obtenidas comercialmente. La información relativa a dichas sondas se encuentra recogida en el apartado de resultados de este trabajo (*cap. 4. Resultados*).

Por otra parte, las sondas necesarias para la detección de *HIPK2* y *EP300*, así como los cromosomas 21 y 22 (pintado cromosómico), fueron diseñadas en el laboratorio siguiendo el método descrito a continuación.

3.10.1. Preparación y fijación de muestras

Para poder llevar a cabo esta técnica, el primer paso fue detener el ciclo de las células en metafase, lo que permite visualizar los cromosomas. Para ello, se comenzó añadiendo 100 μ l del reactivo comercial *KaryoMAX Colcemid Solution (#15212012)* al cultivo celular. Tras 5-6h después de la aplicación, se recogieron las células y se resuspendió el precipitado con cloruro de potasio (KCL), cuya finalidad es producir un choque osmótico que rompa las células. Las células se mantuvieron en dicha solución durante 15-20 minutos a 37°C. Tras ello se añadió 1ml de una dilución 1:3 de metanol/ácido acético, se mezcló mediante inversión y se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos.

Posteriormente se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 13ml de la dilución de metanol/ác.acético anterior, se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se procedió a realizar las extensiones de los núcleos celulares en los portaobjetos. Para ello, con una pipeta pasteur se dejaron caer varias gotas de la solución con los núcleos

sobre los portas, desde una altura de 1,5-2 metros, de modo que los núcleos se rompen y quedan suficientemente separados en el cristal como para permitir la visualización individual de los cromosomas.

Finalmente, la solución fue conservada a -20°C.

3.10.2. Generación de sondas no comerciales

Debido a que en nuestro trabajo se estudiaron genes para los cuales no existía ninguna sonda comercial, se fabricaron manualmente en el laboratorio sondas válidas para dichos genes con elementos convencionales, obteniendo los mismos resultados y reproducibilidad que las sondas comerciales. A continuación se exponen los pasos utilizados con este fin.

3.10.2.1. Marcaje

Para la fabricación de las sondas, se utilizaron como material genético que pueda hibridar con la secuencia genómica deseada, BACs (del inglés Bacterial Artificial Chromosomes). Estos BACs son secuencias de material genético específicas complementarias a una región concreta dentro del genoma. La manera de cultivar y extraer dichos BACs está especificada en los apartados de *cultivo bacteriano* y de *extracción de plásmidos*.

Para la realización de una hibridación son necesarios 100ng de ADN de BAC. Una vez extraído y alicuotado, este debe marcarse con elementos fluorescentes, los cuales se basan en dUTPs conjugados con fluorocromos verdes o rojos (*Green dUTP*, # 53202N32-050, *Abbot Molecular* y *Red dUTP*, # 53202N34-050, *Abbot Molecular*, respectivamente).

Para el marcaje se realizó la técnica Nick Translation (*Nick Translation Kit, #53207J00-001, Abbot Molecular*). Dicha técnica se basa en una enzima que realiza cortes aleatorios por toda la secuencia del BAC para, posteriormente repararla incorporando dNTPs presentes en el medio, gracias a la actividad exonucleasa 5'-3' de la polimerasa utilizada. De esta manera, se van incorporando aleatoriamente dNTPs con fluorocromos conjugados a lo largo de la secuencia del BAC.

El mix de marcaje usado se describe en la siguiente tabla:

Tabla 3.5. Marcaje de sondas con el protocolo Nick Translation

Componentes	Volumen
<i>1 µg ADN</i>	X µL
<i>H₂O Libre de Nucleasas</i>	(17.5 -X) µL
<i>0,2 mM Green dUTP/ Red dUTP</i>	2.5 µL
<i>0,1 mM dTTP</i>	5 µL
<i>0,1 mM dNTPs Mix</i>	10 µL
<i>10X Tampón Nick Translation</i>	5 µL
<i>Enzima Nick Translation</i>	10 µL
<i>Volumen Total</i>	50 µL

Tras la realización de las reacciones, la mezcla se incubó en un termociclador durante 16h a 15°C. Transcurrido este tiempo, se

detuvo la reacción calentando la muestra a 70°C durante 10 minutos y enfriándose posteriormente a 4°C.

3.10.2.2. Precipitación

Posteriormente al marcaje, se precipitó la sonda junto con elementos que eviten uniones inespecíficas, promoviendo la unión específica de la sonda en la región correspondiente del genoma. Para ello, se añadieron a los 100ng de sonda 6µg de Cot-1 Human ADN, 2 µg de ADN de esperma de salmón y un volumen de H₂O hasta 10µl. Tras la mezcla de estos elementos se añadió a la mezcla 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto, en dicho orden. La solución final se mezcló mediante vórtex y se incubó 16h a -20°C en oscuridad.

Posteriormente, se centrifugó a 12.000 rpm durante 30 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado en oscuridad en presencia de flujo de aire.

3.10.2.3. Hibridación

Finalmente, la sonda se resuspendió en H₂O y para cada una de las hibridaciones, se mezclaron los siguientes elementos:

Tabla 3.6. Mix de hibridación

Componentes	Volumen
<i>LSI/WCP Hybridization Buffer</i>	7 μ L
<i>H₂O</i>	(3-X) μ L
<i>Sonda (\approx100 ng)</i>	X μ L
<i>Sonda Centromérica CEP</i>	0.5 μ L
<i>Volumen Total</i>	10.5 μ L

Tras ello, la solución se mezcló con un vórtex y se extendió sobre cada una de las láminas con las extensiones de los núcleos preparadas previamente. Seguidamente, se cubrieron las láminas con cubreobjetos de 22x22 y se situaron en placas calefactoras programables *ThermoBrite (ThermoFisher Scientific)*. El programa se basó en un primer paso de 74°C durante 4 minutos (desnaturalización) y un segundo paso a 37°C toda la noche (hibridación).

Transcurridas al menos 16h desde el inicio del programa, se procedió al lavado de las láminas, para eliminar las sondas no hibridadas. Las soluciones de lavado se basan en detergentes que ayudan a eliminar uniones no covalentes, así como también a romper membranas nucleares, facilitando la visualización de los resultados.

Los lavados se realizaron de la siguiente forma: En primer lugar se retiraron cuidadosamente los cubreobjetos y se incubaron las láminas en una solución de lavado previamente atemperada a 72°C (0,4X SSC/0,3% NP40) durante 2 minutos. A continuación, las láminas se sumergieron en una segunda solución de lavado (2XSSC/0,1%NP40) a temperatura ambiente y se agitaron ligeramente durante 10

segundos. Finalmente, se dejaron secar en oscuridad durante unos minutos y tras ello, se añadieron 10-15µl DAPI en la región hibridada, se cubrió dicha región con un cubreobjetos y se dejaron incubar las láminas durante 30 minutos en oscuridad, antes de observarlas en el microscopio de fluorescencia.

3.10.2.4. Pintado cromosómico

El pintado cromosómico implica la hibridación de múltiples sondas a lo largo de los cromosomas con la finalidad de marcar el cromosoma al completo. Esto permite, entre otras cosas, observar posibles translocaciones y determinar ambos cromosomas involucrados, o identificar cromosomas para los que no se dispone de sonda centromérica (CEP).

Para marcar un cromosoma completo, se realizó una hibridación distinta sobre la muestra elegida. El mix de la reacción incluía 2µl de tampón de hibridación, 1,5µl de la sonda del cromosoma que queremos observar (en rojo o en verde) y 1,5µl de agua. La solución se mezcló mediante vórtex y se colocó sobre la zona de la extensión en la que mejor se observen las metafases, se cubrió con un cubreobjetos y se incubó en la placa calefactora programable a 72°C durante 3 minutos y 18-24h a 37°C. Al día siguiente se procedió a los lavados del mismo modo descrito anteriormente.

3.10.2.5. Visualización de resultados

Finalmente, las extensiones fueron analizadas bajo un microscopio de fluorescencia mediante el software informático *Isis Image Acquisition System*.

3.11. CULTIVO BACTERIANO

3.11.1. Reactivos y condiciones de cultivo

Para el crecimiento de bacterias (las cuales incorporan el BAC o el plásmido correspondiente previamente transformado) se preparó un medio de cultivo basado en una dilución de 20g del producto *LB Broth* (*Sigma Aldrich #L3022*) en 1 L de agua. Dicho medio fue posteriormente autoclavado.

Antes de iniciar el cultivo definitivo, se preparó un precultivo, el cual consiste en inocular una pequeña cantidad de muestra bacteriana en un volumen de 10ml de LB con el antibiótico correspondiente e incubarla a 37°C durante toda la noche.

Tras el precultivo, se procedió a determinar si la secuencia de ADN incorporada en las bacterias es la correcta. Para ello, el ADN se extrajo mediante el kit de extracción de plásmidos *ZR Plasmid Miniprep* (*Zymo Research # D4015*) y, posteriormente fue cortado mediante diferentes enzimas de restricción en lugares conocidos del mapa del vector. Después, las soluciones se cargaron y corrieron en un gel de agarosa, para conocer si las secuencias eran las correctas.

Finalmente, se seleccionaron aquellas muestras cuya secuencia incorporada fuera la correcta, y se procedió a la realización de un cultivo bacteriano de mayores dimensiones, mediante la inoculación de una pequeña muestra del precultivo en un volumen mucho mayor de medio de cultivo, al que se le añadió el antibiótico correspondiente. Para la realización de este trabajo se utilizaron como antibióticos de selección *Chloroamfenicol* (*Sigma-Aldrich #C0378*) a una concentración final de 10,2 µg/mL, y *Ampicilina* (*ThermoFisher Scientific #11593027*) a una concentración de 25 µg/mL.

Una vez obtenido el cultivo bacteriano, se conservó una pequeña alícuota a -80°C para futuros experimentos, a la cual se le añadió un 20% de glicerol al 75%.

3.12. TRANSFORMACIÓN BACTERIANA

Para la transformación bacteriana se utilizaron las células competentes *SIG-10 5-alpha* (#CMC0007, *Sigma Aldrich*), las cuales se pusieron en hielo, junto con los tubos de microcentrífuga, 20 minutos antes de comenzar el protocolo.

En primer lugar, se añadieron 45µl de células competentes y 5µl del ADN que se quería transformar en el tubo de microcentrífuga, se mezcló cuidadosamente evitando la formación de burbujas y se incubó durante 30 minutos en hielo. Tras ello, la mezcla fue sometida a un choque térmico consistente en 45 segundos de incubación a 42°C para, inmediatamente después volver a ser puestas en hielo durante dos minutos. En último lugar, se añadieron 950µl de "*Cloning Recovery Medium*" a los tubos con las células y se incubó durante 1,5 horas en agitación a 750rpm y 37°C.

Finalizado este periodo, se sembraron 300µl de la mezcla en placas petri con bactoagar y el antibiótico correspondiente, las cuales se habían preparado previamente, y se incubó toda la noche 37°C.

Al día siguiente, se seleccionaron varias colonias individuales que habían crecido en presencia del antibiótico y se procedió a realizar los precultivos bacterianos con el fin de elucidar si la secuencia que albergaban las bacterias en su interior era la deseada.

3.13. ENSAYOS DE TRANSFECCIÓN

La transfección es la manera, mediante la cual conseguimos introducir una secuencia genética de interés, que realizará unas funciones de interés, en el interior de las células eucariotas en cultivo. El efecto que tiene la transfección sobre las células, no es permanente, sino transitorio, perdiéndose después de ciertos pases celulares. Por ello este protocolo está indicado en el caso de querer ver los efectos durante un corto periodo de tiempo.

En nuestro caso, la transfección se realizó sobre las células previamente modificadas, Phoenix. Amphotropic, con el fin de introducir en ellas la información genética necesaria para que fueran capaces de sintetizar partículas retrovirales capaces de infectar a otras células. Dichas partículas retrovirales contendrían la secuencia de cDNA necesaria (shRNA) para, una vez integradas en el genoma de la célula infectada, inducir la síntesis de ARN de interferencia (siRNA) contra el gen que se deseaba silenciar, siendo éste en nuestro caso *HIPK2*.

Se obtuvieron cuatro plásmidos comerciales de la casa *Origene*. Dichos plásmidos (pRFP-C-RS) incorporaban cada uno una secuencia distinta de cDNA codificante para RNA de interferencia anti-*HIPK2* (shRNAs). Además, incorporaban una secuencia codificante para la proteína RFP (Red-Fluorescence-Protein), que permitía una correcta monitorización de la eficiencia de la transfección, y el gen de resistencia a la puomicina, para la selección de las células después de la infección. Además, se usó también el plásmido MSCV-IRES-GFP, amablemente cedido por el Institute of Molecular Genetics (IMG), de Praga. Este plásmido contenía la secuencia codificante para GFP (Green-Fluorescence-Protein), con la cual también se podía monitorizar la eficacia de la transfección, pero, además, dicha

secuencia codificante para GFP estaba contenida entre las secuencias 5' y 3' LTR, por lo que sería incluida en los retrovirus producidos tras la transfección. De este modo, este plásmido podía usarse también como control de la infección, ya que, cuando más adelante se realizara ésta, las células correctamente infectadas expresarían también GFP.

Para la realización de la técnica de transfección, el primer paso fue sembrar las células Phoenix en placas de 100mm. Una vez alcanzado el 80-85% de confluencia, se comenzó el procedimiento. Cada placa se transfectó con una secuencia de shRNA distinta. Las cuatro secuencias fueron llamadas shRNA17, 18, 19 y 20 respectivamente. Además, se transfectó una quinta placa con un plásmido que contenía una secuencia de shRNA scramble (SCR) para HIPK2. Por último, se transfectó una sexta placa con el plásmido pMSCV-IRES-GFP (llamado MSCV a partir de ahora). Además, todas las placas fueron también transfectadas con el plásmido pCL. AmpHo, el cual contenía las secuencias codificantes (genes GAG/POL) para la envoltura y el correcto ensamblaje de los virus. Como reactivo de transfección se utilizó PEI (*Sigma Aldrich, # 408727-100ML*).

Para cada placa a transfectar, se creó una solución diferente. Dicha solución contenía 1ml de medio libre de suero *Opti-MEM*, 80µl de PEI, 20µg del plásmido de interés y 20µg del plásmido previamente extraído pCL.AmpHo. Se mezcló la solución cuidadosamente y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos, mientras los cuales se procedió a cambiar el medio de cultivo de las placas que se iban a transfectar por DMEM fresco sin antibióticos y con un 2% de suero bovino fetal. Transcurrido el tiempo, se añadió lentamente la solución, que contenía los complejos DNA-lípido, gota a gota y desde muy poca altura sobre la superficie de la placa. De esta manera, se transfectaron 6 placas por cada línea celular utilizada, por lo que finalmente tendríamos 4 placas transfectadas con los cuatro shRNAs

diferentes para *HIPK2*, una placa transfectada con el shRNA scramble y una placa transfectada con el plásmido MSCV.

Posteriormente, las placas se inclinaron lentamente en todas las direcciones para asegurar la homogenización de la solución con el medio de cultivo y se incubaron a 37°C durante 5h. Tras este tiempo, el medio de cultivo de las placas se cambió por medio fresco completo.

24h post-transfección, se volvió a cambiar el medio de las placas por medio fresco completo y se continuaron incubando hasta las 48h. Entonces, se recogió el medio y se volvió a añadir DMEM fresco a la placa, que se volvió a incubar 24h más en condiciones estándar. Por otra parte, el medio recogido que contenía los retrovirus ya formados se centrifugó 5 minutos a 1500rpm. Tras ello, el sobrenadante se filtró utilizando un filtro de 0,45µm para eliminar cualquier resto celular, y la solución restante que contenía los retrovirus fue inmediatamente utilizada para los ensayos de infección o en su defecto, congelada a -80°C para su uso posterior.

Este procedimiento se repitió nuevamente 24h más tarde (72h post-transfección) y 48h más tarde (96h post-transfección), recogándose nuevas alícuotas virales que serían inmediatamente usadas en ensayos de infección o congeladas para su uso posterior.

Finalmente, tras recoger las últimas alícuotas virales (96h post-transfección), no se añadió nuevo medio a las placas transfectadas, sino que éstas se usaron para observar la fluorescencia a través del microscopio de fluorescencia, comprobando si la transfección y producción de virus se había realizado con éxito. Todas las células transfectadas con los shRNAs anti-*HIPK2* o scramble expresarían RFP (color rojo), mientras que las células transfectadas con el vector MSCV expresarían GFP (color verde). Un ejemplo de lo anterior puede observarse en la **figura 3.1**.

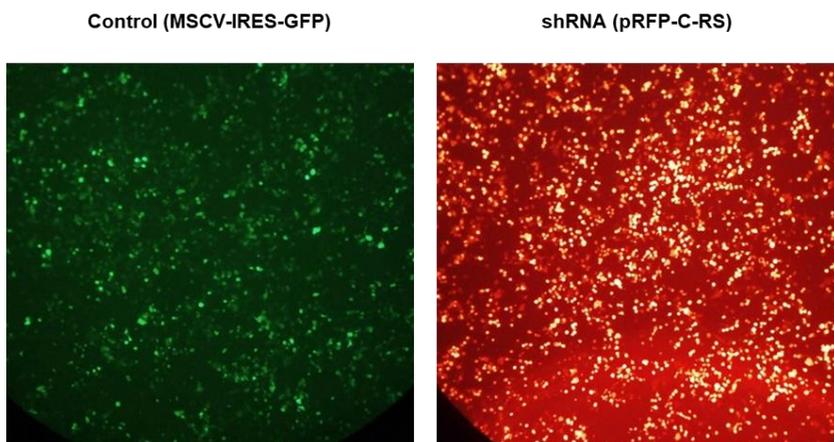


Figura 3.1 Imagen de microscopía de fluorescencia mostrando las células Phoenix expresando GFP, en verde, trasfectadas con el plásmido MSCV-IRES-GFP; y las células Phoenix transfectadas con los plásmidos que contienen la secuencia de shRNA y que expresan RFP, en rojo.

3.14. INFECCIÓN CELULAR

Para la realización de las infecciones retrovirales de células leucémicas, tuvimos que hacer algunas modificaciones en los protocolos básicos de transfección/infección, debido a la dificultad extra que presentan las líneas leucémicas en suspensión. Por ello se cambiaron varios aspectos para mejorar la eficiencia del proceso de transfección (como hemos visto) e infección: Se ajustó la cantidad de células usadas para ser transfectadas y la cantidad de virus utilizado en la infección; se mejoró también la calidad del virus y se usó la técnica de la titulación para elegir los virus más eficientes; se monitorizaron las infecciones con citometría de flujo y se incluyeron más controles. Además, tras probar diferentes cantidades de puomicina y tiempos de selección, se decidió incrementar la cantidad de ésta utilizada en la selección de las células infectadas y, sobre todo, el tiempo de selección, hasta obtener una población de células que creciera de

modo exponencial en presencia del antibiótico. Además, se fueron obteniendo diferentes extractos proteicos a diferentes tiempos post infección para elucidar cual era el momento en el que el nivel de inhibición era más elevado.

Así pues, el primer paso fue recoger y centrifugar las células que iban a ser infectadas (1.500 rpm, 5 minutos). Dichas células debían encontrarse dividiéndose exponencialmente para poder ser infectadas, por lo que las horas previas a la infección se suplementaron los medios de cultivo con mayor cantidad de suero bovino fetal (FBS) y piruvato sódico, y se comprobó que la confluencia fuera óptima. Tras la centrifugación, se resuspendió el pellet en 2ml de medio RPMI 10%FBS sin antibióticos y se añadió la solución de retrovirus recién descongelada o producida. Finalmente, se añadió a la solución una cantidad de 8µg/ml de Polybrene (*Polybrene Infection / Transfection Reagent, #TR-1003-G, ThermoFisher Scientific*). Tras ello, los tubos se invirtieron cuidadosamente 2-3 veces y fueron centrifugados a 32°C durante 60-90 minutos a 800g. Este proceso favorece mucho el encuentro entre las células y las partículas virales, promoviendo la infección.

Transcurrido este tiempo, todo el contenido de los tubos se volvió a colocar en sus respectivos frascos (células + virus + polybrene) tras una cuidadosa resuspensión del pellet en la solución viral. Los frascos se incubaron entonces durante 3-4h a 37°C en el incubador. Finalmente, tras ese tiempo, las células se volvieron a centrifugar, y en este caso, el sobrenadante viral se desechó y en su lugar se resuspendieron las células en medio completo fresco generosamente suplementado para favorecer la división y la recuperación post-infección, y se incubaron durante 24h a 37°C.

Este proceso fue repetido 24h y 48h después, es decir, se realizaron 3 infecciones con cada población celular, una cada 24h.

Una vez se terminaron los tres procesos de infección, las células recién infectadas se mantuvieron en cultivo durante 48h en condiciones normales antes de comenzar la selección.

3.15. SELECCIÓN CELULAR

Existen diferentes maneras de comprobar si la infección se ha realizado correctamente, así como el grado de infección de la población celular. En nuestro caso, los retrovirus sintetizados no incorporaban la secuencia de ninguna proteína fluorescente, excepto los virus creados a partir del vector MSCV. No obstante, sí que incorporaban un gen de resistencia a la puromicina.

Así pues, 48h después de la última infección, las células infectadas con los retrovirus MSCV fueron observadas bajo el microscopio de fluorescencia y/o analizadas bajo citometría de flujo. El grado de fluorescencia de color verde que mostraban las células nos daría una aproximación acerca del grado de infección alcanzado en el experimento.

Por otra parte, a las células infectadas con los shRNAs-anti-*HIPK2* y scramble, se les añadió el antibiótico puromicina en el medio de cultivo, a una concentración de 2 μ g/ml, y fueron cultivadas en este medio a partir de este momento, realizando pases celulares y añadiendo antibiótico nuevo cada dos días. Este proceso permitía seleccionar aquellas células que habían integrado el plásmido en su genoma, permitiendo que sobrevivieran al antibiótico. Durante la realización los pases celulares las células se recogían completamente, puesto que se encuentran en suspensión, y se centrifugaban a baja

velocidad (900-1.000 rpm). Esto permitía precipitar las células vivas y que los restos celulares quedaran en el sobrenadante.

Todo este proceso fue realizado durante 2-3 semanas, hasta conseguir una población celular estable que creciera normalmente en presencia del antibiótico. Tras ello, la población se expandió lo suficiente como para extraer proteínas y realizar un análisis de western blot, el cual revelaría si alguno de los shRNAs utilizados había producido inhibición de *HIPK2*.

3.16. TRATAMIENTOS CELULARES CON FÁRMACOS

En este trabajo se realizaron tratamientos con diversos fármacos utilizados en la terapia de los pacientes con NMPs agudizadas, así como tratamientos con el inhibidor de p300, C646.

Todos los tratamientos celulares se realizaron en placas de 96 pocillos, sembrando 10.000 células en 90µl de medio de cultivo al que se le añadieron 10µl de solución de fármaco disuelto en PBS o PBS-DMSO según la solubilidad del fármaco en cada caso. De este modo resultaba sencillo medir la viabilidad tras el tratamiento mediante espectrofotometría (MTS).

Los fármacos utilizados en este trabajo fueron Imatinib (*Sigma Aldrich*, #SML1027-10MG), Hidroxiurea (*Sigma Aldrich*, #H8627-1G), Ruxolitinib (*Santa Cruz Biotechnology*, #sc-364729) y C646 (*Sigma Aldrich*, #SML0002-5MG).

Previamente a la aplicación de los diferentes tratamientos, todas las líneas celulares que iban a ser tratadas fueron sometidas a ensayos de determinación de la Ic_{50} para cada fármaco. Dichos ensayos se realizaron también mediante la técnica de MTS.

Finalmente, se escogieron tres concentraciones de cada fármaco para realizar los diferentes tratamientos. Las tres concentraciones utilizadas correspondían con la Ic_{50} (concentración 1), la mitad de la Ic_{50} (concentración 2) y el doble de la Ic_{50} (concentración 3). Finalmente, las mismas concentraciones testadas en las líneas celulares fueron aplicadas a las muestras celulares de pacientes en cultivo.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

Los resultados obtenidos durante este trabajo, se dividen en tres bloques diferentes.

En primer lugar, se describe la caracterización molecular de los componentes del complejo *HIPK2/EP300/RUNX1/CBF-β/TP53* en tres niveles distintos: A nivel de expresión de ARNm, a nivel de expresión de proteína (normal y fosforilada), y a nivel del número de copias/alteraciones cromosómicas de dichos genes.

Todos los experimentos de este bloque fueron realizados en las seis líneas celulares descritas previamente en el apartado *MATERIALES Y MÉTODOS*, con el objetivo de estudiar la expresión, el estado de activación de los genes, así como observar las posibles anomalías a nivel de número de copias de cada uno de los genes del complejo (posibles translocaciones, deleciones o amplificaciones de estos).

En segundo lugar, se exponen los resultados funcionales obtenidos en las seis líneas celulares anteriormente citadas al modificar de manera estable la expresión de la quinasa HIPK2 o al modificar de manera química la expresión de la acetil-transferasa p300.

En este bloque se muestran resultados de expresión proteica mediante Western Blot, proliferación celular, viabilidad, análisis de citometría de flujo (FACs) correspondiente a los estudios de apoptosis y de ciclo celular, así como análisis del efecto de fármacos convencionales para el tratamiento de los NMPs en el contexto en el que la expresión de los genes del complejo está modificada.

Por último, en el tercer bloque mostraremos los resultados obtenidos al inhibir químicamente p300 en muestras biológicas de médula ósea y/o sangre periférica de 18 pacientes de NMPs y 13 donantes sanos.

Dichos efectos fueron evaluados mediante experimentos de viabilidad celular y estudios de apoptosis mediante citometría de flujo.

4.1. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL COMPLEJO *HIPK2/EP300/RUNX1/CBF-B/TP53*

4.1.1. Análisis de la expresión génica y del nivel de proteína

El gen *HIPK2* mostró un patrón muy diferencial de expresión en las diferentes líneas celulares estudiadas (**fig. 4.1 A**), teniendo una expresión muy alta en la línea celular HEL, una expresión media en las líneas MEG-01 y K-562, una expresión baja en la línea celular SET-2 y una expresión génica muy baja en las líneas celulares KU-812 y HL-60. Por otro lado, los resultados de Western Blot para la proteína *HIPK2* (**fig. 4.1 B**) mostraron una coincidencia casi total con los resultados de PCR cuantitativa, observándose un patrón de expresión muy similar. Tan sólo la línea celular HL-60 no mostró expresión proteica de *HIPK2*, por lo que en dicha línea, la baja expresión génica de *HIPK2* no parece ser suficiente para producir la expresión de la proteína.

En cuanto al gen *RUNX1*, todas las líneas celulares mostraron expresión de mRNA (**fig. 4.1 C**), siendo la línea K-562 la que mostraba una menor expresión del gen. Mediante Western Blot se observó una expresión diferencial de las tres principales isoformas de *RUNX1* (isoformas a, b y c)^{270,274}, detectándose expresión proteica de al menos

una de las isoformas en todas las líneas celulares (**fig 4.1 C**). Es llamativo que la isoforma más expresada en todas las líneas (excepto en HEL) fuera la isoforma definida en la literatura como isoforma “leucémica” (isoforma *a*), cuya expresión se asocia con el desarrollo de LMA^{268,269}. De hecho, hasta tres líneas celulares (SET-2, K-562 y HL-60) expresaban casi exclusivamente dicha isoforma “leucémica”, en detrimento de las isoformas “funcionales” *b* y *c*. Por otra parte, se estudió también la expresión de la proteína activa (fosforilada) de RUNX1, concretamente en la serina 276, diana de fosforilación de HIPK2, observándose fosforilación en casi todas las líneas estudiadas excepto en la única línea sin expresión de HIPK2 (HL-60). Además, se vio en todos los casos (excepto en HL-60) fosforilación de la isoforma *a*, habiéndolo incluso dos líneas (SET-2 y K-562) en los que dicha isoforma era la única isoforma fosforilada por HIPK2.

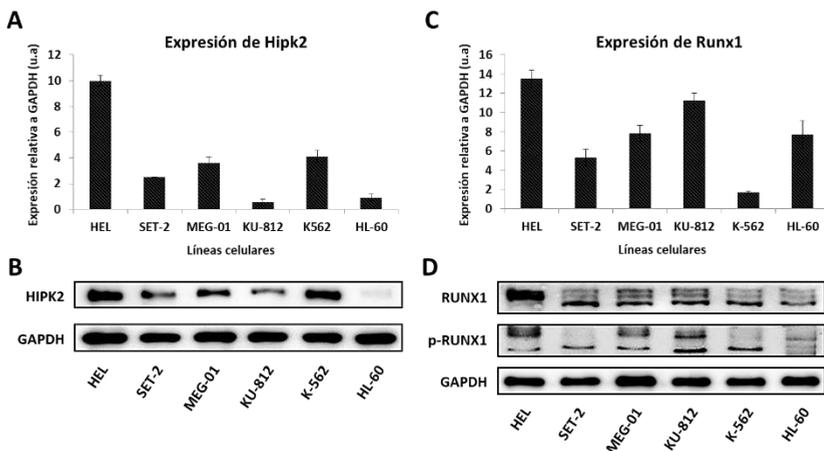


Figura 4.1 A y C) Nivel de expresión relativa mediante RT-qPCR de los genes *HIPK2* y *RUNX1* respectivamente en las seis líneas celulares estudiadas. B y D) Western Blot de los niveles de proteína de ambos genes, así como de la forma fosforilada de RUNX1, p-RUNX1, en la serina 276 (diana de fosforilación de HIPK2).

En relación a la expresión del gen *TP53* (**fig 4.2 A**), se observó una expresión alta en las líneas celulares HEL, MEG-01 y sobre todo KU-812, una expresión baja en la línea SET-2 y una expresión nula en las líneas celulares K-562 y HL-60. Estos resultados concuerdan con los resultados de nivel de proteína de p53 obtenidos mediante Western Blot (**fig 4.2 B**), con la única particularidad de que la línea SET-2 no expresó la proteína p53. Además, se estudiaron también los niveles de fosforilación de p53 en la serina 46, diana de fosforilación de HIPK2, observándose expresión de p-p53 (ser46) en las mismas tres líneas celulares, siendo la línea celular HEL la que mostró un nivel de proteína de p-p53 menor y KU-812 la que expresó una mayor expresión, especialmente alta en dicha línea.

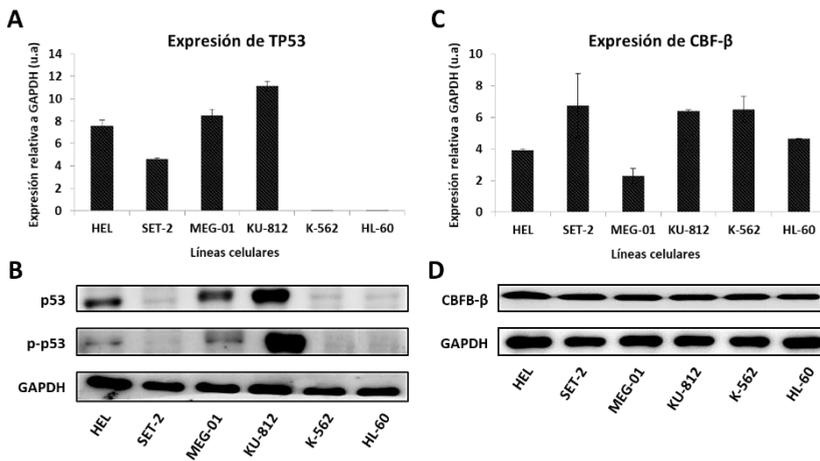


Figura 4.2 A y C) Nivel de expresión relativa mediante RT-qPCR de los genes *TP53* y *CBF-β* respectivamente en las seis líneas celulares estudiadas. B y D) Western Blot de los niveles de proteína de ambos genes, así como de la forma fosforilada de p53, p-p53, en la serina 46 (diana de fosforilación de HIPK2).

Por otra parte, el gen *CBF-β* mostró expresión génica en todas las líneas estudiadas (**fig 4.2 C**), siendo la línea celular MEG-01 la que mostró un menor nivel de expresión. Además, a nivel de proteína, todas las líneas estudiadas mostraron un patrón de expresión proteica

uniforme de CBF- β (**fig 4.2 D**), no observándose diferencias apreciables entre ellas.

Por último, se estudiaron también los niveles de expresión génica y proteica del gen *EP300* (**fig 4.3 A y B**), observando en primer lugar que todas las líneas celulares expresaban el gen, aunque las líneas HEL, SET-2 y MEG-01 tenían una expresión menor que el resto; y, por otro lado, que dichas diferencias no fueron observables a nivel de proteína, observándose una expresión de la proteína p300 uniforme en todas ellas.

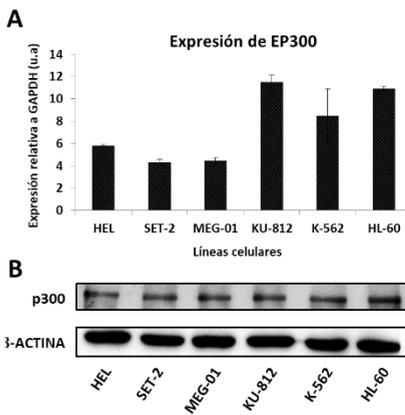


Figura 4.3 A) Nivel de expresión relativa mediante RT-qPCR del gen *EP300* en las seis líneas celulares estudiadas. B) Western Blot de los niveles de proteína p300 en dichas líneas.

Resumiendo, la expresión de los anteriores genes en las seis líneas celulares estudiadas sigue un patrón complejo, resultando muy complicado realizar agrupaciones teniendo en cuenta la expresión tan diferente de todos los miembros del complejo. No obstante, hay dos genes que muestran una expresión más uniforme (sobre todo a nivel protéico), como son *CBF- β* y *EP300*.

En las **figuras 4.4** y **4.5** se muestra un resumen de la expresión relativa, así como del nivel de proteína de los genes del complejo en las seis líneas celulares.

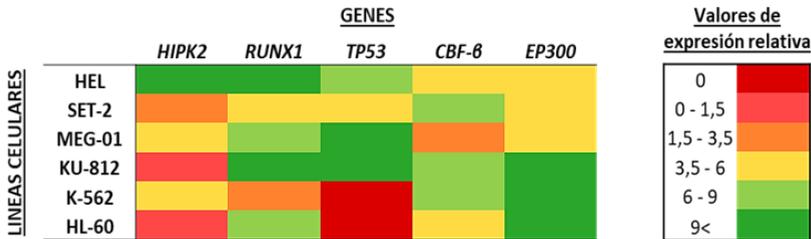


Figura 4.4 Nivel de expresión génica relativa de los genes *HIPK2*, *RUNX1*, *TP53*, *CBF- β* y *EP300* en las seis líneas celulares estudiadas. El nivel de expresión viene representado por el siguiente código de colores: rojo oscuro (sin expresión), rojo claro (expresión muy baja), naranja (expresión baja), amarillo (expresión media), verde claro (expresión alta) y verde oscuro (expresión muy alta).

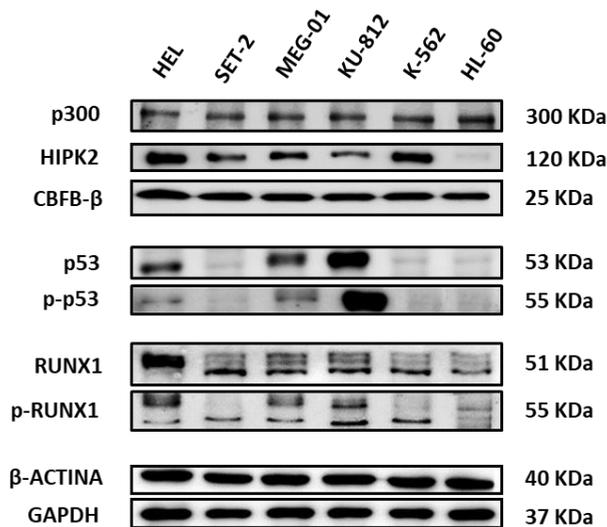


Figura 4.5 Nivel de proteína de los genes *HIPK2*, *RUNX1*, *TP53*, *CBF- β* y *EP300* en las seis líneas celulares estudiadas, así como de las formas fosforiladas p-p53 (ser46) y p-RUNX1 (ser276) y los controles β -ACTINA y GAPDH.

4.1.2. Análisis del número de copias y de posibles alteraciones génicas mediante Hibridación in Situ Fluorescente (FISH).

Para comprobar si existían alteraciones en el número de copias génicas y/o diversas anomalías genéticas como translocaciones, deleciones o amplificaciones de los genes del complejo en las diferentes líneas celulares, se utilizó la técnica de Hibridación in Situ Fluorescente (FISH). Mediante esta técnica realizamos marcajes con sondas específicas para cada gen y realizamos el conteo de 100 células en cada caso y para cada línea celular, lo que nos permitió obtener los porcentajes de ganancia, deleción o normalidad para cada gen en cada una de las líneas. Hablaremos de ganancia génica total cuando exista un mayor número de copias del gen íntegro (con todas sus regiones) que del centrómero del cromosoma al cual pertenece dicho gen. En caso de que sólo una de las regiones del gen presente mayor número de copias que el centrómero del cromosoma, hablaremos de ganancia génica parcial. El mismo criterio, pero, al contrario, será aplicado para los casos de deleción génica total o parcial. Por otro lado, cuando el número de copias del gen a estudio sea el mismo que el número de copias del centrómero del cromosoma al que pertenece dicho gen, hablaremos entonces de normalidad. A continuación, se muestran imágenes representativas de cada caso estudiado y los diferentes resultados obtenidos.

4.1.2.1. HIPK2

Debido a que no existe sonda comercial disponible para el gen *HIPK2*, en este caso la sonda fue diseñada en el laboratorio. Para ello utilizamos dos BACs comerciales los cuales se corresponden con las regiones 5' y 3' del gen *HIPK2*, y las marcamos con distintos

fluoróforos. Para identificar la región inicial del gen, que se corresponde con el exón 1 (y que incluye la región codificante para el dominio quinasa), usamos el BAC comercial *RP11-432K9*, el cual fue marcado con fluoróforos que emiten en el espectro de color rojo. Por otra parte, para la región terminal del gen (que se corresponde con los exones 7 al 15) usamos el BAC comercial *CTD-3010M17*, el cual fue marcado para emisión en color verde. Por último, para marcar el centrómero del cromosoma 7, en el cual se encuentra *HIPK2*, usamos una sonda disponible comercialmente y la cual está marcada en color azul (*Vysis CEP 7 D7Z1*), de la casa comercial *Abott Molecular*. El esquema del marcaje de FISH para *HIPK2* está recogido en la **figura 4.6**.

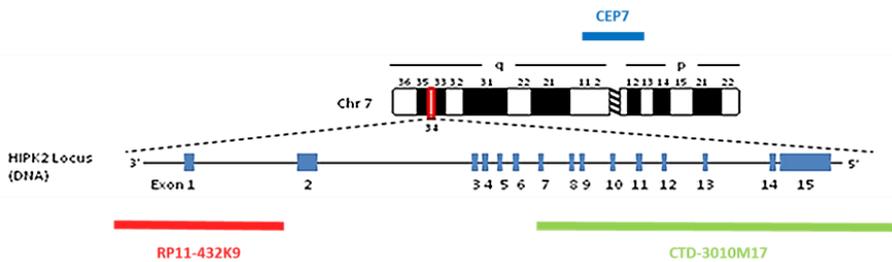


Figura 4.6 Representación esquemática del gen *HIPK2* dentro del brazo largo del cromosoma 7 y de las sondas utilizadas para su observación mediante la técnica FISH. En rojo, sonda *RP11-432K9* (región proximal); en verde, sonda *CTD-3010M17* (región terminal); en azul, sonda *CEP7* (centrómero del cromosoma 7).

A continuación, en la **figura 4.7**, se muestra un ejemplo de con dos imágenes de los resultados obtenidos para el FISH de *HIPK2* en las seis líneas celulares estudiadas. En la imagen de la izquierda se observan las señales roja y verde sobre la señal azul del DAPI, que muestra la cromatina del núcleo celular en interfase. En la imagen de la derecha, se pueden observar las tres sondas simultáneamente (*RP11-432K9*, *CTD-3010M17* Y *CEP7*) sin la señal del DAPI, lo que

permite ver los dos extremos del gen *HIPK2* junto con el centrómero del cromosoma 7.

Los resultados para el FISH de *HIPK2* mostraron una gran heterogeneidad dependiendo de la línea celular observada, siendo la normalidad (mismo número de copias del gen que centrómeros) el caso más abundante. Sin embargo, también encontramos líneas con *HIPK2* delecionado o incluso translocado. *HIPK2* permanece sin alteraciones en la gran mayoría de los casos, con algunas excepciones que nunca superan el 10% del total, observándose las señales roja y verde una al lado de la otra, lo que indica que el gen no ha sufrido ningún proceso de rotura ni de translocación parcial. A continuación, se detallan los resultados para cada línea celular.

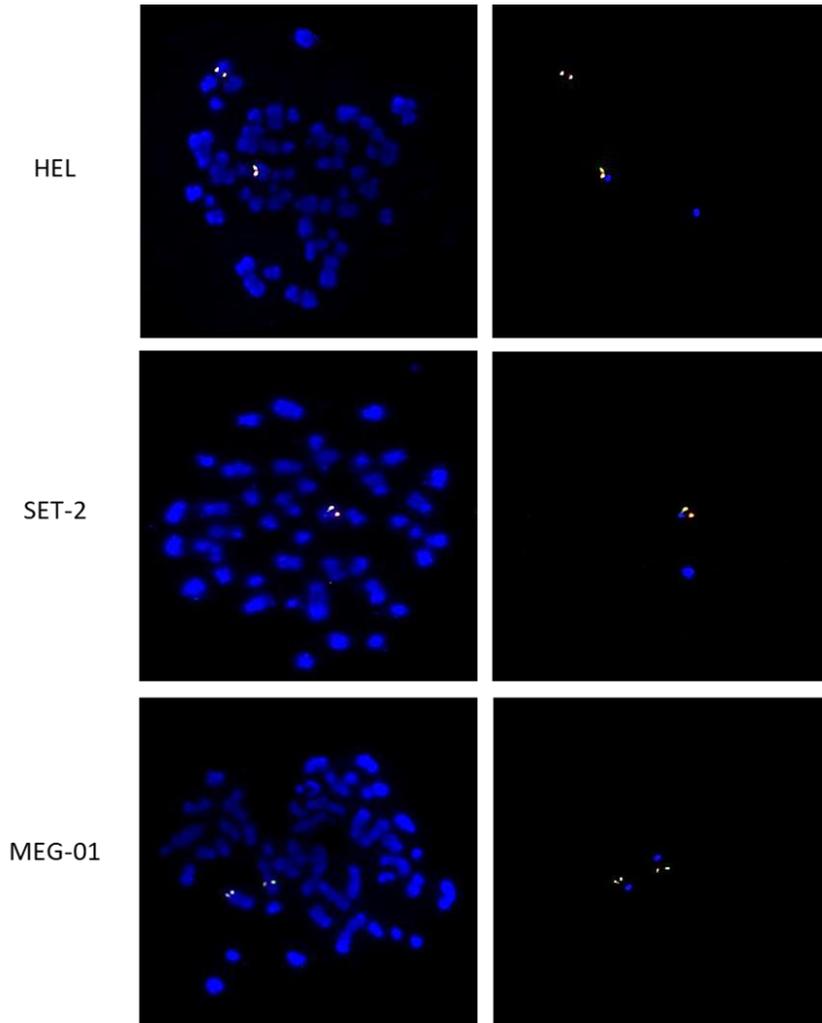
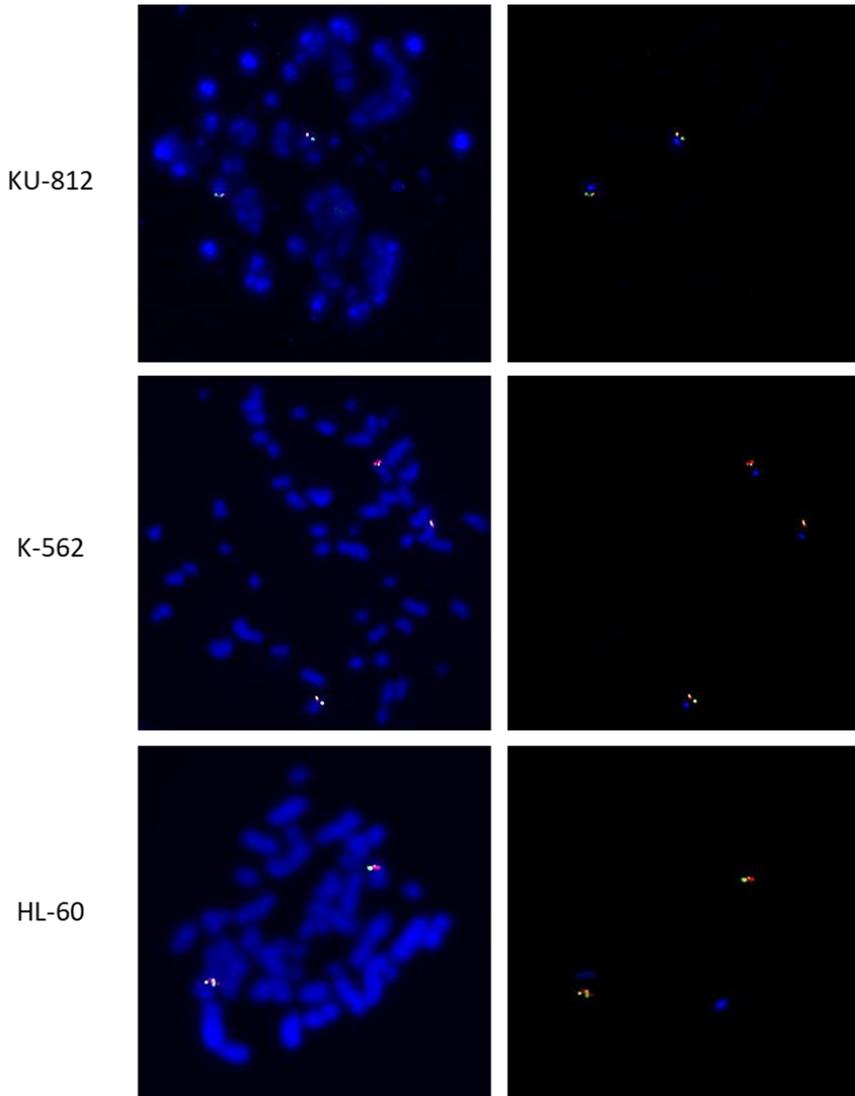


Figura 4.7 Imágenes de FISH para el gen *HIPK2* en las líneas celulares HEL y SET-2. En rojo, región proximal del gen; en verde, región terminal del gen; en azul, centrómero del cromosoma 7. Se muestran dos imágenes para cada línea celular. La imagen de la izquierda muestra las señales roja y verde sobre el fondo del DAPI. La imagen de la derecha muestra simultáneamente las señales roja, verde y azul (CEP7).



Continuación figura 4.7 Imágenes de FISH para el gen *HIPK2* en las líneas celulares MEG-01, KU-812, K-562 y HL-60. En rojo, región proximal del gen; en verde, región terminal del gen; en azul, centrómero del cromosoma 7. Se muestran dos imágenes para cada línea celular. La imagen de la izquierda muestra las señales roja y verde sobre el fondo del DAPI. La imagen de la derecha muestra simultáneamente la señal roja, verde y azul (CEP7).

Los resultados para la línea celular **HEL** mostraron que la normalidad era la tendencia más abundante en dicha línea, con una frecuencia de un 94,24% del total de células observadas y tan sólo un 5,76% de casos de ganancia génica, es decir células que mostraron más copias del gen que del centrómero del cromosoma 7. Además, el 100% de estas células mostraron 2 centrómeros del cromosoma 7, lo cual concuerda con el cariotipo descrito para dicha línea celular. Cabe destacar que esta línea mostró una tendencia a la translocación, observándose esto en un 36,36% de casos, en los que una de las copias del gen permanecía en el cromosoma 7 mientras que la otra copia se encontraba en otro cromosoma no determinado. Una imagen representativa de este caso se puede observar en la **primera imagen de la figura 4.7**.

En cuanto a la línea celular **SET-2**, ésta resultó encontrarse delecionada, siendo lo más común encontrar dos centrómeros del cromosoma 7 pero sólo una copia del gen en cada célula, y observándose esto en un 92% del total de células analizadas, como puede verse en la imagen de la línea SET-2 de la **figura 4.7**. Por otra parte, tan sólo un 8% de las células mostraron normalidad en cuanto al número de copias. El cariotipo observado también concuerda con el descrito en la bibliografía (dos cromosomas 7).

La tendencia más abundante en la línea celular **MEG-01** (**tercera imagen fig. 4.7**) fue la normalidad, siendo así en un 77,77% del total de casos observados. Además, se encontró un 20,98% de casos de ganancia génica, de los cuales el 23,5% (4,94% del total) mostraron una ganancia parcial del gen, siendo sólo la región inicial del gen (sonda *RP11-432K9*) la que mostraba más número de copias que el centrómero del cromosoma 7. Por otra parte, cabe destacar que, aunque en el cariotipo descrito para esta línea hay dos

cromosomas 7 por cada célula, se observó un gran número de células con un número de estos cromosomas superior a dos y, por tanto, un número de copias superior a dos del gen *HIPK2*. Así pues, si tenemos en cuenta el número de células con ganancia génica no parcial (el gen entero, incluyendo su región inicial y terminal se encuentra ganado) y el número de células que presentaban normalidad, aunque con más de dos cromosomas 7 y de dos copias de *HIPK2*, encontramos que el 28,4% del total de células mostraban más de dos copias de *HIPK2* en su núcleo, por lo que se puede afirmar que el 28,4% de células tenían una dotación génica de *HIPK2* superior a la normal.

La línea celular **KU-812 (cuarta foto figura 4.7)** mostró un patrón altamente normal, siendo la frecuencia de normalidad de un 85,7% del total de células observadas. Sin embargo, en esta línea se observó un 13,2% de ganancia génica. Dentro de los casos de ganancia génica, el 69,5% de ellos (9,18% del total) mostraron una ganancia parcial, siendo sólo la región inicial del gen (sonda *RP11-432K9*) la que mostraba más número de copias que el centrómero del cromosoma 7, mientras que el 30,5% restante de los casos de ganancia se debieron a una ganancia total del gen, incluyendo ambas regiones de este. Esta línea celular fue en la que más se observó la rotura del gen *HIPK2* con un 9,18% del total de casos.

El caso de la línea celular **K-562** es algo diferente al resto, ya que presenta una tetrasomía del cromosoma 7, de manera acorde al cariotipo descrito para esta línea celular. Pese a poseer cuatro cromosomas 7 en cada núcleo celular, el 75% de las células está delecionada para *HIPK2* (3 copias del gen), mientras que sólo un 25% de éstas presentan normalidad (4 centrómeros y 4 copias del gen). El hecho de que el 75% de las células estén delecionadas no debe confundirse con el hecho de que la dotación génica de *HIPK2* en la línea

K-562 sea inferior a lo normal ($2n$), ya que, debido a la tetrasomía del cromosoma 7, aunque esta línea se muestre altamente deletionada, sigue teniendo 3 copias del gen, es decir, una dotación génica mayor de lo normal para cualquier célula diploide ($2n$). Así pues, si tenemos en cuenta el número total de células que resultaron tener más de dos copias de *HIPK2*, independientemente del estado del gen respecto al número de cromosomas (ganancia o normalidad), nos encontramos con que el 91,25% del total de células presentan más de dos copias de *HIPK2*, siendo de este modo, la dotación génica superior a lo normal para las células humanas. En la **quinta imagen de la figura 4.7** se puede observar un caso de normalidad para esta línea en la que se observan tres cromosomas 7 y tres copias de *HIPK2*. Además, en la **figura 4.8. A**, se observa un caso representativo de una deleción aunque el número de copias de *HIPK2* siga siendo de cuatro (en dicho caso el centrómero del cromosoma 7 se observa en rojo, y *HIPK2* en verde).

Por último, tenemos el caso de la línea celular **HL-60**, la cual presenta normalidad en el 90,8% de los casos, aunque también bajas frecuencias de deleción (5,26%) y de ganancia génica (3,94%). En esta línea se observó un muy elevado porcentaje de células translocadas para el gen *HIPK2*, siendo la frecuencia de translocación del 81,57%. De estas translocaciones, el 89,8% fueron translocaciones heterocigotas (**última imagen figura 4.7**), es decir, tan sólo una de las dos copias del gen se encontraba translocada a otro cromosoma, mientras que la otra copia permanecía en uno de los cromosomas 7; y tan sólo el 10,2% de las translocaciones fueron homocigotas (las dos copias de *HIPK2* estaban translocadas y por tanto en cromosomas distintos al 7). En la **figura 4.8. B** se observa con más detalle una célula con una translocación heterocigota para *HIPK2*.

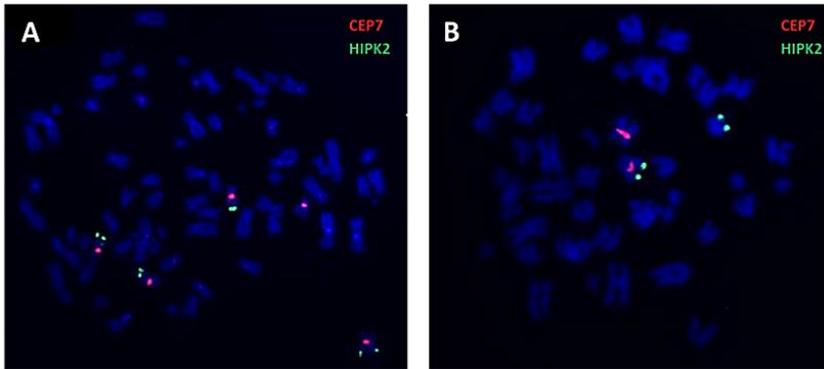


Figura 4.8 A) Imagen de FISH de la línea celular K-562 en la que se muestra una delección del gen *HIPK2*. B) Imagen de FISH de la línea celular HL-60 en la que se muestra una translocación del gen *HIPK2*. En rojo, se observa la señal del centrómero del cromosoma 7. En verde, la región inicial del gen *HIPK2* (sonda RP11-432K9).

A continuación, en la **tabla 4.1**, se muestra un resumen de las frecuencias obtenidas para *HIPK2* en las seis líneas celulares.

Tabla 4.1. Frecuencias de ganancia, normalidad y delección observadas mediante FISH, para el gen *HIPK2*

Tipo NMP	Línea celular	% Ganancia	% Normalidad	% Delección	Otras alteraciones observadas	Frecuencia alt.
NMPs ph+ (CML)	MEG01	20,98	77,77	1,23	Translocación heterocigota	2,46%
					Ganancia región proximal	4,94%
	KU812	13,2	85,7	1,1	Ganancia región proximal	9,18%
	K562	0	25	75	-	-
NMPs ph-	HEL	5,76	94,24	0	Translocación heterocigota	36,36%
					Ganancia región proximal	2,62%
	SET2	0	8	92	-	-
AML	HL60	3,94	90,8	5,26	Translocación heterocigota	81,57%
					Translocación homocigota	7,90%

* El 28,4% de las células observadas en la muestra MEG-01 presentaban más de dos copias del gen *HIPK2*.

** El 91,25% de las células observadas en la muestra K-562 presentaban más de dos copias del gen *HIPK2*.

4.2.1.2. RUNX1

Para estudiar el número de copias del gen *RUNX1*, así como las posibles alteraciones cromosómicas en torno a la región del cromosoma 21 (21q22.12) en la que se encuentra dicho gen, se usó la sonda comercial *AML1 (RUNX1) Breakapart LPH 027* de la casa comercial *Cytocell*. Esta sonda se trata en realidad de dos sondas juntas que hibridan en diferentes zonas dentro de la región 21q22.12, tal y como se puede apreciar en la **figura 4.9**. Una primera sonda hibrida en una región de 167kb que incluye los exones 1-6 del gen *RUNX1* y emite fluorescencia en color verde. La segunda sonda hibrida en una región de 148kb, fuera de la zona ocupada por *RUNX1* y coincidiendo con el gen próximo *CLIC6*.

Debido a que no se pudo disponer de una sonda comercial centromérica que pudiera ser observada con un filtro diferente al verde y rojo, se optó por realizar la técnica del pintado cromosómico, en la cual múltiples sondas de un mismo color fluorescente hibridan en regiones complementarias del cromosoma que se quiere analizar, observándose así la fluorescencia en el cromosoma entero.

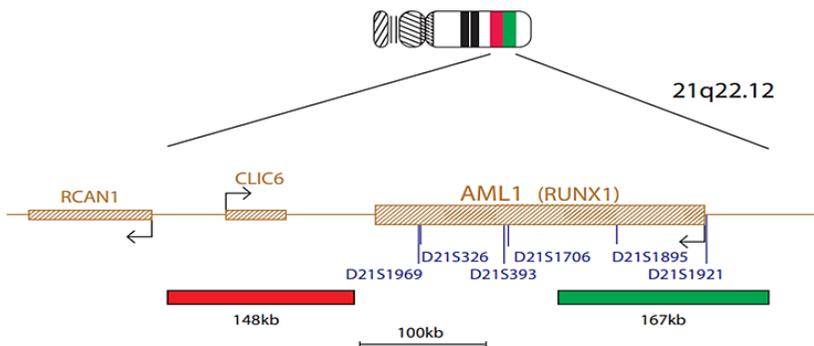


Figura 4.9 Esquema representativo de la sonda comercial utilizada para reconocer el gen *RUNX1* mediante hibridación in situ fluorescente (FISH).

Puesto que la sonda para nuestro gen de interés *RUNX1* emitía fluorescencia en verde, y debido a que el gen marcado por la sonda roja no era de nuestro interés, se realizó un pintado en rojo del cromosoma 21. De este modo, la fluorescencia roja del pintado cromosómico absorbería la señal de *CLIC6*, por lo que finalmente se vería una única señal roja identificando al cromosoma 21, y la fluorescencia verde nos marcaría el gen *RUNX1*.

A continuación, en la **figura 4.10** se pueden observar imágenes representativas realizadas durante el conteo de *RUNX1* en las seis líneas celulares estudiadas.

Tal y como se observa en la figura, el gen *RUNX1*, sigue también un patrón diferencial en cuanto al número de copias en las distintas líneas celulares, observándose casos muy diferentes según la muestra observada. Por lo que también será analizado de manera separada en las diferentes líneas.

En la línea celular **HEL (primera imagen figura 4.10)** se vio que la gran mayoría de las células presentaban tres o cuatro cromosomas 21, siendo todos los cromosomas de tamaño normal y también normales para *RUNX1* (cada uno contenía una copia del gen en su interior), excepto uno de los cromosomas, que tenía un tamaño anormalmente grande y parecía tener varias copias seguidas del gen (siempre tres o más copias). Este resultado puede apreciarse muy bien en la figura anterior y se pudo observar en el 92% del total de células observadas, mientras que sólo un 8% de las células se pueden considerar normales, es decir, sin la presencia de este cromosoma más grande de lo normal. Esto podría explicar porque la línea celular HEL muestra una muy elevada expresión de *RUNX1* por RT-qPCR, como se explicará más adelante.

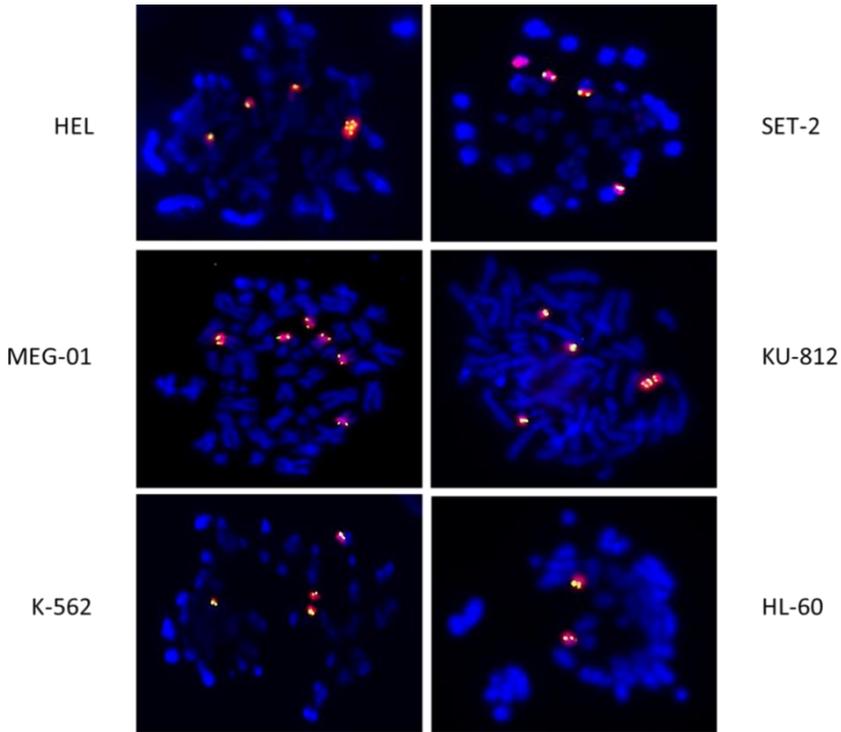


Figura 4.10 Imágenes representativas del estudio del gen *RUNX1* mediante hibridación in situ fluorescencia (FISH) en las líneas celulares HEL, SET-2, MEG-01, KU-812, K-562 y HL-60. En rojo, pintado cromosómico del cromosoma 21; en verde, sonda comercial para el gen *RUNX1*.

Por su parte, la línea celular **SET-2**, mostró una gran heterogeneidad en cuanto al número de cromosomas 21, encontrándose células con diferente número de estos cromosomas, sin embargo, la tendencia fue siempre la misma. Esta línea celular mostro deleción de una o más copias de *RUNX1* en el 75% del total de casos observados, siendo normales tan sólo un 25% de los casos. Aun así, el 98% de estas células resultaron tener más de dos copias de *RUNX1* a pesar de la deleción. En la **segunda imagen de la figura 4.10**, puede observarse un caso de una deleción, siendo una célula con

cuatro cromosomas 21, sin embargo, tan sólo tres de ellos contienen en su interior la señal verde de la sonda para *RUNX1*.

Las células de las líneas celulares **MEG-01 y K-562 (tercera y cuarta imagen figura 4.10)** mostraron una homogeneidad casi total en cuanto al estado de *RUNX1*, con unas frecuencias de normalidad del 97% y 95% respectivamente. Aunque el número de cromosomas 21 también presentaba variación dependiendo de la célula observada, éstos siempre contenían en su interior una copia del gen *RUNX1*, mostrando pues el mismo número de copias del gen que de cromosomas 21. De todos modos, ambas líneas presentaban por lo general más de dos copias de *CEP21/RUNX1* en sus células, viéndose esto en un 80,1% de los casos en la línea MEG-01 y en un 70,5% de los casos en la línea K-562.

En el caso de la línea celular **KU-812**, es curioso destacar que mostró un patrón exactamente idéntico al de la línea celular HEL, observándose también células con tres o cuatro cromosomas 21, de los cuales todos resultaban normales excepto uno de ellos, que tenía un tamaño más grande de lo habitual y que contenía tres o más copias del gen *RUNX1*. Esto se observó en el 90% del total de casos (**cuarta imagen figura 4.10**). Este experimento fue repetido en varias ocasiones, y de diversas formas, ya que resultaba muy curioso que el resultado fuera tan parecido al de la línea celular HEL, sin embargo, el resultado obtenido fue el mismo en todos y cada uno de los experimentos realizados, por lo que se puede afirmar que ambas líneas presentan el mismo patrón para *RUNX1*, aun tratándose de dos líneas muy diferentes. Es curioso también destacar que la línea celular KU-812 también tiene una muy elevada expresión de ARNm del gen, al igual que la línea HEL. Además de todo lo mencionado anteriormente, se vio también que un 3,22% de las células mostraban

una copia extra de *RUNX1* en otro cromosoma no determinado, sin embargo, al ser un porcentaje tan bajo no puede considerarse significativo. El resto de las células (6,78%), tenían un patrón de normalidad.

Por último, el análisis mediante FISH de la línea celular **HL-60** (última imagen figura 4.10) dio como resultado un patrón de normalidad en el 100% de las células observadas, teniendo todas ellas dos cromosomas 21 y dos copias de *RUNX1*, una dentro de cada cromosoma.

En la **tabla 4.2** se recogen las frecuencias obtenidas para el gen *RUNX1* en las seis líneas celulares.

Tabla 4.2 Frecuencias de ganancia, normalidad y delección observadas mediante FISH, para el gen *RUNX1*

Tipo NMP	Línea celular	% Ganancia	% Normalidad	% Delección	Otras alteraciones observadas	Frecuencia alt.
	MEG01	1,66	96,68	1,66	-	
NMPs ph+ (CML)	KU812	93,22	6,78	0	Presencia de un cromosoma 7 con múltiples copias del gen	90%
	K562	2,44	95,12	2,44	-	
	HEL	92	8	0	Presencia de un cromosoma 7 con múltiples copias del gen	92%
NMPs ph-	SET2	0	25	75	-	
AML	HL60	0	100	0	-	

4.1.2.3. TP53

Para el conteo del número de copias de gen *TP53* se usó el kit comercial *XL TP53/17cen (D-5103-100-OG)*, de la compañía comercial *Metasystems*. Dicho kit consta de dos sondas, una para el gen *TP53* y la otra para marcar el centrómero del cromosoma 17, donde éste se encuentra ubicado. Tal y como se observa en la **figura 4.11**. La sonda para *TP53* hibrida en una región de 159kb y está marcada de modo que

emitirá fluorescencia en color rojo. Por otra parte, la sonda centromérica (CEP17) estará marcada con fluoróforos de color verde.

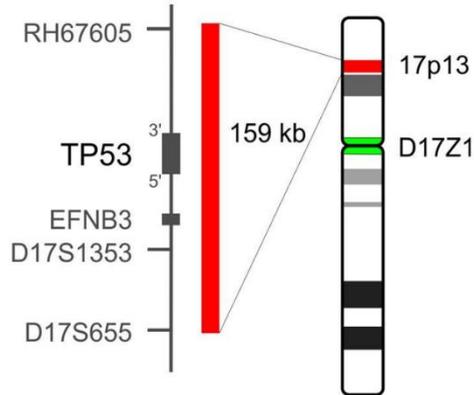


Figura 4.11 Imagen esquemática del kit comercial utilizado para el análisis del gen *TP53* mediante hibridación in situ fluorescente (FISH). En rojo, sonda para *TP53*; en verde, sonda centromérica para el cromosoma 17 (CEP17).

En la **figura 4.12**, se muestran los resultados obtenidos para el conteo mediante FISH de *TP53* en las seis líneas celulares.

El análisis del gel *TP53* fue mucho más sencillo que el de los genes hasta ahora descritos, ya que se observó una gran homogeneidad en todas las células dentro de cada línea celular. Tampoco se observó ninguna anomalía ni alteración cromosómica más allá de la delección. Así pues, las líneas **SET-2**, **MEG-01** y **KU-812** mostraron un patrón de normalidad para el gen *TP53*, siendo las frecuencias de normalidad del 100% en los dos primeros casos, y del 93% en la línea celular KU-812 (el 7% restante, sin embargo, presentaban delección para *TP53*). Por otra parte, las líneas celulares **HEL**, **K-562** y **HL-60** se encontraban delecionadas, siendo las frecuencias de delección de aproximadamente el 100% en el caso de la línea K-562 y en torno al 70% en los otros dos casos, mientras que el

resto de células eran normales para dicho gen. De este modo, tal y como se comentará más adelante, la deleción de *TP53* en las líneas K-562 y HL-60 podría ser la causante de la nula expresión de este gen a nivel de ARNm y proteína, tal y como se vio anteriormente.

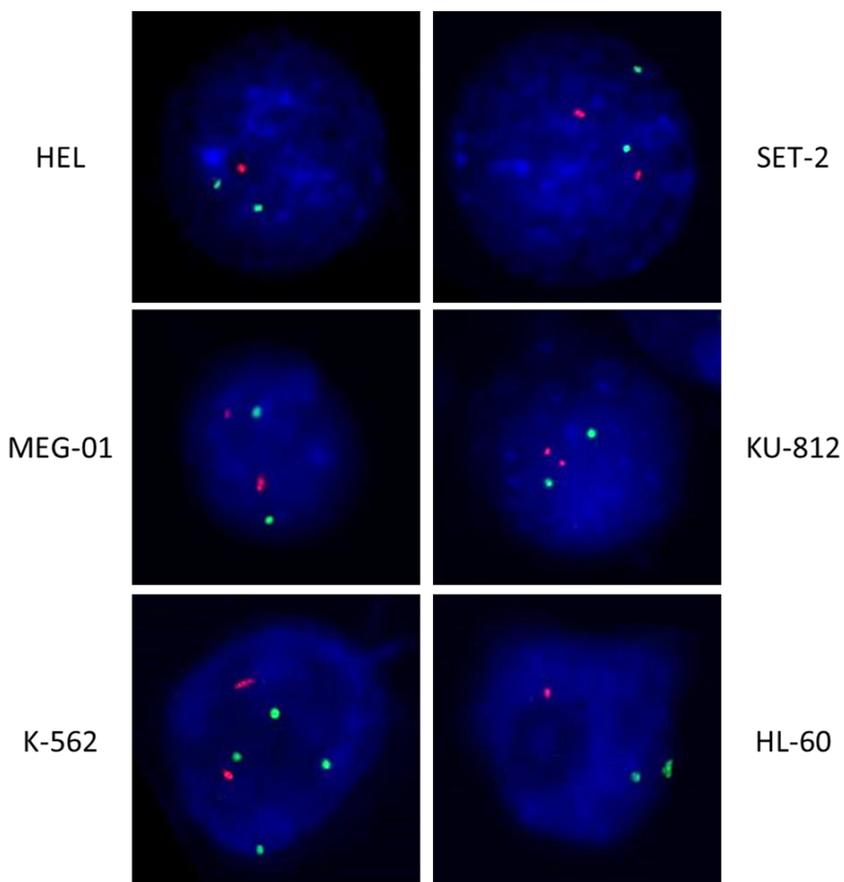


Figura 4.12 Imágenes representativas del estudio del gen *TP53* mediante hibridación in situ fluorescente (FISH) en las líneas celulares HEL, SET-2, MEG-01, KU-812, K-562 y HL-60. En rojo, *TP53*; en verde, sonda centromérica para el cromosoma 17 (CEP17).

Las frecuencias de ganancia, normalidad y deleción para *TP53* se encuentran recogidas en la siguiente tabla (**tabla 4.3**).

Tabla 4.3. Frecuencias de Amplificación, normalidad y delección observadas mediante FISH, para el gen TP53

Tipo NMP	Línea celular	% Ganancia	% Normalidad	% Delección
NMPs ph+ (CML)	MEG01	0	100	0
	KU812	0	93	7
	K562	0	2	98
NMPs ph-	HEL	0	30	70
	SET2	0	100	0
AML	HL60	0	29	71

4.1.2.4. CBF- β

Para el análisis y contaje del número de copias del gen *CBFB- β* se utilizó la sonda comercial *Vysis LSI CBFB Break Apart FISH Probe*, de la casa comercial *Abbott Molecular*. Tal y como se puede observar en la **figura 4.13**, la sonda Break Apart para *CBF- β* consta a su vez de dos sondas, marcadas en colores diferentes, de modo que es posible identificar el principio y el final del gen. La sonda marcada con fluoróforos rojos hibridará en una zona de la región 16q22 de 130kb, que incluye aproximadamente los exones 1-4 de *CBF- β* . Por otra parte, la sonda marcada con fluoróforos verdes, de 204kb, incluye la región terminal del gen (parte del intrón 5 y el exón 6). De este modo, se puede identificar fácilmente si existe rotura del gen *CBFB- β* y translocación a otro cromosoma, tal y como se ha descrito en algunas leucemias.

Por otra parte, para la detección del centrómero del cromosoma 16 (CEP16), donde se encuentra ubicado *CBFB- β* , se utilizó la sonda comercial *Vysis CEP 16 (D17Z1) SpectrumAqua Probe*, también de la casa comercial Abbot Molecular, la cual emite fluorescencia en color azul. De este modo, nos encontramos con un caso similar al del conteo del gen *HIPK2*, en el que se pudo observar las regiones inicial y terminal del gen en rojo y verde respectivamente, y el centrómero del cromosoma en azul.

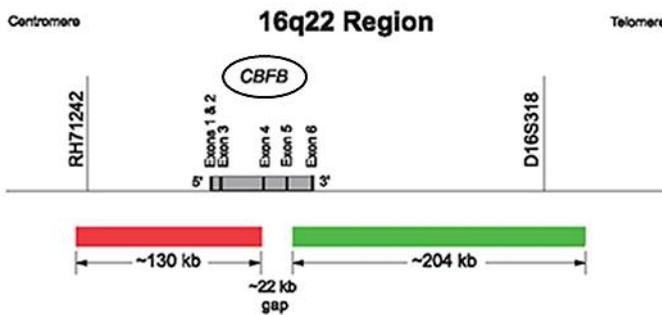


Figura 4.13 Imagen esquemática de la sonda comercial utilizada para el análisis del gen *CBF- β* mediante hibridación in situ fluorescente (FISH). En rojo, sonda que señala el principio del gen (exones 1-4); en verde, sonda que marca la región terminal del gen (exón 6).

A continuación, en la **figura 4.14** se pueden observar imágenes representativas del conteo de *CBFB- β* en las seis líneas celulares.

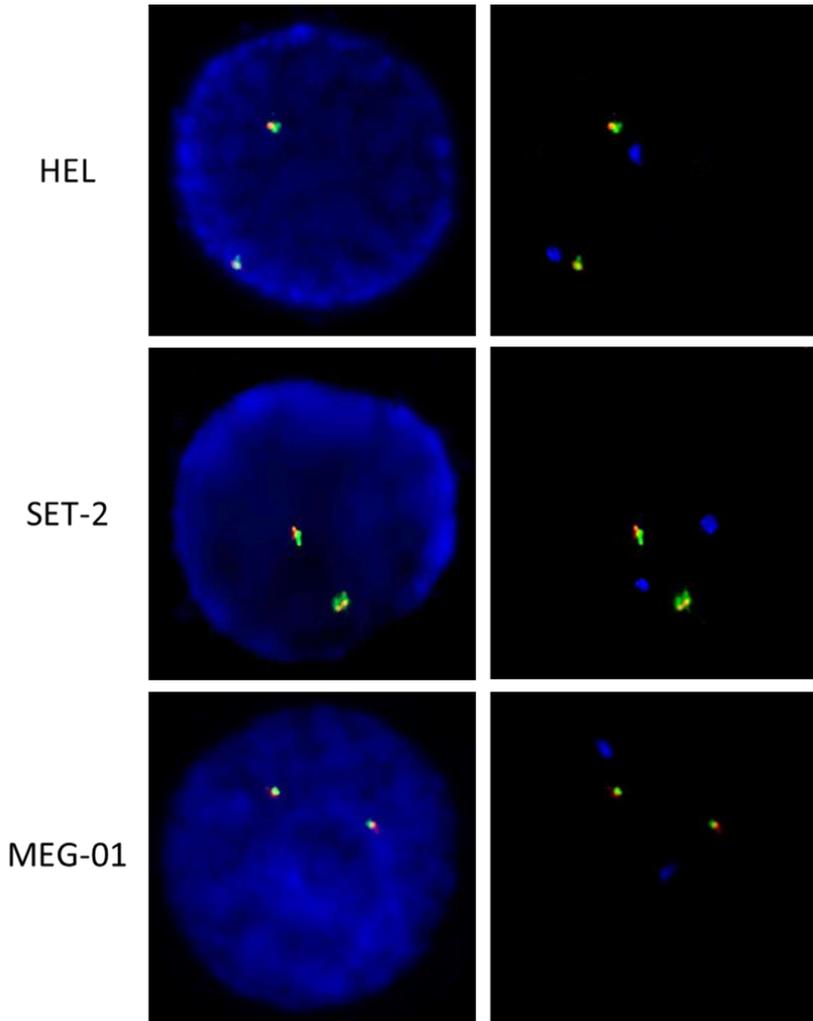
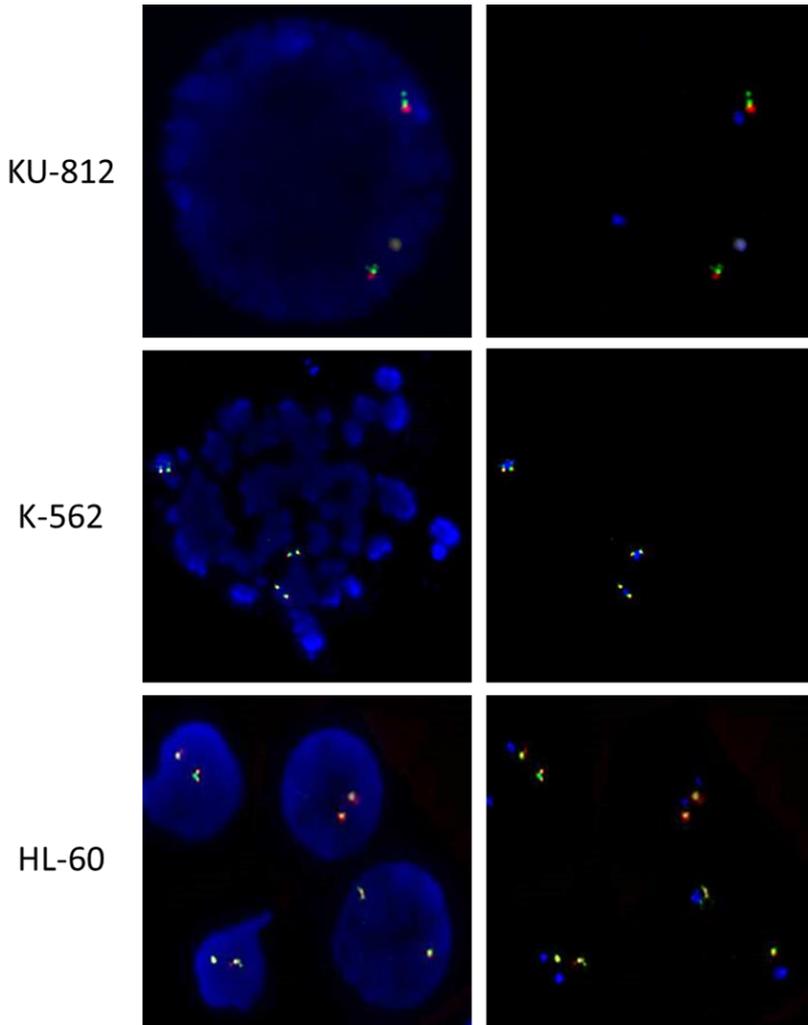


Figura 4.14 Imágenes representativas del estudio del gen *CBF-β* mediante hibridación in situ fluorescente (FISH) en las líneas celulares HEL, SET-2 y MEG-01. Las imágenes de la izquierda muestran las señales roja y verde sobre la señal del DAPI, que muestra la cromatina; las imágenes de la derecha muestran simultáneamente las señales roja, verde y azul. En rojo, *región inicial del gen (exones 1-4)*; en verde, *región terminal (exón 6)*. En azul, sonda centromérica para el cromosoma 16 (CEP16).



Continuación figura 4.14. Imágenes representativas del estudio del gen *CBF- β* mediante hibridación in situ fluorescente (FISH) en las líneas celulares KU-812, K-562 y HL-60. Las imágenes de la izquierda muestran las señales roja y verde sobre la señal del DAPI, que muestra la cromatina; las imágenes de la derecha muestran simultáneamente las señales roja, verde y azul. En rojo, *región inicial del gen (exones 1-4)*; en verde, *región terminal (exón 6)*. En azul, sonda centromérica para el cromosoma 16 (CEP16).

El análisis mediante FISH de *CBFB-β*, mostró que es un gen que no presenta prácticamente ninguna alteración en las líneas celulares estudiadas. Además de mostrar una gran homogeneidad dentro de cada línea celular, también existe homogeneidad entre ellas. Las seis líneas celulares resultaron tener un patrón normal para *CBFB-β*, con frecuencias todas ellas entre el 93 y el 100% de normalidad. Se encontraron sin embargo algunas ganancias o deleciones en las líneas de LMC (**MEG-01**, **KU-812** y **K-562**), tal y como se muestra en la **tabla 4.4**, aunque en frecuencias tan bajas (nunca por encima del 5%), que no puede ser considerado relevante.

Tabla 4.4. Frecuencias de Amplificación, normalidad y deleción observadas mediante FISH, para el gen *CBF-β*

Tipo NMP	Línea celular	% Ganancia	% Normalidad	% Deleción	Otras alteraciones observadas	Frecuencia alt.
NMPs ph+ (CML)	MEG01	1	99	0	Rotura del gen	1%
	KU812	0	96	4	Rotura del gen	2%
	K562	5	93	0	Rotura del gen	1%
NMPs ph-	HEL	0	100	0	-	
	SET2	0	100	0	Rotura del gen	5%
AML	HL60	0	100	0	-	

Por otra parte, tal y como se puede ver en la tabla anterior, se encontraron también casos aislados de rotura del gen en las líneas de LMC y en la línea celular SET-2, aunque de nuevo, las frecuencias de rotura nunca superaron el 5% del total de células observadas. En la **figura 4.15** se muestran dos casos representativos de rotura génica de *CBF-β*. El primer caso corresponde con la línea celular MEG-01. En él se puede apreciar muy bien como se ha producido una rotura en las dos copias del gen, observándose las dos señales rojas en un extremo y las dos verdes, en el otro extremo. Al tratarse de una rotura que afecta a las dos copias del gen, podríamos hablar de una rotura homocigótica para *CBF-β*. En el segundo caso, observamos lo mismo

que en el primero, pero sólo en una de las copias del gen, por lo que se trataría de una rotura heterocigótica.

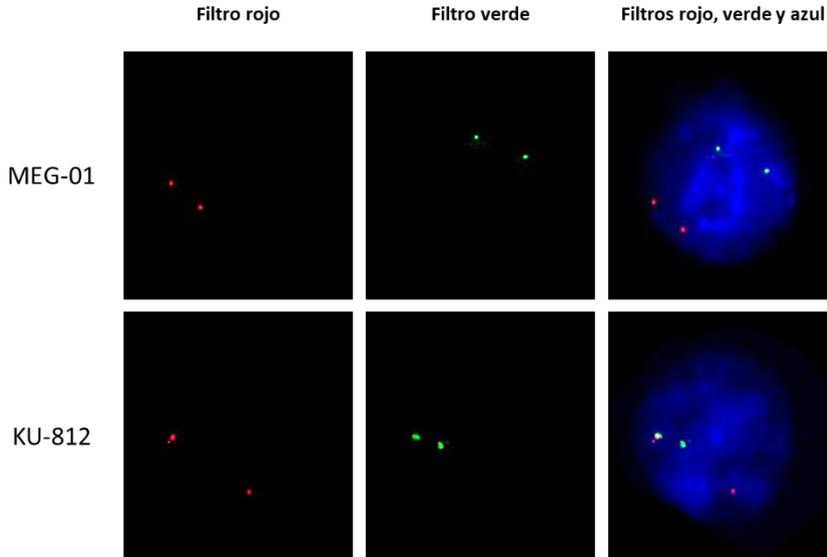


Figura 4.15 Imagen de FISH representativa de dos casos de rotura génica de *CBF- β* utilizando por separado los filtros rojo, verde, y azul + rojo + verde. En rojo, región inicial del gen; en verde, región terminal; en azul, DAPI. En el caso

Aunque se encontraron casos de rotura, no se estudió sin embargo si la rotura era a nivel cromosómico, partiéndose el cromosoma por la mitad a nivel de *CBF- β* , o si, sin embargo, se trataba de una rotura y una posterior translocación, quedándose una de las regiones de *CBF- β* en el cromosoma 16 y translocándose la otra región a otro cromosoma. Esto podría ser considerado para estudiarse en un futuro, realizándose un pintado cromosómico del cromosoma 16, aunque en nuestro caso, debido a la baja frecuencia de rotura génica de *CBF- β* en las líneas celulares estudiadas, no fue considerado relevante.

4.1.2.5. EP300

Para el análisis por FISH del gen *EP300*, se diseñó una sonda en el laboratorio a partir de un BAC comercial, ya que no se encontró ninguna sonda comercial específica para dicho gen. Así pues, mediante la base de datos pública *USCS Genome Browser* se identificó un BAC que cubriera la región ocupada por dicho gen, en el brazo largo del cromosoma 22. El candidato fue el BAC comercial *RP11-1078011* que fue pedido a la casa comercial *Thermo Fischer*, para posteriormente ser extraído y marcado en el laboratorio con fluoróforos rojos.

Por otra parte, puesto que no se disponía de sonda centromérica comercial para el cromosoma 22, se decidió realizar un pintado cromosómico con fluoróforos verdes para marcar dicho cromosoma. De este modo, éste quedaría marcado en su totalidad en color verde, y simultáneamente, podríamos ver la región en la que se encuentra *EP300* marcada en rojo, sobre el fondo verde.

En la **figura 4.16** se muestra un dibujo esquemático del marcaje utilizado para realizar en análisis FISH de *EP300*.

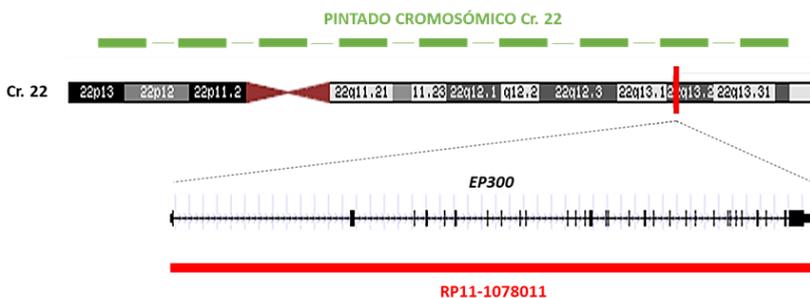


Figura 4.16 Imagen esquemática del marcaje de FISH para el gen *EP300*, ubicado en la región 22q13.2. En rojo, BAC RP11-1078011 que corresponde con la región en la que se encuentra *EP300*; en verde, pintado cromosómico del cromosoma 22.

El análisis por FISH de *EP300* mostró ciertos patrones repetitivos, como veremos a continuación. En primer lugar, se observó normalidad en cuatro de las seis líneas celulares estudiadas, estando las otras dos restantes delecionadas. Además, dichas líneas con *EP300* delecionado son ambas de leucemia mieloide crónica. Por otra parte, se encontró una anomalía que se repite en tres de las seis líneas celulares, dos de LMC y otra de NMP filadelfia negativa: Independientemente del número de copias del cromosoma 22, se vio que uno de ellos (incluyendo la región de *EP300*) estaba fusionado a otro cromosoma más grande no determinado, mientras que el otro cromosoma 22 permanecía normal.

A continuación, en la **figura 4.17**, se puede ver una imagen representativa del FISH de *EP300* en las seis líneas celulares.

Tal y como se puede apreciar en la **primera imagen** de la anterior figura, la línea celular **HEL** muestra normalidad en cuanto al número de copias de *EP300*, encontrándose en el 92,15% de los casos dos copias de dicha región, una dentro de cada cromosoma 22. Sin embargo, tal y como se ha comentado anteriormente, dicha línea fue una de las que presentó una fusión del cromosoma 22 a otro cromosoma más grande. Esto se observó en el 100% de las metafases analizadas, siendo el patrón siempre el mismo, uno de los cromosomas 22 permanecía intacto, mientras que el otro era el que se encontraba fusionado a un segundo cromosoma. Además, un 7,85% de las células estudiadas mostraron una ganancia de al menos una copia extra de *EP300* en otra región diferente del genoma.

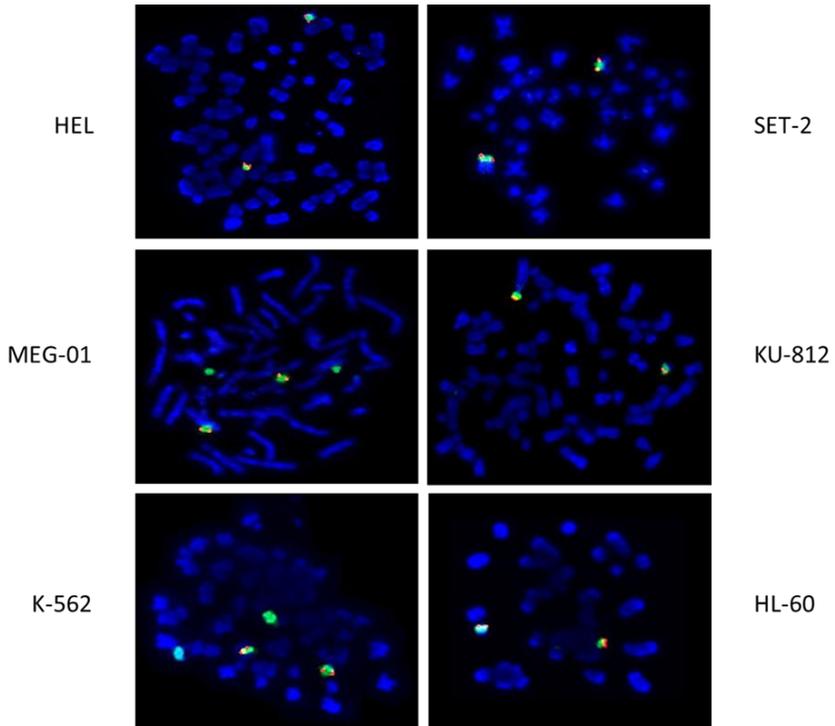


Figura 4.17 Imágenes representativas de hibridación in situ fluorescente (FISH) para el gen *EP300* en las líneas celulares HEL, SET-2, MEG-01, KU-812, K-562 y HL-60. En rojo, *EP300*; en verde, pintado cromosómico del cromosoma 22.

Por otro lado, las líneas celulares **SET-2** y **HL-60** no mostraron ningún tipo de anomalía para *EP300*, ni en cuanto al número de copias ni en cuanto a otro tipo de parámetros como las fusiones o translocaciones. Así pues, ambas líneas mostraron normalidad en el 100% de los casos observados.

En cuanto a las líneas de LMC, se observaron dos anomalías principales, la delección de *EP300* y la fusión del cromosoma 22 a otro cromosoma más grande. De las tres líneas celulares disponibles de LMC, se vio que una de ellas presentaba delección, otra presentaba

fusión, y una tercera presentaba ambas anomalías simultáneamente. Así pues, el FISH de *EP300* en estas líneas dio como resultado que la línea celular **K-562** se encontraba delecionada en el 100% de los casos observados, no observándose ninguna otra anomalía en ella. Por otro lado, la línea celular **KU-812** presentó un patrón de normalidad en el 100% de los casos, sin embargo, uno de los cromosomas 22 se encontraba fusionado a otro cromosoma más grande en todas las metafases observadas, de este modo, el análisis de esta línea es muy similar a lo observado en la línea celular HEL, tal y como ya se comentó anteriormente para el análisis mediante FISH del gen *RUNX1*. En último lugar, tenemos el caso curioso de la línea celular **MEG-01**. Esta línea se mostró delecionada para *EP300* en un 78% de los casos, siendo normal en el 22% restante. Además, se observó que la mitad de los cromosomas 22 estaban fusionados a otro cromosoma más grande en una proporción muy cercana al 100% de los casos. Cabe destacar que al presentar esta línea ambas anomalías, fusión y deleción, se puede dar el caso de que el cromosoma fusionado sea el cromosoma normal, o el cromosoma delecionado para *EP300*. Así pues, es interesante destacar que en aquellas células delecionadas, el 100% de los cromosomas fusionados eran los que presentaban el gen, mientras que los cromosomas no fusionados eran los cromosomas delecionados para *EP300*.

En la siguiente figura (**figura 4.18**) se detalla la fusión del cromosoma 22 en las tres líneas en las que se detectó.

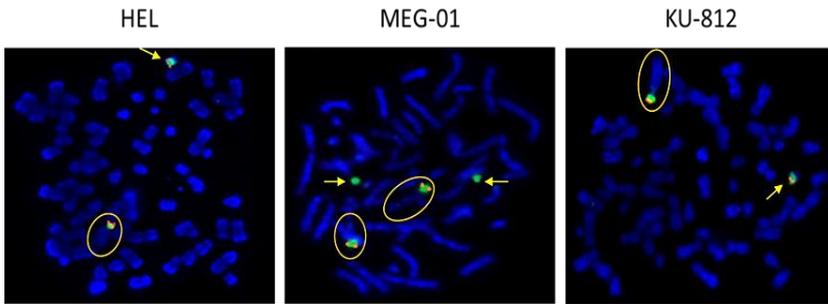


Figura 4.18 Detalle de la fusión cromosómica que afecta a la mitad de los cromosomas 22 en las líneas celulares HEL, MEG-01 y KU-812. Las flechas amarillas indican los cromosomas 22 normales (no fusionados); Los círculos indican la fusión producida entre estos cromosomas y otro cromosoma más grande. En verde, pintado cromosómico del cromosoma 22; en rojo, *EP300*.

En la **tabla 4.5**, se muestran las frecuencias de ganancia, normalidad y deleción y las anomalías detectadas para el gen *EP300*.

Tabla 4.5. Frecuencias de Amplificación, normalidad y deleción observadas mediante FISH, para el gen *EP300*

Tipo NMP	Línea celular	% Ganancia	% Normalidad	% Deleción	Otras alteraciones observadas	Frecuencia alt.
NMPs ph+	MEG01	0	22	78	1 copia crom. 22 fusionado a otro crom.	100%
	KU812	0	100	0	1 copia crom. 22 fusionado a otro crom.	100%
	K562	0	0	100	-	
NMPs ph-	HEL	7,84	92,15	0	1 copia crom. 22 fusionado a otro crom.	100%
	SET2	0	100	0	-	
AML	HL60	0	100	0	-	

Finalmente, como resumen de la caracterización por FISH de los genes del complejo, en la **tabla 4.6** se muestra un resumen de las alteraciones más frecuentes encontradas en las seis líneas celulares estudiadas y para cada uno de los genes analizados (se muestran sólo las alteraciones con frecuencias de aparición mayores al 20%).

Tabla 4.6 Tabla resumen del análisis mediante FISH de los genes HIPK2, RUNX1, TP53, CBF-β y EP300 en las seis líneas celulares

Tipo NMP	Línea celular	Genes				
		HIPK2	RUNX1	TP53	CBF-β	EP300
NMPs pht+ (CML)	MEG01	77,77% N 20,98% G 28,4% céls >2 copias HIPK2	96,68% N 80,1% céls >2 copias RUNX1	100% N	99% N	78% D 22% N 1 copia cr.22 fusionado
	KU812	85,7% N	93,22% G	93% N	96% N	100% N 1 copia cr.22 fusionado
NMPs pht-	K562	75% D 25% N 91% céls >2 copias HIPK2	95,12% N	98% D	93% N	100% D
	HEL	94,24% N 36,36% Tr	92% G	70% D 30% N	100% N	92,15% N 1 copia cr.22 fusionado
AML	SET2	92% D 25% N	75% D 25% N 98% céls >2 copias RUNX1	100% N	100% N	100% N
	HL60	90,8% N 89,47% Tr	100% N	71% D 29% N	100% N	100% N

N: normalidad; G: ganancia; D: delección
En azul, otras anomalías cromosómicas

4.1.3. Caracterización mediante hibridación in situ fluorescente (FISH) de la translocación BCR-ABL en las líneas celulares de leucemia mieloide crónica

Debido a que en el siguiente apartado de este trabajo se realizaron diferentes ensayos moleculares con fármacos concretos para las diferentes alteraciones específicas que presentaban las líneas celulares, y debido a uno de los fármacos utilizados fue el ampliamente utilizado Imatinib, que afecta a la proteína de fusión resultante de la translocación BCR-ABL, se quiso comprobar específicamente si nuestras líneas celulares contenían de hecho dicha fusión, responsable de la aparición del cromosoma filadelfia. De este modo se evitaría el riesgo de estar utilizando células que hubieran perdido la translocación debido a las mutaciones espontáneas que surgen por la rápida división y expansión de estas líneas celulares leucémicas en cultivo.

Con este propósito, se utilizó la sonda *Vysis LSI BCR, ABL Dual Color, Single Fusion Translocation Probe Kit* de la casa comercial *Abott Molecular* para poder detectar la translocación BCR-ABL mediante FISH en nuestras líneas celulares.

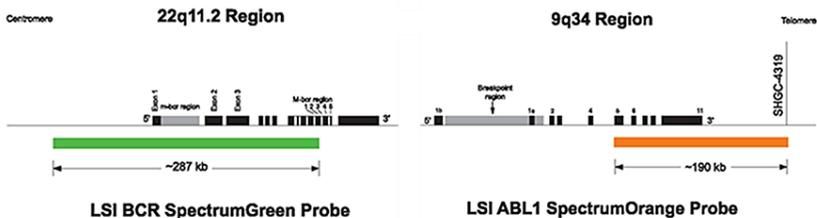


Figura 4.19 Esquema de las sondas utilizadas para el marcaje de la translocación BCR-ABL. En verde, sonda *Vysis LSI BCR SpectrumGreen Probe*, para el gen BCR; en naranja (rojo), sonda *Vysis LSI ABL1 SpectrumOrange Probe*, para el gen ABL.

Tal y como se muestra en la **figura 4.19**, la sonda se compone a su vez de dos sondas, la sonda *Vysis LSI ABL1 SpectrumOrange Probe*, que señala el gen ABL en color naranja (rojo), y la sonda *Vysis LSI BCR SpectrumGreen Probe*, que marca el gen BCR en color verde. De este modo, si ambos genes se encuentran separados (no fusionados), se observarán dos señales roja y verde distintas y separadas, mientras que si la translocación BCR-ABL se ha producido, las señales estarán superpuestas, observándose una sola señal de color amarillo.

Mediante este método se realizó la técnica FISH en las tres líneas celulares de LMC, MEG-01, KU-812 y K-562, para evaluar en ellas la presencia o ausencia del cromosoma filadelfia. Los resultados obtenidos demostraron que las tres líneas celulares presentan al menos un cromosoma filadelfia en sus células, tal y como se presupone para estas líneas leucémicas. En la **figura 4.20** se puede ver un ejemplo de la translocación BCR-ABL en la línea MEG-01, utilizando filtros diferentes.

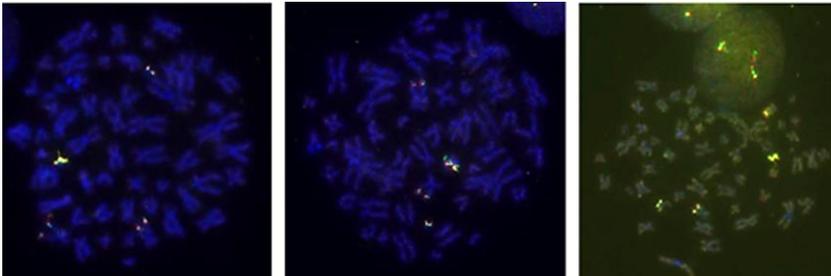


Figura 4.20 Imágenes de FISH representativas de la translocación BCR-ABL en la línea celular MEG-01. En rojo, sonda para BCR; en verde, ABL; en amarillo, fusión BCR-ABL.

4.2. ESTUDIOS FUNCIONALES EN LÍNEAS CELULARES DE NMPS EN FUNCIÓN DEL ESTADO DEL COMPLEJO *HIPK2/EP300/RUNX1/CBF-B/TP53*

4.2.1. Introducción

Tras realizar la caracterización molecular de los componentes génicos del complejo estudiado y sabiendo su nivel de actividad basal en las seis líneas celulares descritas, el siguiente paso para comprender cómo funciona este complejo en los síndromes mieloproliferativos crónicos era la manipulación biológica o química de la actividad de dichos genes, y la posterior realización de ensayos funcionales en dicho contexto.

Debido al papel central de *HIPK2* y de *EP300* como reguladores de la actividad del complejo, éstos fueron los genes candidatos para la manipulación biológica o química de su actividad.

En un primer momento se decidió comenzar con *HIPK2*, ya que es posiblemente el gen que actúa al nivel más alto de regulación debido a su actividad quinasa, fosforilando a las proteínas Runx1, p53 y p300, fosforilación que es necesaria para su correcta actividad. Sin embargo, 3 de las 6 líneas celulares tienen una expresión baja o muy baja de *HIPK2*. Dada la ausencia de inhibidores químicos comerciales para este gen, se optó por la inhibición de *HIPK2* mediante un knock-down biológico en las tres líneas celulares (HEL, MEG-01 y K-562) que presentaban una alta actividad de *HIPK2*.

Debido a la gran dificultad de transfectar que presentan este tipo de líneas celulares leucémicas en suspensión, se realizó el knock-down mediante la utilización de retrovirus que incorporan la secuencia de cADN codificante para el ARN de interferencia anti-*HIPK2*, logrando

así la inhibición del gen en las líneas celulares infectadas y posteriormente seleccionadas.

Por otro lado, se empleó la molécula C646 para la inhibición química de la proteína p300. Al ser un inhibidor químico, y debido a que todas las líneas celulares utilizadas expresaban p300, se decidió probar el tratamiento con C646 en todas ellas, e incluso cabía la posibilidad de combinar la inhibición química de p300 con la inhibición biológica de *HIPK2*.

Una vez realizada la manipulación de la actividad de *HIPK2* o de p300, se realizaron una serie de ensayos funcionales en las líneas celulares manipuladas, con el fin de observar si la manipulación de la actividad del complejo tenía algún efecto en la proliferación, viabilidad o apoptosis de dichas líneas y, por tanto, elucidar si la función del complejo es importante en la biología celular de las neoplasias mieloproliferativas crónicas agudizadas.

4.2.2. Inhibición biológica de *HIPK2* en líneas celulares de NMPs

Se procedió a la realización de un knock-down estable en las líneas celulares HEL, MEG-01 y K-562. El procedimiento se describirá muy brevemente ya que está explicado en detalle en el apartado *MATERIAL Y MÉTODOS*.

Dichos experimentos se realizaron mediante la obtención de plásmidos que contenían la secuencia de cADN codificante para ARN de interferencia anti-*HIPK2*. Los plásmidos fueron transfectados en la línea celular Phoenix, la cual es capaz de incorporar y encapsular dichos plásmidos en retrovirus. A partir de aquí, se utilizaron los

retrovirus para infectar las líneas celulares propuestas en este estudio. Los virus utilizados contenían un gen de resistencia a la puromicina, por lo que las poblaciones celulares infectadas que habían incorporado la secuencia viral serían seleccionadas mediante posteriores cultivos en presencia de puromicina.

Además, los plásmidos que se usaron para transfectar las células Phoenix contenían las secuencias de expresión de RFP o GFP (según los casos). En el caso de GFP, dicha secuencia era mantenida también cuando se formaban los retrovirus. De este modo, se pudo monitorizar todo el proceso de transfección e infección mediante microscopía de fluorescencia y citometría de flujo.

4.2.2.1. Análisis del knock-down de HIPK2 mediante western blot

Tras la selección de las células infectadas, se obtuvieron extractos proteicos para evaluar si se había producido inhibición de *HIPK2*. Esto se realizó en primer lugar con la línea celular HEL, la cual presentaba la mayor expresión de *HIPK2* de todas las líneas, por lo que era la mejor candidata para probar el efecto de los shRNA.

Para validar el efecto del knockdown se comprobó la expresión de la proteína *HIPK2* y de la proteína control *GAPDH* en las muestras infectadas con los cuatro shRNAs, la muestra infectada con el scramble y en la línea celular HEL wild-type. En la **figura 4.21** se observa la expresión de *HIPK2* en estas seis muestras. Tal y como se esperaba, no existen apenas diferencias en el nivel de expresión de la proteína *HIPK2* entre el control wild-type y el scramble, por lo que a partir de este momento se decidió usar el scramble como control de este bloque de experimentos. En cuanto a los cuatro shRNAs probados, se

vio que los shRNA 18 y 20 no producían ningún descenso en la expresión de *hipk2* y que el shRNA 17 producía un 14% de inhibición, siendo el shRNA 19, el que produjo un nivel de knock-down aceptable (51%) de la proteína, por lo que fue el elegido para realizar los experimentos de inhibición de *HIPK2*.

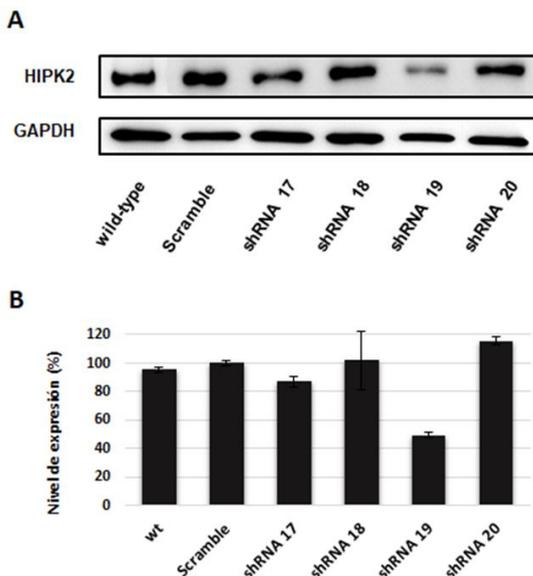


Figura 4.21 A) Resultados de western blot mostrando el efecto de la infección con los shRNAs 17, 18, 19 y 20 y el scramble sobre el nivel de expresión de la proteína *hipk2* en comparación a la expresión wild-type en la línea celular HEL. B) Cuantificación del nivel de expresión proteica (%) de *hipk2* para las seis muestras anteriores.

No obstante, se realizaron diferentes cambios para mejorar la eficiencia del proceso, incrementar el nivel de knock-down obtenido, y conseguir una población estable en la que *HIPK2* estuviera inhibido permanentemente, de modo que se pudieran realizar todos los ensayos funcionales sin que su actividad se restaurara por las mutaciones ocurridas durante las divisiones celulares. Además, se realizaría el knock-down en dos líneas celulares más, MEG-01 y K-562.

Tras estos cambios se consiguió finalmente un nivel de inhibición del gen del 95% en la línea celular HEL (**figura 4.22**); en la línea celular MEG-01, este fue de un 50%; por último, en la línea celular K-562, no se logró realizar la inhibición de *HIPK2*. En esta última línea se probaron las mismas condiciones que con las líneas celulares anteriores, y en ninguno de los casos se obtuvo un nivel de expresión de la proteína menor al 90%, por lo que finalmente, la línea celular K-562 fue descartada de los ensayos funcionales en el contexto de la inhibición de *HIPK2*.

Tras establecer sendas líneas celulares estables, se realizó el análisis mediante western blot del resto de genes del complejo, así como de las formas fosforiladas de p53 y de AML1, en ambas líneas celulares en el contexto de la inhibición de *HIPK2*.

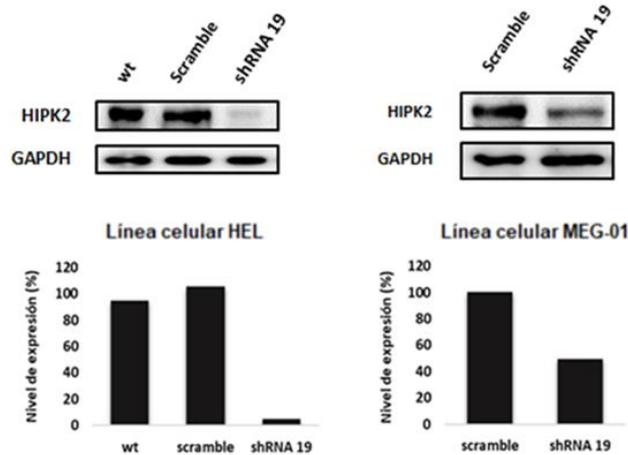


Figura 4.22 Resultados de western blot mostrando el efecto de la infección con el shRNA-anti-*HIPK2* 19 y el scramble sobre el nivel de expresión de la proteína *hipk2* en las líneas celulares HEL y MEG-01.

Tal y como se aprecia en la **figura 4.23**, en la línea celular HEL no se vio diferencia alguna en la expresión de ninguna de las proteínas del complejo entre la muestra wild-type y la muestra scramble. Sin embargo, sí que existen diferencias al comparar con la muestra infectada con el shRNA 19: En primer lugar, vemos un aumento considerable de la proteína p300 en comparación con las muestras wt y scramble. Por otra parte, como era de esperar, p53 y AML1 no disminuyen. Sin embargo, sus formas fosforiladas sí lo hacen, sobre todo p-AML1 que desaparece en casi su totalidad. En último lugar está el caso de la proteína CBF- β , la cual no parece verse afectada tras la inhibición de *HIPK2*.

Los resultados con la línea celular MEG-01 fueron similares, pero con alguna diferencia significativa. En primer lugar, la proteína p300 disminuye en la muestra infectada con el shRNA 19 respecto al control, contrariamente a lo que se veía en el caso anterior donde la expresión de dicha proteína aumentaba en vez de disminuir. Sin embargo, en este caso, el knock-down de *HIPK2* es del 50% (frente al 95% del caso anterior), por lo que tal vez no sería suficiente como para producir el efecto que se observaba anteriormente. Además de esto, se ve que la forma fosforilada de p53, p-p53, disminuye casi totalmente, lo que indicaría que la expresión en esta línea de la forma fosforilada de p53 es quizás más sensible a la regulación por *HIPK2* que en la línea celular HEL. En segundo lugar, no disminuye nada la expresión de p-AML1, por lo que un 50% de inhibición de la proteína *HIPK2* no sería en este caso suficiente como para producir una reducción de la forma fosforilada de AML1, y el 50% restante de *HIPK2* sería suficiente para mantener activa dicha proteína.

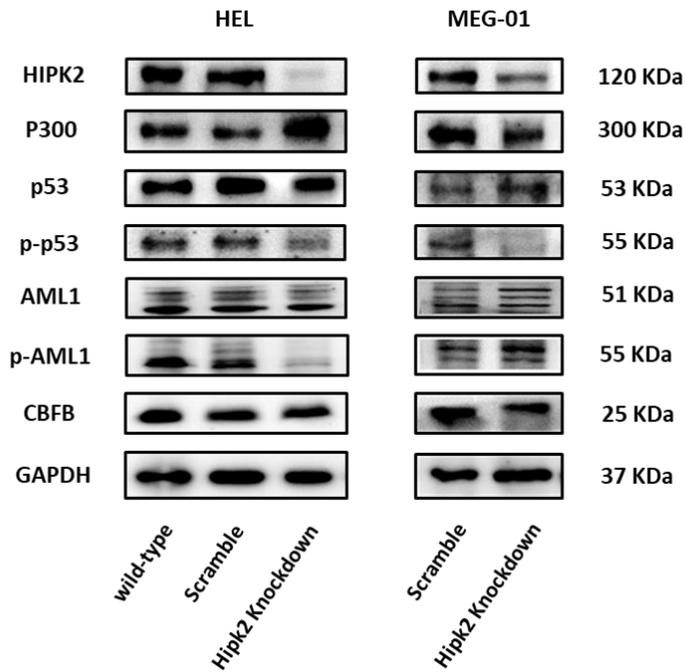


Figura 4.23 Resultados de western blot mostrando el efecto de la inhibición de *HIPK2* en las líneas celulares HEL (95% de knock-down) y MEG-01 (50%) sobre el resto de genes del complejo *HIPK2/EP300/P53/AML1/CBF- β* , así como sobre las formas fosforiladas p-p53 y p-aml1.

4.2.2.2. Estudios de proliferación en las líneas celulares con inhibición biológica de *HIPK2*

Tras comprobar la disminución del nivel de proteína y el efecto en el resto de componentes del complejo, se realizaron una serie de ensayos para comprobar si el estado del complejo era importante a nivel funcional.

Se realizó el análisis de la proliferación celular en las líneas HEL y MEG-01 con knock-down de *HIPK2* (HEL-shRNA *HIPK2* y MEG-01-shRNA *HIPK2* respectivamente a partir de ahora).

Para ello, se pusieron en cultivo 50.000 células de ambas líneas celulares y se mantuvieron en cultivo durante 6 días, en presencia de puromicina, realizándose contajes del número de células totales cada dos días. Para ambas líneas se realizó el experimento en triplicados, de manera que los resultados mostrados son la media aritmética del número de células observado en cada una de las tres muestras independientes.

Se explicará primero el resultado obtenido con la línea celular MEG-01-h2-KD, ya que fue el que se obtuvo en primer lugar y el que tiene una más fácil interpretación.

Tal y como se observa en la **figura 4.24**, MEG-01-shRNA HIPK2, mostró un crecimiento más lento que la línea celular MEG-01-h2-scramble (MEG-01-scramble a partir de ahora). Al realizar la cuantificación del número de células tras los seis días de cultivo, se observó que en los pocillos donde se encontraba la línea infectada con el scramble, el promedio del número de células era aproximadamente de un millón más que en el caso de los pocillos de MEG-01-shRNA HIPK2. Concretamente 2.410.000 células frente a 1.475.000, es decir, la línea con inhibición de *HIPK2* creció un 61,2% respecto al control (scramble). Esto demuestra que la inhibición de un 50% de la expresión de la proteína *HIPK2* es suficiente para producir un efecto anti-proliferativo en esta línea celular.

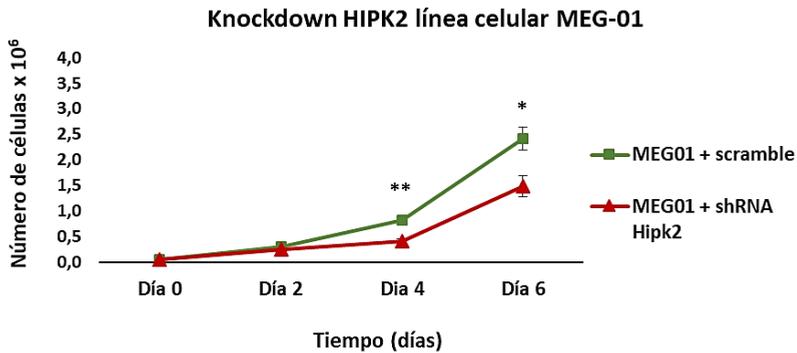


Figura 4.24 Resultados de proliferación de las líneas celulares MEG-01-scramble y MEG-01-shRNA *HIPK2* tras el conteo celular durante seis días en cultivo.

En el caso de la línea celular HEL, aparecieron ciertas dificultades: En un primer lugar, el experimento se realizó en paralelo junto con el de la línea celular MEG-01. Sin embargo, lo que se observó es que HEL-shRNA *HIPK2* no crecía prácticamente nada en relación a HEL-scramble, es más, su población parecía incluso disminuir, de modo que al final el número de células era tan bajo que la población finalmente moría. Debido a esto, se repitió el experimento cambiando el número de células inicial, los tiempos de conteo, o añadiendo más muestras. Se optó también por realizar el ensayo en placas con pocillos más pequeños de modo que las pocas células existentes estuvieran más juntas entre sí, facilitando el crecimiento. Se incorporó también el control wild-type de la línea, y se decidió contar el número celular durante más días.

Tal y como se muestra en la **figura 4.25**, HEL-wt y HEL-scramble crecían del mismo modo, siendo su población aproximadamente de 1.700.000 células a los 6 días de cultivo, frente a las apenas 200.000 células presentes en los pocillos de HEL-shRNA *HIPK2*, lo que supone un 11,7% de crecimiento respecto a los dos controles utilizados. Sin

embargo, al mantener las células en cultivo durante dos días más, se observó algo llamativo, y es que la población de HEL-shRNA HIPK2 comenzaba entonces a crecer, pasando a una población de 705.000 células en sólo dos días y, por tanto, triplicando su población. Así pues, se observó que a partir de una semana aproximadamente, HEL-shRNA HIPK2 comenzaba a crecer de manera exponencial. Experimentos posteriores demostraron, además, que a partir de los 10-14 días aproximadamente, ambas líneas mostraban unas tasas de proliferación muy similares independientemente de si se trataba de la línea con inhibición de *HIPK2* o la línea scramble.

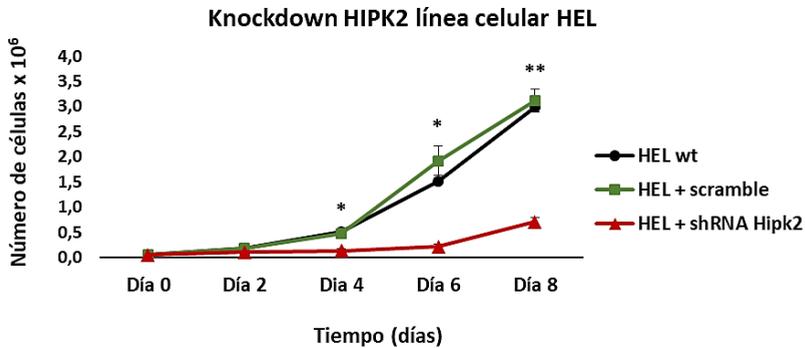


Figura 4.25 Resultados de proliferación de las líneas celulares HEL-wild-type, HEL-scramble y HEL-shRNA *HIPK2* tras el conteo celular durante ocho días en cultivo.

En resumen, lo que se observaba es que HEL-shRNA HIPK2 pasaba de no crecer prácticamente nada, a comenzar a proliferar de manera exponencial a partir de cierto tiempo. Esta observación nos hizo pensar que la línea celular perdía de algún modo la inhibición de *HIPK2* y la actividad del gen era restaurada. Con el fin de validar la hipótesis previa, analizamos mediante western blot el nivel de proteína *hipk2* en la línea celular HEL-shRNA HIPK2 en cultivo el día uno tras la selección, una semana después de esta, y, por último, dos semanas después (**figura 4.26**).

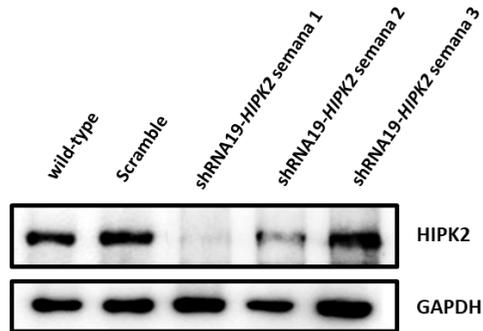


Figura 4.26 Expresión mediante western-blot de los niveles de proteína *hipk2* y *gapdh* en la línea celular HEL-wild-type y las líneas celulares HEL-scramble y HEL-shRNA19-*HIPK2*. Se muestra el nivel de proteína en esta última línea después de una, dos y tres semanas tras la selección con puromicina.

Se observó efectivamente que, tras una semana en cultivo, las células comenzaban a expresar de nuevo *hipk2*, y que dos semanas después, dicha expresión era idéntica a la observada para los controles wild-type y scramble. Estos resultados explicarían que la línea celular HEL-shRNA *HIPK2* (con un 95% de inhibición de *HIPK2*) fuera incapaz de crecer mientras *HIPK2* se encuentra inhibido, y solamente cuando dicha inhibición desaparece, las células comienzan de nuevo a proliferar, lo que demuestra que la inhibición casi total del gen, anula totalmente la capacidad proliferativa de dichas células.

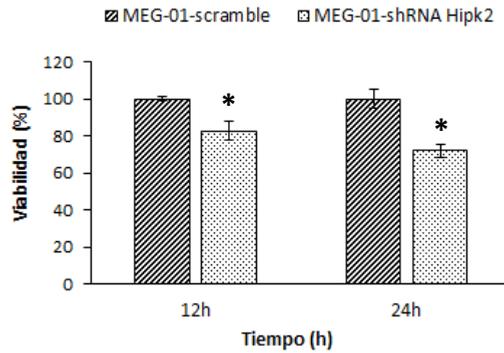
Como resumen de este apartado, se vio que una inhibición prácticamente total de *HIPK2*, al menos en la línea celular HEL-shRNA *HIPK2*, fue determinante, haciendo que las células no proliferaran durante el tiempo que duró la inhibición. Esto imposibilitó el hecho de obtener una población celular lo suficientemente grande como para poder realizar más ensayos funcionales. Sin embargo, en el caso de MEG-01-shRNA *HIPK2*, con un 50% de inhibición del gen, se pudieron observar bien los efectos de dicha inhibición, y se pudo obtener una

población celular grande que permitiera la realización del resto de experimentos funcionales, como se describirá a continuación.

4.2.2.3. Estudios de viabilidad en líneas celulares con inhibición biológica de HIPK2

Los estudios de viabilidad en la línea celular MEG-01 scramble y shRNA hipk2 se realizaron mediante el uso de un kit MTS de proliferación/viabilidad, tal y como se describe en el apartado *MATERIALES Y MÉTODOS*. Estos ensayos pueden usarse para determinar la viabilidad/proliferación de una muestra respecto a otra. Dichas diferencias observadas en la viabilidad pueden deberse a dos motivos: Un aumento de la muerte celular en una de las muestras, o un descenso en la proliferación (sin que esto implique muerte celular).

Se comprobó la viabilidad de la línea celular MEG-01-scramble respecto a MEG-01-shRNA-HIPK2 tras 12h y 24h de cultivo (**figura 4.27**) Los resultados obtenidos seguían el patrón observado anteriormente en la proliferación, mostrando un 18% menos de viabilidad en la línea celular con inhibición de *HIPK2* respecto a la línea celular infectada con el scramble tras 12h de cultivo. A las 24h, la viabilidad celular había disminuido en un 29%.



Test-T (12h)	SD 1	SD 2	pvalor
MEG-01-scramble	100 ± 1,38	-	-
MEG-01-shRNA HIPK2	100 ± 1,38	82,66 ± 5,00	0,004

Test-T (24h)	SD 1	SD 2	pvalor
MEG-01-scramble	100 ± 5,01	-	-
MEG-01-shRNA HIPK2	100 ± 5,01	71,97 ± 3,25	0,001

Figura 4.27 Ensayo de viabilidad tras 12 y 24h de cultivo con las líneas celulares MEG-01-scramble y MEG-01-shRNA-HIPK2.

4.2.2.4. Estudios de apoptosis mediante citometría de flujo en líneas celulares con inhibición biológica de HIPK2

Siguiendo el modelo anterior, se realizaron también experimentos de apoptosis celular mediante citometría de flujo con Anexina V/Yoduro de propidio.

Se observó que MEG-01-scramble presentaba un 15% más de apoptosis que MEG-01-shRNA-HIPK2 tras 24h en cultivo (**figura 4.28**), por lo que las diferencias observadas en viabilidad no se debían a un aumento de la apoptosis. Estas diferencias podrían explicarse porque

el ratio de proliferación es muy superior al de apoptosis, produciéndose un aumento del número total de células viables.

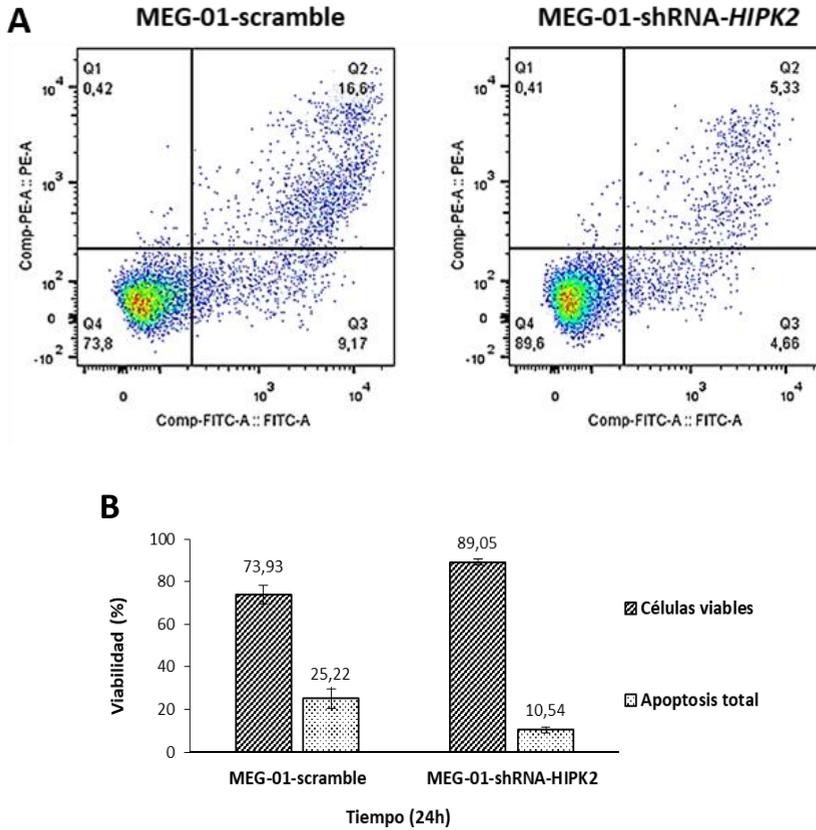


Figura 4.28 A) Análisis de la apoptosis medida por citometría de flujo mediante la expresión de Anexina V/Ioduro de propidio en las líneas celulares MEG-01-scramble y MEG-01-shRNA-HIPK2 tras 24h de cultivo.

B) Cuantificación de los resultados.

4.2.2.5. Estudios de ciclo celular mediante citometría de flujo en líneas celulares con inhibición biológica de HIPK2

Por último, se realizó un último ensayo funcional con las dos líneas MEG-01 modificadas, el cual consistió en observar los cambios en los patrones del ciclo celular en ambas líneas. Las diferencias observadas fueron muy acusadas: Mientras que en MEG-01-scramble se observó una gran proporción de células en fase de síntesis (fase S), en MEG-01-shRNA-HIPK2 dicha población celular disminuyó casi hasta la mitad, pasando de un 69,16% a un 38,13% respectivamente. Además, se observó también un aumento de un 20% en el porcentaje de células en fase G0/G1 y un aumento de un 11,5% en la frecuencia de células en fase G2/M en la línea celular con inhibición de HIPK2 frente a la línea celular scramble. Estos resultados se observan a continuación, en la **figura 4.29**.

Estos resultados indicarían la menor proliferación de la línea shRNA frente a scramble, ya que se produce la parada del ciclo celular en G0/G1, en contraposición a la línea scramble en la que existe una proporción muy elevada de células en división (fase S).

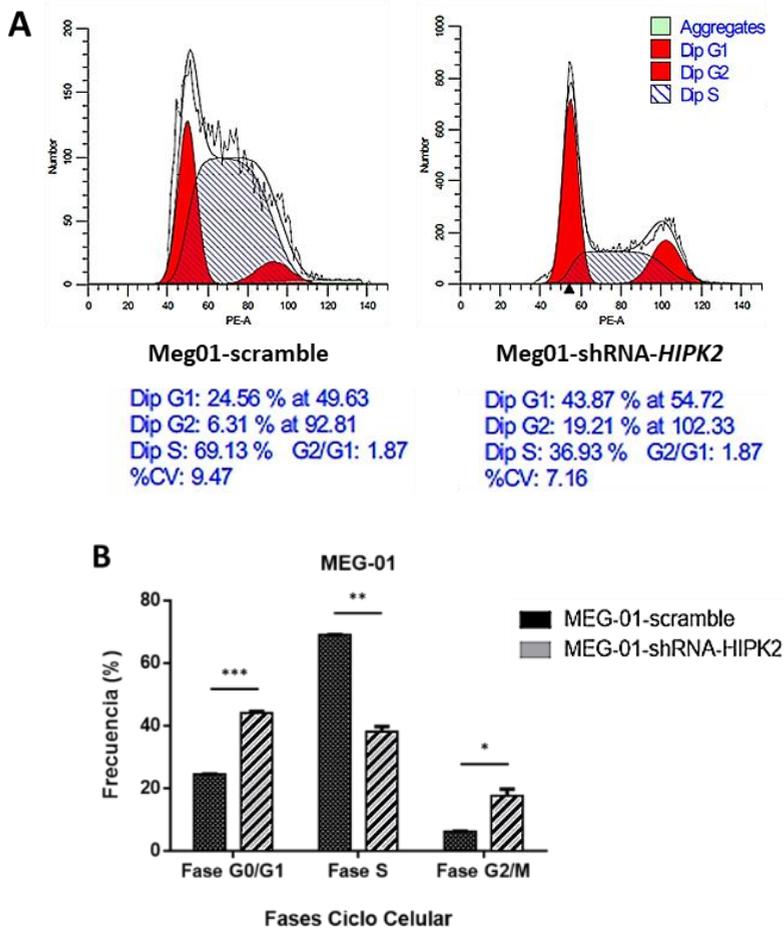


Figura 4.29 A) Resultados de ciclo celular en las líneas celulares MEG-01-scramble y MEG-01-shRNA-HIPK2.

B) Cuantificación de los porcentajes obtenidos.

4.2.2.6. Resumen de los ensayos de inhibición biológica de HIPK2

La inhibición de HIPK2 conlleva una disminución en la proliferación de las líneas celulares HEL y MEG-01. A mayor inhibición menor tasa de proliferación celular. Estos resultados se confirman

analizando la viabilidad celular, viéndose un menor porcentaje de viabilidad cuando mayor es la inhibición del gen. Además, se observó también una menor apoptosis en el contexto de la inhibición de *HIPK2*, viéndose además efectos llamativos en el patrón de ciclo celular entre ambas líneas modificadas, que se basaban en una mayor proporción de células en fase S y menor en las fases G0/G1 y G2/M en la línea celular scramble respecto a MEG-01-shRNA *HIPK2*.

4.2.3. Inhibición química de p300 en líneas celulares de NMPs. Estudios funcionales con C646.

4.2.3.1. Análisis de la inhibición de p300 mediante western blot

Las seis líneas celulares usadas en este trabajo fueron cultivadas durante 24h en presencia de una concentración 25µM de C646. Tras ser tratadas, se obtuvieron extractos proteicos de todas ellas y se analizaron los niveles de proteína de *EP300* y el efecto de la inhibición de éste en el resto de componentes del complejo, en relación a los genes control *GAPDH* y β -*ACTINA*.

Tal y como se aprecia en la **figura 4.30**, la aplicación de C646 tuvo un efecto de disminución drástico en los niveles de la proteína p300 en todas las líneas celulares tratadas. Se muestra también el efecto de la aplicación de C646 en los niveles proteicos de todos los genes del complejo. Tal y como se puede observar, la inhibición de p300, causó una disminución de los niveles de proteína de *HIPK2*, aunque dicha disminución no fue total. No se observó apenas efecto en los niveles de p53 y *AML1*, aunque sí que se observó un efecto casi total de reducción de las formas fosforiladas de los genes *TP53* y *AML1* del mismo modo que se observaba cuando se realizó la inhibición

biológica de *HIPK2*. Por último, se observó una disminución en los niveles proteicos de *CBFB-β* tan sólo en las líneas celulares HEL, MEG-01 y HL-60.

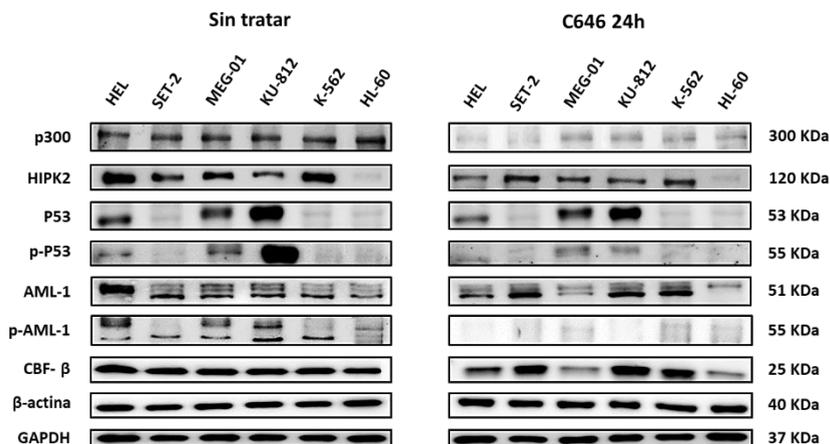


Figura 4.30 Expresión mediante western blot de los niveles de proteína de los genes del complejo, así como de las formas fosforiladas de p53 y AML1, en las seis líneas celulares descritas, antes y después del tratamiento durante 24h con 25μM de C646.

4.2.3.2. Estudios de proliferación/viabilidad en las líneas celulares con inhibición química de p300

Tras la inhibición química de p300, se realizaron los estudios funcionales en las seis líneas celulares, comenzando con los ensayos de proliferación/viabilidad (MTS).

Dichos ensayos se realizaron con tres concentraciones del inhibidor (12,5, 25 y 50μM) y tras los tiempos de cultivo de 12, 24 y 48h. No obstante, se muestran sólo los resultados obtenidos tras utilizar las dos primeras concentraciones, debido al excesivo efecto causado por la concentración más alta de C646. Los experimentos se

realizaron siempre en triplicados y partiendo de 10.000 células iniciales por pocillo.

En la figura **4.31**, se muestran los resultados de proliferación en las seis líneas celulares tras el tratamiento con C646. La aplicación del inhibidor tuvo un claro efecto antiproliferativo en todas las líneas. Este efecto era ya acusado cuando se usaba la concentración más baja de las tres, produciendo reducciones en la proliferación considerables en todas ellas, e incluso de más del 50% en algunas líneas como MEG-01 y HL-60. Además, en la línea celular HEL dicha inhibición fue suficiente para causar en el tiempo una parada total de la proliferación, de modo que la tasa de mortalidad era mayor que ésta y las células morían a un ritmo mayor que proliferaban. Se vio también que las líneas de LMC K-562 y KU-812 eran más resistentes a la inhibición de p300, especialmente KU-812.

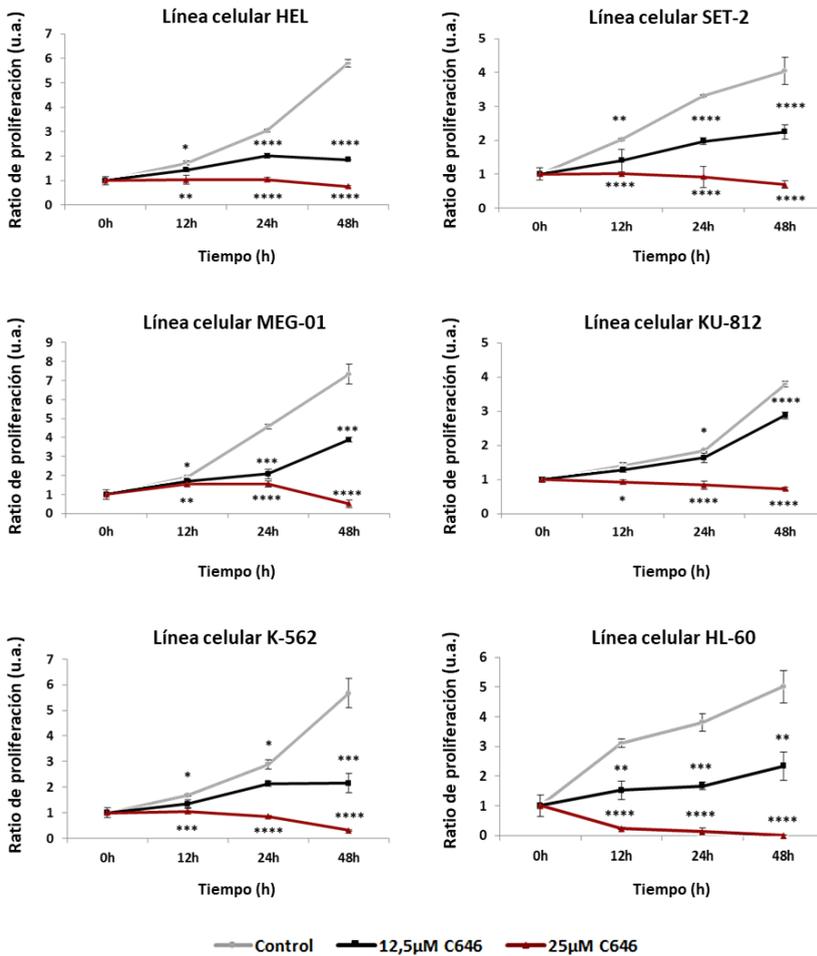


Figura 4.31 Ensayos de proliferación (MTS) durante 48h en las seis líneas celulares. Se muestran tres condiciones en cada línea: control (sin tratar), tratamiento con 12,5µM de C646 y tratamiento con 25µM de C646.

Por otra parte, la aplicación de la concentración intermedia de C646 (25µM) tuvo un efecto letal en el tiempo en todas las líneas celulares, inhibiendo totalmente la proliferación en todas ellas.

Estos resultados pueden observarse también en forma de viabilidad total (% de células vivas) de la muestra tratada respecto a la viabilidad de dicha muestra sin tratar. Así, en la **figura 4.32** se

muestran dichos resultados para las seis líneas celulares, tras 24h de tratamiento con C646.

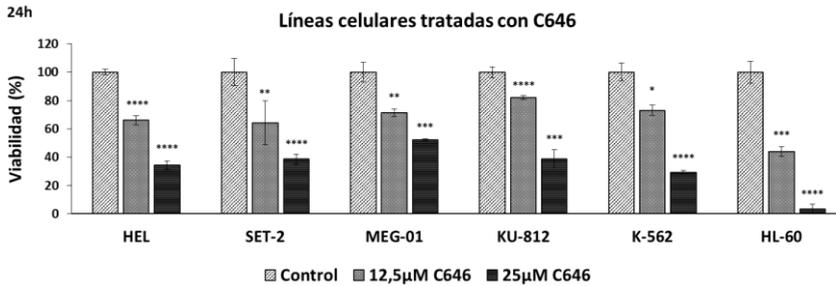


Figura 4.32 Resultados de viabilidad (MTS) tras 24h de tratamiento con las concentraciones de 12,5 y 25μM de C646 en las seis líneas celulares de NMPs.

Asimismo, se comprobó si la inhibición del complejo influía en el efecto de la terapia convencional utilizada para el tratamiento de estas NMPs. Por ello, las líneas celulares de LMC (MEG-01, K-562 y KU-812) se trataron de modo independiente con Imatinib (un inhibidor de BCR-ABL empleado en práctica clínica asistencial en esta enfermedad), para, posteriormente, ser tratadas de manera simultánea con C646 e Imatinib. Las concentraciones de Imatinib utilizadas fueron 250, 500 y 1000nM. Para el tratamiento combinado se utilizaron siempre las concentraciones más bajas de cada fármaco (250nM de Imatinib y 12,5μM de C646) para evitar una excesiva muerte celular y poder cuantificar mejor los resultados.

En las líneas celulares de NMPs cromosoma Filadelfia negativas, se procedió de forma similar, empleando en este caso Hidroxiurea y Ruxolitinib, para su posterior tratamiento combinado con C646.

En las líneas celulares de LMC se observó que el Imatinib ejercía el efecto esperado de inhibición de la proliferación/viabilidad de las células, excepto en la línea celular MEG-01 (**figura 4.33 A**),

resistente al tratamiento con Imatinib pese a poseer el cromosoma filadelfia. En el caso de las líneas celulares K-562 y KU-812, la aplicación simultánea de C646 e Imatinib producía un efecto mayor que la combinación de ambos inhibidores de manera individual (**figura 4.33 B**), confirmándose el hecho de que la terapia convencional tiene un mayor efecto en dichas células cuando el complejo se encuentra inhibido, y obteniéndose valores de significancia estadística en ambos casos.

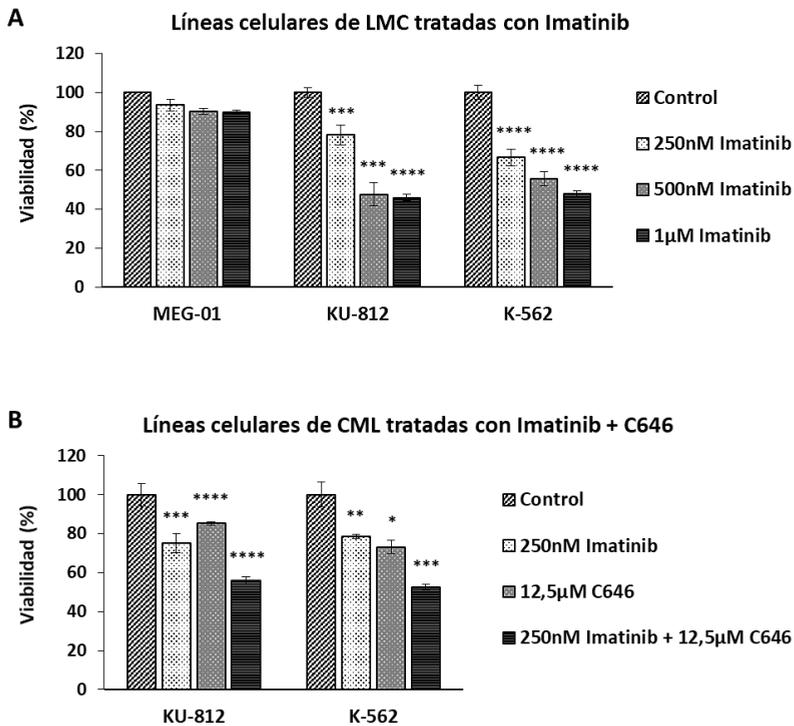


Figura 4.33 A) Resultados de viabilidad (MTS) tras 24h de tratamiento con las concentraciones de 250, 500 y 1000nM de Imatinib en las líneas celulares de LMC MEG-01, KU-812 y K-562. B) Efecto en la viabilidad de la combinación durante 24h de ambos inhibidores (Imatinib + C646) en las líneas celulares KU-812 y K-562.

En la línea celular KU-812, la combinación de ambas drogas fue más efectiva que el tratamiento con Imatinib (pvalor = 3,68E-5) o C646 (pvalor = 0,0031) en monoterapia. En el caso de la línea celular K-562, dichos valores fueron de pvalor= 1,95E-5 y pvalor= 0,002 respectivamente.

En el caso de las líneas HEL y SET-2 se probaron los fármacos Hidroxiurea (HU), Ruxolitinib (Ruxo), y sus combinaciones con C646. Para HU se utilizaron concentraciones de 1000, 2000 y 3000uM y para Ruxo, de 500, 1000 y 1500nM. Estos experimentos se realizaron durante más tiempo, ya que se vio que el efecto de HU y Ruxo era de acción más lenta que C646, comenzándose a notar dicho efecto tras dos días en cultivo. Puesto que estas dos líneas celulares eran especialmente sensibles a C646 y puesto que el tratamiento combinado HU-C646 y Rx-C646 tendría que realizarse al menos tras 48h, se decidió combinar las concentraciones más altas de HU y Ruxo con la concentración baja de C646 (12,5µM). Tal y como se observa en la **figura 4.34**, la aplicación de la terapia convencional conjuntamente con C646 tuvo normalmente un mayor efecto que por separado. Así pues, la aplicación de Ruxo y C646 conjuntamente en la línea celular HEL dio como resultado un efecto mayor que la aplicación de C646 solamente (pvalor = 0,048) y de Ruxo exclusivamente (pvalor = 1,01E-5). Dichos valores fueron de 0,022 y de 2,59E-6 respectivamente en el caso de la línea celular SET-2. Esto confirma que la combinación de Ruxolitinib-C646 produce un mayor efecto que los efectos causados de forma individual, al menos en dichas líneas celulares y con las concentraciones y tiempos de incubación probados en este trabajo.

Para el caso de la Hidroxiurea, en la línea celular HEL, se vio que la combinación de HU-C646 tenía un mayor efecto que la aplicación individual de C646 (pvalor = 0,0028). Sin embargo, dicha

combinación no mostró un mayor efecto que cuando se usó HU exclusivamente (pvalor = 0,71). No obstante, esta misma comparación sí que fue estadísticamente significativa cuando se midió el ensayo a las 24h en vez de a las 48h, produciéndose un mayor efecto combinado de HU-C646 que cuando se usó HU de manera individual (pvalor = 0,021).

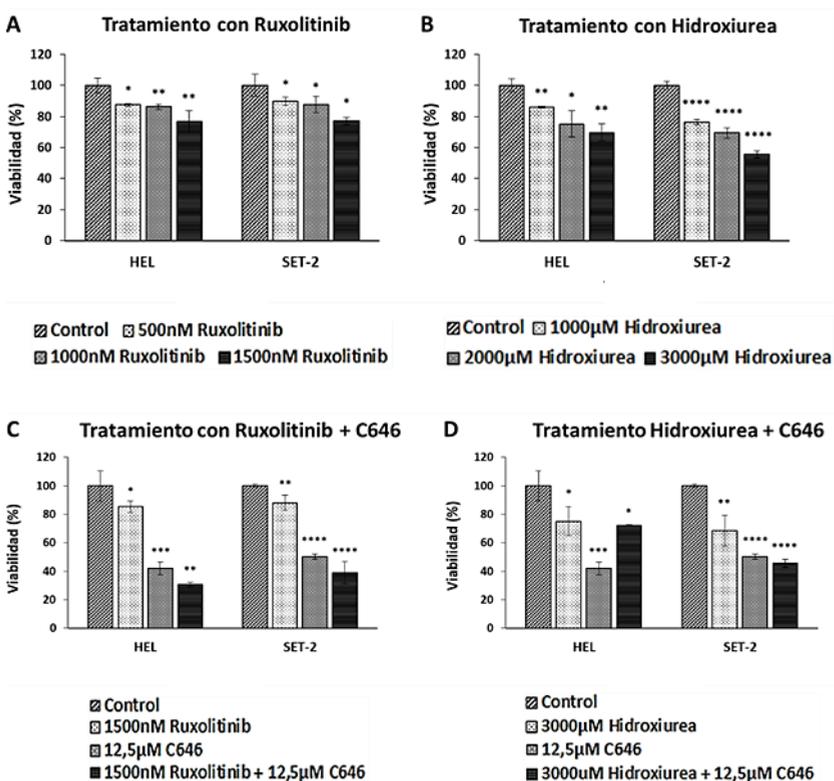


Figura 4.34 A) Resultados de viabilidad (MTS) tras 24h de tratamiento con las concentraciones de 500, 1000 y 1500nM de Ruxolitinib en las líneas celulares HEL y SET-2. B) Resultados de viabilidad (MTS) tras 24h de tratamiento con Hidroxiurea (1000, 2000 y 3000μM) en las líneas celulares HEL y SET-2. C y D) Efecto en la viabilidad de la combinación durante 24h de dichos fármacos junto con C646 en ambas líneas celulares.

En el caso de la línea celular SET-2, los resultados obtenidos fueron los contrarios. El tratamiento combinado con HU-C646 produjo un mayor efecto que cuando se usó HU de forma individual (pvalor = 0,0098); sin embargo, el tratamiento individual con C646 no produjo un mayor efecto (significativamente estadístico) que el tratamiento combinado HU-C646.

A la vista de los resultados anteriores, se confirma que el tratamiento combinado de la terapia convencional (Ruxolitinib o Hidroxiurea) junto con C646 produjo un mayor efecto que el uso de la terapia convencional de forma exclusiva en los cuatro casos probados, tal y como se vio anteriormente en el caso de las líneas celulares de LMC y del Imatinib.

Se confirma pues que la inhibición del complejo tuvo un efecto antiproliferativo en todas las líneas estudiadas, y que la terapia convencional en el contexto de la inhibición del complejo tiene un mayor efecto en la viabilidad/proliferación de las líneas celulares estudiadas que el uso exclusivo de la terapia convencional.

4.2.3.3. Estudios de apoptosis mediante citometría de flujo en las líneas celulares con inhibición química de p300

Se realizaron experimentos de apoptosis por citometría de flujo en las seis líneas celulares tras los tratamientos con la terapia convencional, C646, o la combinación de ambos. Los ensayos de apoptosis se realizaron mediante la combinación de los anticuerpos Anexina V/Yoduro de Propidio, y siguiendo el patrón utilizado en el apartado anterior.

Todas las líneas celulares fueron tratadas durante 12 y 24h con las concentraciones 12,5 y 25 μ M de C646, observándose los mismos efectos obtenidos mediante proliferación/viabilidad: En todas las líneas se observó un descenso considerable en el porcentaje de células vivas y un aumento de la apoptosis, sobre todo en las líneas celulares HEL, SET-2 y HL-60, las cuales fueron especialmente sensibles al tratamiento. En la **figura 4.35** se muestran imágenes representativas de los resultados de apoptosis por citometría de flujo en las seis líneas celulares tras la aplicación de 25 μ M de C646, así como la cuantificación de los resultados.

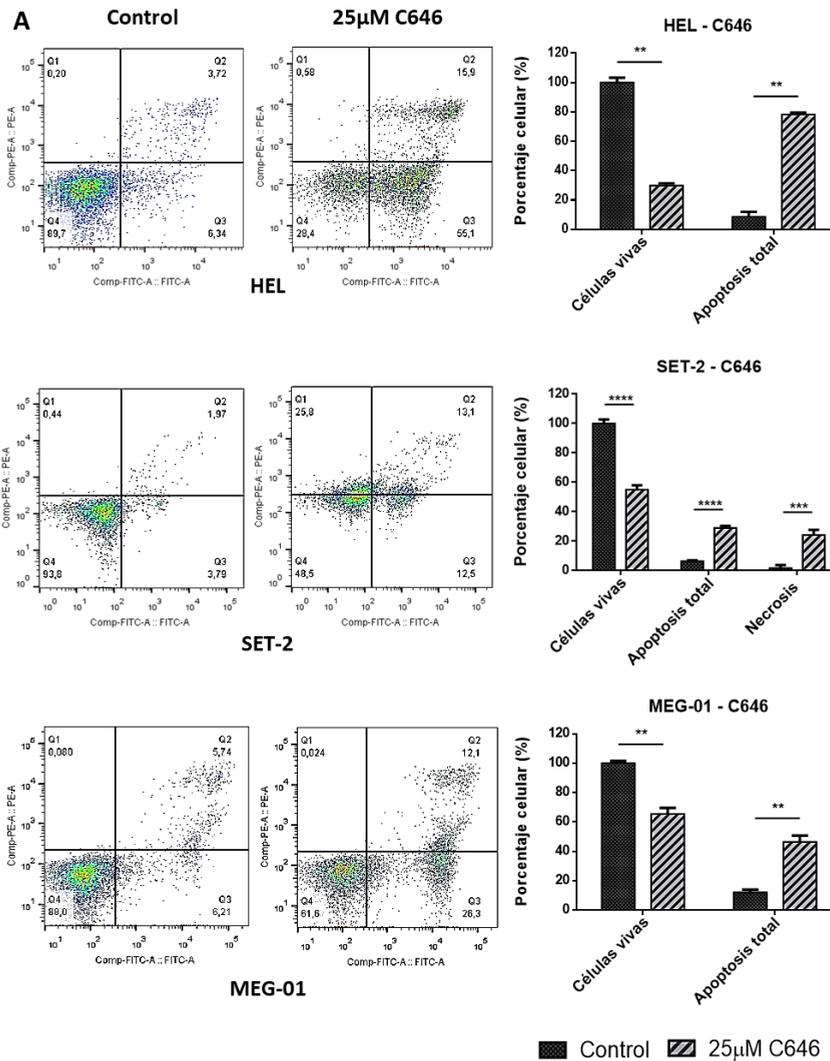


Figura 4.35 A) Gráficos de citometría de flujo de los resultados obtenidos mediante la técnica de apoptosis con Anexina V/Yoduro de propidio en las líneas celulares HEL, SET-2 y MEG-01 tras el tratamiento durante 24h con 25µM de C646 y cuantificación de los resultados.

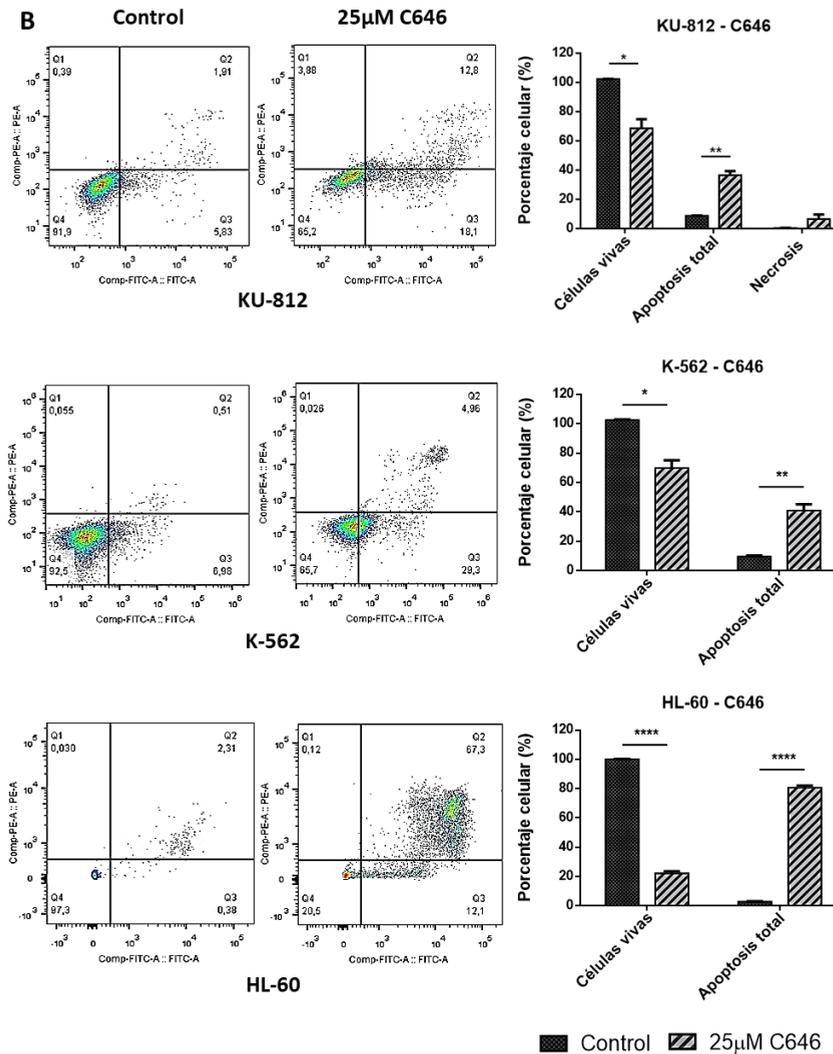


Figura 4.35 B) Gráficos de citometría de flujo de los resultados obtenidos mediante la técnica de apoptosis con Anexina V/Yoduro de propidio en las líneas celulares KU-812, K-562 y HL-60 tras el tratamiento durante 24h con 25µM de C646 y cuantificación de los resultados.

En segundo lugar, se realizaron los tratamientos combinados Imatinib-C646 siguiendo el mismo modo de proceder que en el apartado anterior: Las líneas celulares de LMC se trataron primero con

Imatinib (250 y 500nM) durante 24h y después, conjuntamente con Imatinib y C646.

El tratamiento con Imatinib (**figura 4.36 A**), causó una notable apoptosis celular, tal y como se deducía de los experimentos de viabilidad y proliferación.

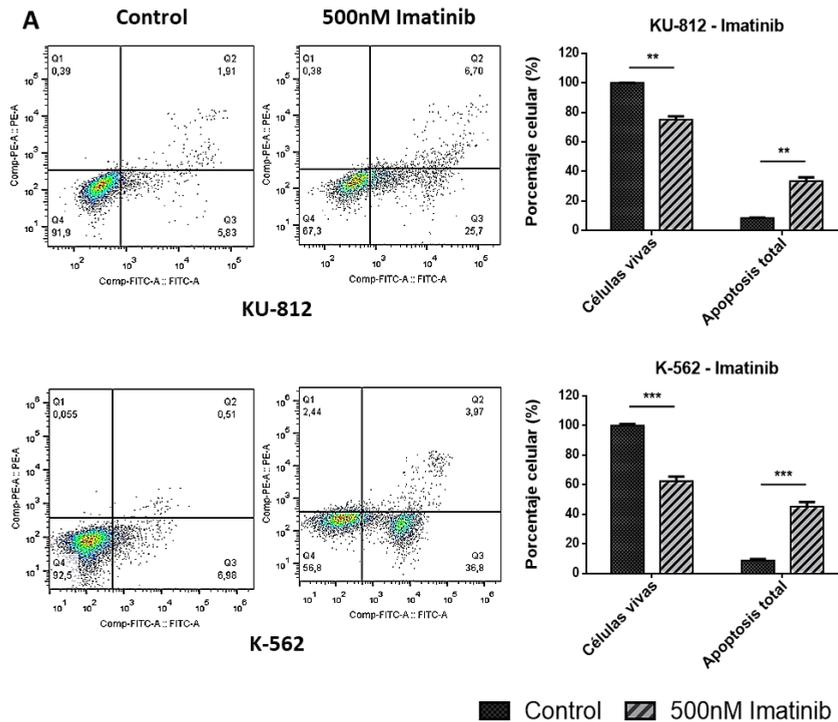


Figura 4.36 A) Gráficos de citometría de flujo de los resultados obtenidos mediante la técnica de apoptosis (AV/PI) en las líneas celulares de LMC KU-812, K-562 tras el tratamiento durante 24h con 500nM de Imatinib y cuantificación de los resultados.

En el tratamiento combinado (**figura 4.36 B**) se utilizaron las concentraciones bajas de ambos fármacos para evitar excesiva muerte celular y apreciar mejor el efecto combinado. obteniéndose de nuevo los mismos resultados observados anteriormente: El tratamiento

combinado fue más efectivo que la aplicación de ambos inhibidores por separado. Se vio que la combinación de ambas drogas en la línea celular KU-812 era más efectiva que el tratamiento individual con Imatinib (pvalor = 0,0048); y también más efectiva que el tratamiento exclusivo con C646 (pvalor = 0,025). En el caso de la línea celular K-562 se vio lo mismo, obteniéndose unos valores de significancia estadística de 0,04 y de 0,011 respectivamente. Los gráficos de citometría de flujo para ambos casos se muestran en el apartado III del capítulo de ANEXOS.

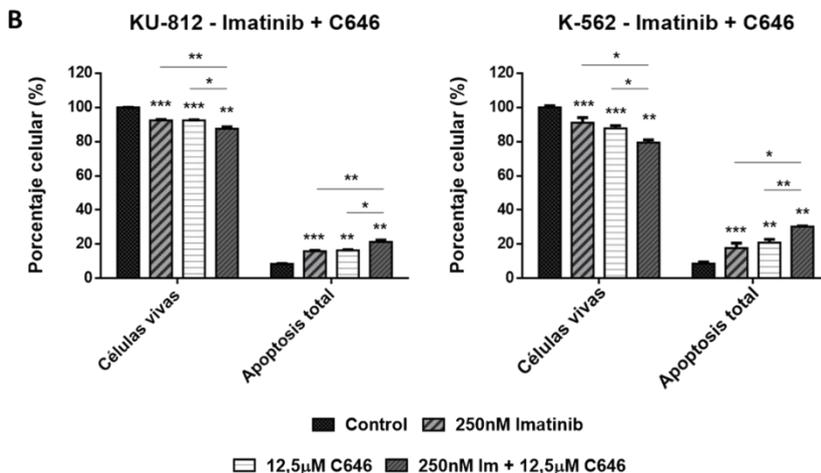


Figura 4.36 B) Resultados obtenidos mediante la técnica de apoptosis (AV/PI) en las líneas celulares de LMC KU-812 y K-562 tras el tratamiento durante 24h con 250nM de Imatinib, 12,5µM de C646 y la combinación de ambos.

Las líneas de NMPs Ph-neg (HEL y SET-2) se trataron también con la terapia convencional por separado (HU y Ruxo) y después conjuntamente con C646. De igual modo que en los experimentos de proliferación/viabilidad, los ensayos de apoptosis se realizaron a las 48h. Se combinaron las concentraciones altas de HU y Ruxo con 12,5µM de C646. Los resultados fueron los siguientes: Para la línea celular HEL, se observó que el tratamiento con 3000uM de HU causaba

una gran muerte celular (el porcentaje de célula vivas disminuyó un 40,44%), en contraposición al tratamiento con 1500nM de Ruxo, cuyo efecto apoptótico fue muy bajo (la reducción fue del 12,6%). En el caso del tratamiento combinado se observó lo siguiente: En el caso de la combinación HU-C646 no se observó un mayor efecto que aquel causado por ambos tratamientos por separado, posiblemente debido a que la concentración de HU utilizada producía ya por si sola una elevada muerte celular. No obstante, en el caso de la terapia combinada Ruxo-C646 se observó que, mientras el tratamiento con Ruxolitinib en solitario tan sólo producía un descenso del 12,6% en el porcentaje de células vivas, y el tratamiento con C646 un 21,54%, al combinar ambos fármacos dicha reducción aumentaba hasta un 43,72%, mostrando de nuevo que el tratamiento combinado a dichas concentraciones era más efectivo que el tratamiento de ambos fármacos en solitario (pvalor Ruxo-combinación = 0,0009; pvalor C646-combinación = 0,0086).

En la línea SET-2, las concentraciones utilizadas de los tres fármacos causaron un efecto muy ligero. Sin embargo, suficiente para confirmar que, al menos a dichas concentraciones, ambos fármacos convencionales HU y Ruxo tenían un mayor efecto apoptótico cuando se usaban en presencia de C646, por tanto, la terapia convencional volvía a tener mayor efecto cuando el complejo estaba inhibido (pvalor Ruxo-combinación = 0,0013; pvalor HU-combinación = 0,034).

En la **figura 4.37**, se pueden apreciar estos resultados en HEL y SET-2. Las gráficas de citometría de flujo se pueden consultar en el *ANEXO IV*.

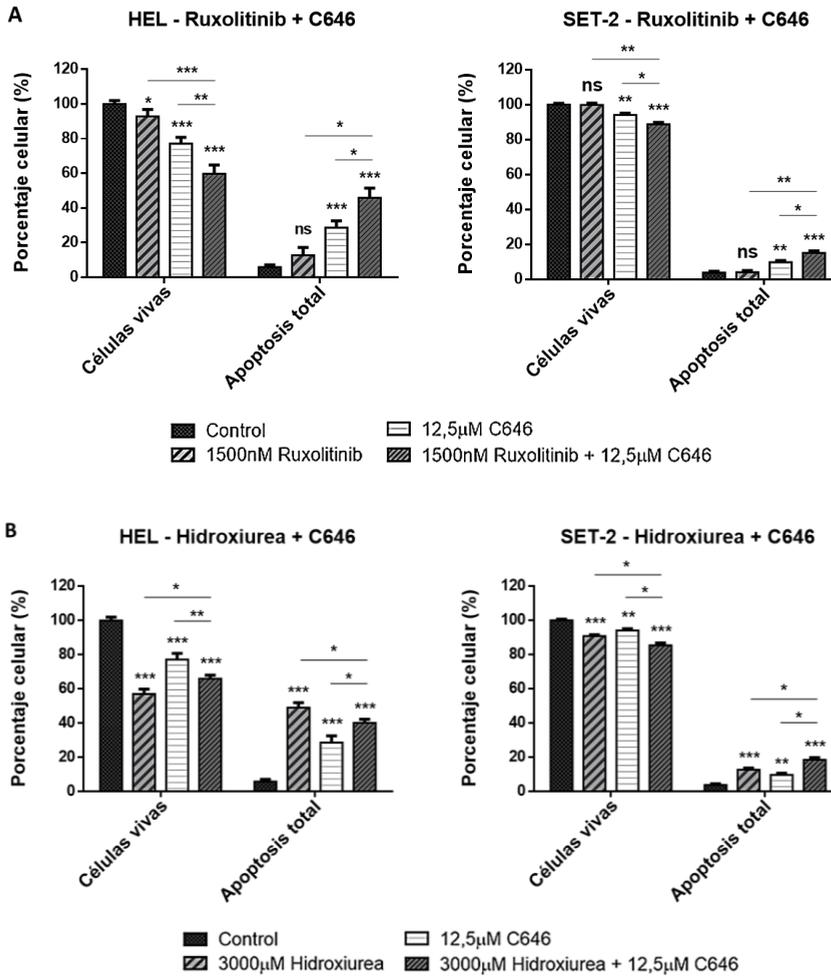


Figura 4.37 Resultados obtenidos mediante apoptosis (AV/PI) en las líneas celulares cromosoma Filadelfia negativas HEL y SET-2 tras el tratamiento durante 48h con A) 1500nM de Ruxolitinib, 12,5µM de C646 y la combinación de ambos. B) 3000µM de Hidroxiurea, 12,5µM de C646 y la combinación de ambas drogas.

4.2.3.4. Estudios de ciclo celular mediante citometría de flujo en las líneas celulares con inhibición química de p300

Los ensayos de ciclo celular se realizaron utilizando yoduro de propidio y las condiciones fueron las mismas que en el caso de los ensayos de apoptosis. En primer lugar, se analizó el patrón de ciclo celular en las seis líneas tras el tratamiento durante 12 y 24h con 12,5 y 25µM de C646. Solo se muestran los resultados del tratamiento a las 24h con 25µM de C646: Tal y como se observa en la **figura 4.38**, la aplicación del inhibidor de p300 tuvo un efecto drástico en el patrón de ciclo celular en todas las líneas estudiadas. Dicho efecto se basaba en un aumento bastante acusado del porcentaje de células en fase G0/G1 y una disminución de las células en fase S, respecto a la muestra sin tratar. Además, también se observó un descenso del porcentaje celular en fase G2/M en cuatro de las seis líneas celulares. Todos los efectos comentados fueron significativamente estadísticos, siendo las líneas celulares HEL y KU-812 las más afectadas por C646 en cuanto a los cambios en el patrón de ciclo celular se refiere. Por otra parte, la línea celular K-562 fue la menos afectada.

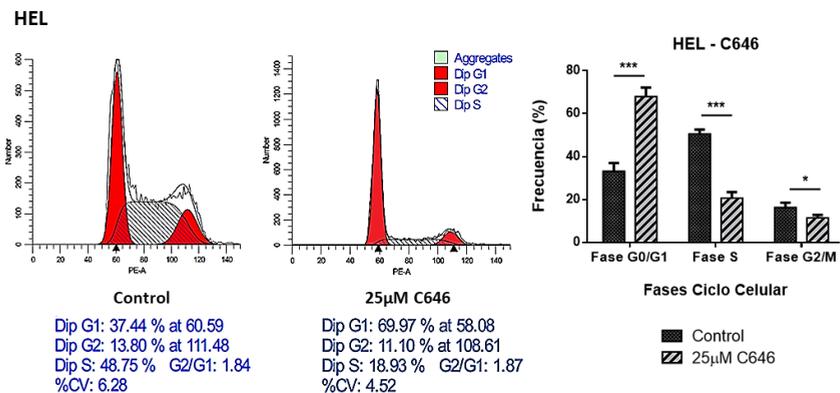
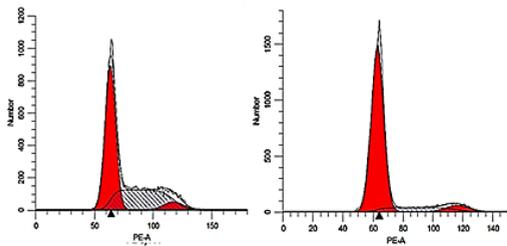


Figura 4.38 Resultados de ciclo celular obtenidos mediante experimentos de citometría de flujo con yoduro de propidio tras el tratamiento durante 24h con 25µM de C646 en la línea celular HEL.

SET-2



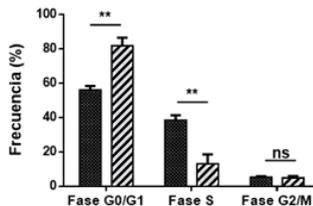
Control

Dip G1: 57.18 % at 63.35
 Dip G2: 5.68 % at 117.19
 Dip S: 37.14 % G2/G1: 1.85
 %CV: 7.09

25µM C646

Dip G1: 83.95 % at 62.73
 Dip G2: 5.88 % at 116.05
 Dip S: 10.17 % G2/G1: 1.85
 %CV: 6.57

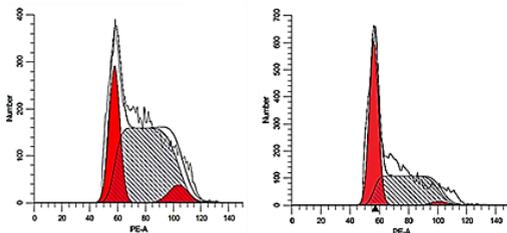
SET-2 - C646



Fases Ciclo Celular

■ Control
 ▨ 25µM C646

MEG-01



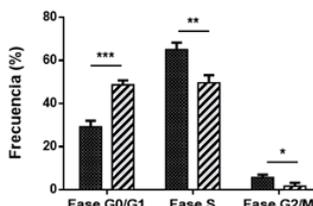
Control

Dip G1: 26.53 % at 57.54
 Dip G2: 6.24 % at 103.57
 Dip S: 67.22 % G2/G1: 1.80
 %CV: 6.83

25µM C646

Dip G1: 49.02 % at 55.97
 Dip G2: 1.97 % at 100.75
 Dip S: 49.01 % G2/G1: 1.80
 %CV: 5.64

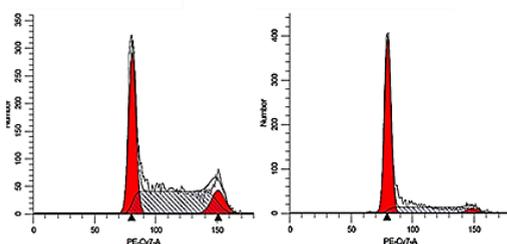
MEG-01 - C646



Fases Ciclo Celular

■ Control
 ▨ 25µM C646

KU-812



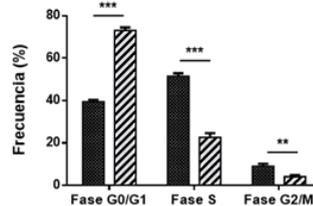
Control

Dip G1: 39.23 % at 80.58
 Dip G2: 10.41 % at 150.68
 Dip S: 50.36 % G2/G1: 1.87
 %CV: 3.69

25µM C646

Dip G1: 73.31 % at 79.55
 Dip G2: 3.65 % at 148.76
 Dip S: 23.04 % G2/G1: 1.87
 %CV: 3.27

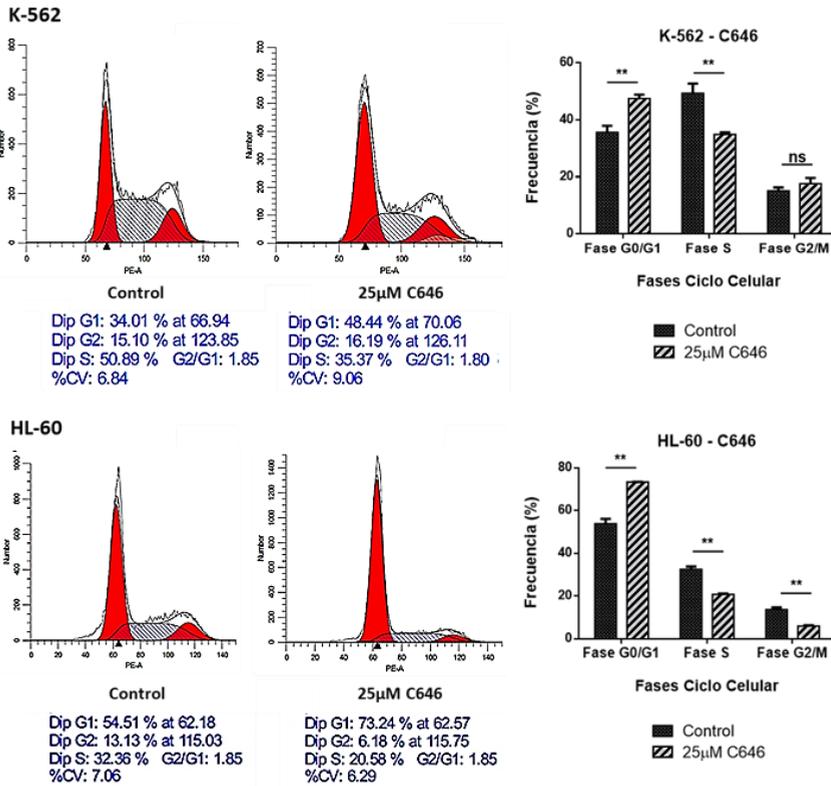
KU-812 - C646



Fases Ciclo Celular

■ Control
 ▨ 25µM C646

Continuación figura 4.38 Resultados de ciclo celular tras el tratamiento en las líneas celulares SET-2, MEG-01 y KU-812.



Continuación figura 4.38 Resultados de ciclo celular tras el tratamiento en las líneas celulares K-562 y HL-60.

Por otro lado, también se realizó el estudio del ciclo celular tras los tratamientos combinados terapia convencional-C646, del mismo modo que en los apartados anteriores. En el caso de las líneas celulares de LMC se observó lo siguiente: En la línea KU-812 (**figura 4.39 A**), ambos inhibidores producían cambios estadísticamente significativos en el patrón de ciclo celular que correspondían nuevamente con un aumento de la porción celular en fase G0/G1 y una disminución del porcentaje en fase S y, en menor medida, en la fase G2/M. Concretamente se vio que la aplicación de C646 producía cambios más acusados que la aplicación de Imatinib, y además, los cambios en el patrón de ciclo celular eran también más acusados cuando se

combinaban ambos inhibidores que cuando se aplicaban por separado.

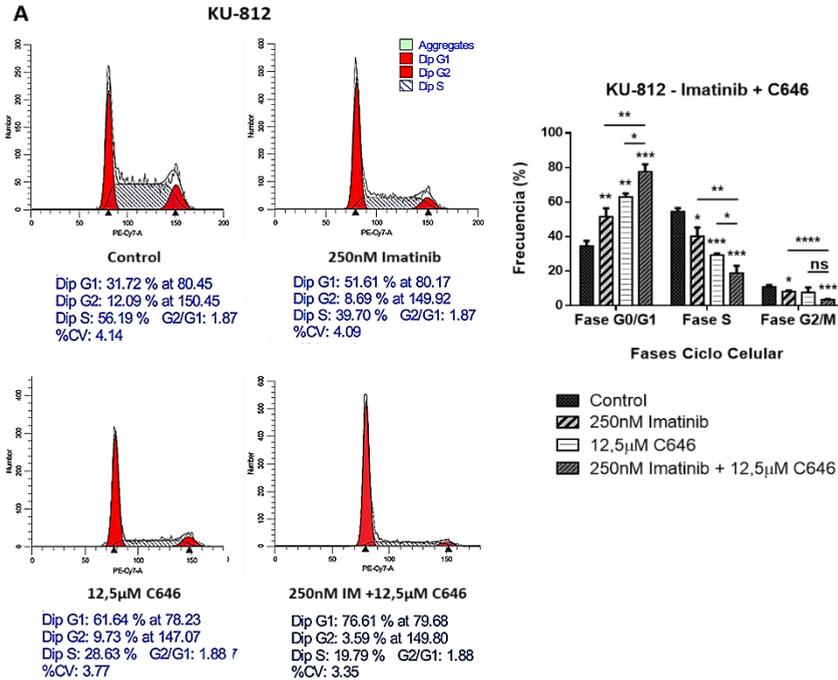


Figura 4.39 A) Resultados de ciclo celular tras el tratamiento durante 24h con 250nM de Imatinib, 12,5µM de C646 y la combinación de ambos en la línea celular KU-812.

En la otra línea celular de LMC, la línea K-562, los resultados observados tras el tratamiento con Imatinib consistían en un aumento de la fase G0/G1, un descenso en la fase S y un ligero descenso en la fase G2/M. En el caso de C646 se observó lo mismo excepto en la fase G2/M, que aumentó ligeramente. Se vio también que la aplicación de C646 producía un efecto mayor en los cambios del patrón de ciclo celular que la aplicación únicamente de Imatinib. No obstante, en esta línea no pudo observarse un mayor efecto combinado de ambos inhibidores respecto al observado cuando se usaron por separado, sin

embargo, se puede afirmar que el tratamiento conjunto con ambos inhibidores causó un mayor efecto que el tratamiento con la terapia convencional Imatinib.

En la **figura 4.39 B** se muestran los resultados para la línea celular K-562. Las gráficas de ciclo celular se mostrarán en el *ANEXO V*.

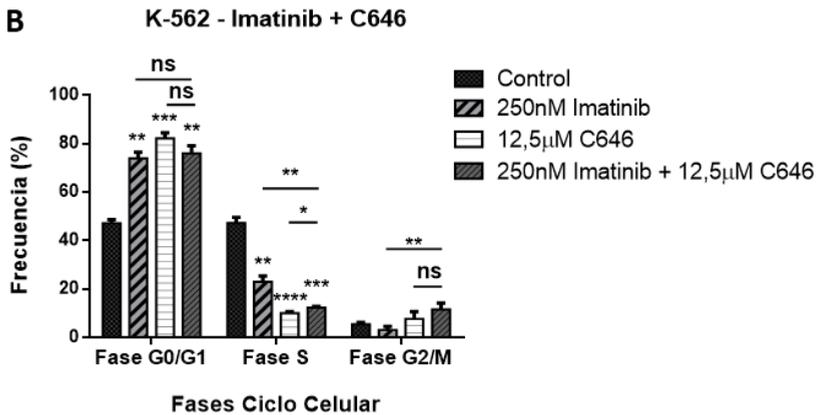


Figura 4.39 B) Resultados de ciclo celular tras el tratamiento durante 24h con 250nM de Imatinib, 12,5µM de C646 y la combinación de ambos en la línea celular K-562.

En último lugar, se observaron los cambios en el patrón de ciclo celular tras los tratamientos combinados terapia convencional-C646 en las líneas celulares cromosoma Filadelfia negativas HEL y SET-2. En ambas líneas se observaron los mismos resultados: La terapia durante 48h con 3000µM de Hidroxiurea producía una parada del ciclo en fase G0/G1 y fase S, las cuales aumentaban ligeramente, mientras que la fase G2/M desaparecía totalmente. Por otro lado, la terapia con 1500nM de Ruxolitinib apenas tenía efecto sobre dichas líneas, y dicho ligero efecto consistía en un muy leve aumento de la proporción de células en fase G0/G1.

Cuando Hidroxiurea y Ruxolitinib se combinaron con 12,5 μ M de C646, el resultado del patrón de ciclo celular obtenido fue exactamente un patrón intermedio entre el causado de manera independiente por ambos tratamientos en solitario. Puesto que Ruxolitinib no causó apenas efecto mientras que C646 tenía un efecto considerable, la combinación de ambas drogas no causó más efecto que la aplicación de C646 por separado, pero si un mayor efecto que el tratamiento individual con Ruxolitinib.

En el caso del tratamiento con Hidroxiurea combinado con la inhibición del complejo, lo que se vio es que, puesto que ambos tratamientos por separado producían cambios considerables en el patrón de ciclo celular, la combinación de ambas drogas producía un efecto aún mayor en el patrón de ciclo celular de las células en cultivo, que ambos tratamientos por separado, causando un aumento significativo de la proporción celular en fase G0/G1 y de la fase S, mientras que la fase G2/M prácticamente desaparecía.

A continuación, en la **figura 4.40**, se muestran dichos resultados para la línea celular SET-2.

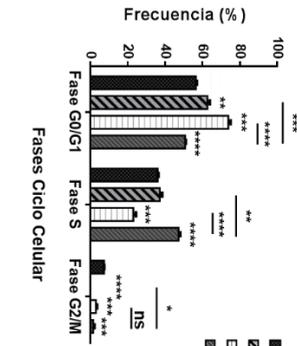
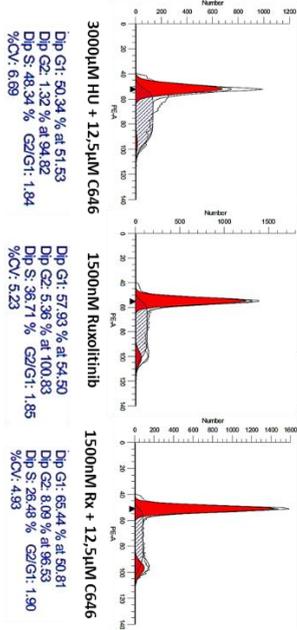
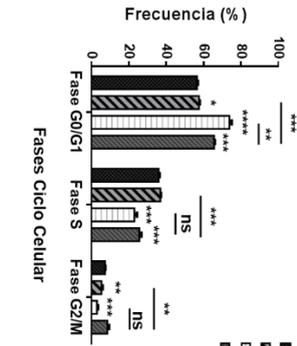
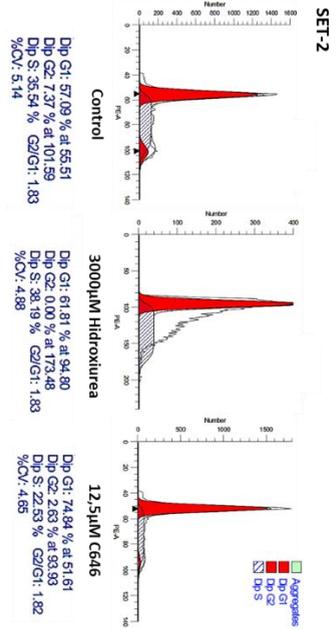


Figura 4.40 Resultados de ciclo celular tras el tratamiento durante 48h con 3000µM de Hidroxiurea, 1500nM de Ruxolitinib y la combinación de ambos con 12,5µM de C646 en la línea celular SET-2.

4.2.2.5. Resumen de los ensayos de inhibición biológica de p300

La aplicación del inhibidor de p300 C646 tuvo un efecto drástico en la inhibición del complejo en las líneas celulares. Dicho efecto se traducía a nivel funcional en un descenso de la proliferación y la viabilidad en todas las líneas celulares. Se vio también que la inhibición de p300 causaba un incremento en la apoptosis tras 24h de tratamiento con el inhibidor, y que dicho tratamiento producía cambios en el patrón de ciclo celular de las células tratadas, que consistían en un aumento de la proporción celular en fase G0/G1 y un descenso de la proporción de células en fase S y en fase G2/M. Además, se vio que la combinación de C646 (inhibición del complejo) junto con la terapia convencional en las diferentes líneas producía en la mayoría de casos (con pocas excepciones) un efecto mayor que el causado por ambos tratamientos de manera separada.

4.2.4 Inhibición simultánea *HIPK2*-p300 en la línea celular MEG-01

Finalmente, se realizó un último estudio funcional el cual consistió en tratar la línea celular con knock-down de *HIPK2*, MEG-01-shRNA-*HIPK2* con el C646 para, de este modo, realizar una inhibición doble de los dos genes reguladores del complejo *HIPK2* y *EP300*. Dicha línea celular fue tratada con 25µM de C646 durante 24h antes de ser testada en los diferentes ensayos funcionales.

4.2.4.1 Análisis mediante western blot

Tras el tratamiento con C646, se realizó un análisis por western blot de todos los genes del complejo. Tal y como se muestra en la

figura 4.41, al inhibir p300 en la línea celular MEG-01-shRNA-*HIPK2*, aparecieron cambios que no eran observados solamente con la inhibición de *HIPK2*: La proteína p300 disminuyó como es lógico, pero también *HIPK2*, que pasó de estar inhibida al 50% a prácticamente desaparecer en su totalidad con el knock-down doble *HIPK2*-p300. Además, se vio que efectivamente p53 no desaparecía, pero p-p53 se mantenía inhibido, que AML1 seguía expresándose y que p-AML1 desaparecía casi en su totalidad, mientras que su expresión no se veía alterada sólo con un 50% de knock-down de *HIPK2*.

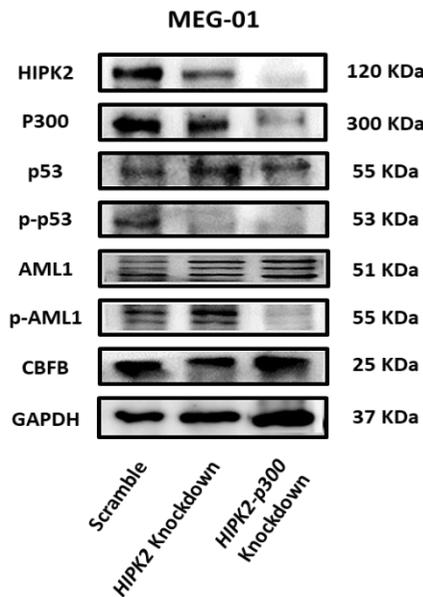
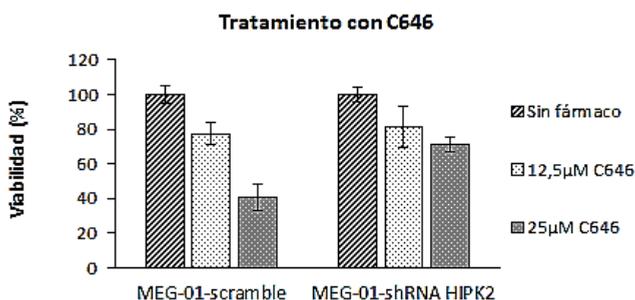


Figura 4.41 Resultados de western blot mostrando el efecto de la inhibición de *HIPK2* en la línea celular MEG-01 (50%), y de *HIPK2* + p300, sobre el resto de genes del complejo *HIPK2/EP300/P53/AML1/CBF-β*, así como sobre las formas fosforiladas p-p53 y p-aml1.

4.2.4.2. Estudios de viabilidad

También se realizaron estudios de viabilidad en la línea celular MEG-01 con inhibición de *HIPK2* + p300 (**figura 4.42**). Se comprobó que cuando *HIPK2* estaba inhibido, la inhibición química de p300 tenía un efecto mucho menos drástico sobre las células que en condiciones normales de expresión de *HIPK2*. Los resultados obtenidos tras tratar ambas líneas celulares (MEG-01-scramble y MEG-01-shRNA-*HIPK2*) durante 24h con 12,5µM de C646 mostraron una diferencia muy ligera (77% de viabilidad vs 81%) entre ellas; sin embargo, cuando se aumentó la concentración del inhibidor hasta 25µM, la viabilidad disminuyó hasta un 40,59% en la línea infectada con el scramble, mientras que la viabilidad en la línea con inhibición de *HIPK2* fue de un 71,19%, es decir, la inhibición de p300 en el contexto de la inhibición de *HIPK2*, tenía un menor efecto en la viabilidad (hasta un 30,6% de



Test-T (12,5µM C646)	SD 1	SD 2	pvalor
MEG-01-scramble	77,20 ± 6,46	-	-
MEG-01-shRNA HIPK2	77,20 ± 6,46	81,24 ± 12,04	0,636

Test-T (25µM C646)	SD 1	SD 2	pvalor
MEG-01-scramble	40,59 ± 7,24	-	-
MEG-01-shRNA HIPK2	40,59 ± 7,24	71,19 ± 3,95	0,003

Figura 4.42 Viabilidad relativa en las líneas celulares MEG-01-scramble y MEG-01-shRNA *HIPK2* tras el tratamiento con 12,5 y 25µM de C646.

diferencia) en comparación a la inhibición de p300 en condiciones normales de expresión de *HIPK2*.

4.2.4.3. Ensayos de apoptosis mediante citometría de flujo en la línea celular MEG01 con inhibición simultánea de *HIPK2* y p300

Ambas líneas celulares (scramble y shRNA-*HIPK2*) tratadas con C646 fueron expuestas a experimentos de apoptosis. Los resultados tras estos ensayos mostraron unos resultados muy llamativos, y es que la inhibición química de p300 tenía unos efectos apoptóticos severos en la línea celular scramble, sin embargo, estos efectos eran mucho menos atenuados en la línea celular con inhibición de *HIPK2*. En concreto, tal y como se observa en la **figura 4.43**, el uso de las concentraciones de 12,5 y 25 μ M de C646 causaba un aumento de la apoptosis desde un 22,2% en el control hasta un 57,65% y un 68,85% respectivamente en la línea celular scramble; y una disminución en el porcentaje de células vivas desde un 76,97% en el control hasta un 40,65% y un 29,30% respectivamente. Por otro lado, al observar la línea celular MEG-01-shRNA *HIPK2* los valores de aumento de la apoptosis variaron desde un 11,49% en el control, a un 15,11% y un 24,64% tras usar ambas concentraciones de C646; y los valores en el porcentaje de células vivas disminuyeron desde un 88,3% correspondiente al control a un 84,60% y un 74,95% tras el tratamiento con ambas concentraciones del inhibidor de p300.

Así pues, mientras que en la línea scramble hay unas diferencias de hasta un 46,65% en la apoptosis y de hasta un 47,67% en el porcentaje de células vivas cuando comparamos la línea celular sin tratar (control) y la muestra tratada con 25 μ M de C646, estos valores en MEG-01-shRNA *HIPK2* son sólo de un 13,15% y de un

13,35% respectivamente, mostrando valores estadísticamente significativos al comparar ambas líneas celulares.

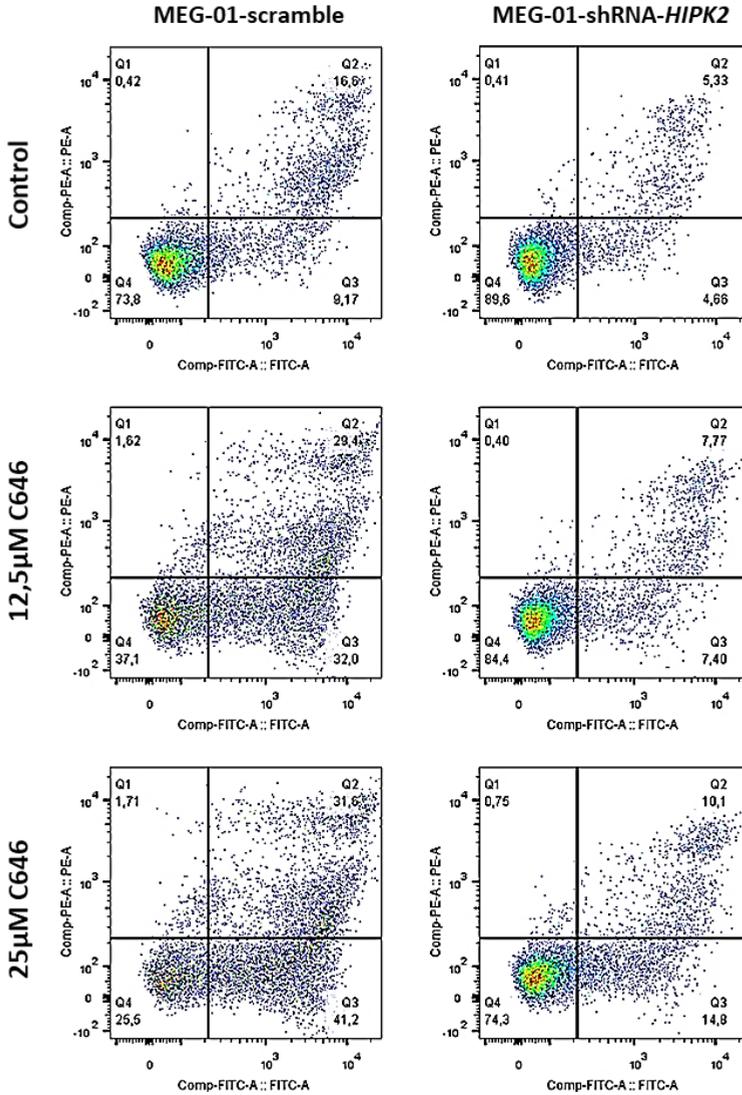


Figura 4.43 Gráficas de citometría de flujo que muestran los resultados de la técnica de apoptosis (AV/PI) en las líneas celulares MEG-01-scramble y MEG-01-shRNA-HIPK2 tras el tratamiento durante 24h con 12,5 y 25µM de C646.

4.2.4.4. Estudios de ciclo celular mediante citometría de flujo en la línea celular MEG01 con inhibición simultánea de HIPK2 y p300

Se observaron también los patrones de ciclo celular en ambas líneas tras el efecto de C646. Estos resultados mostraron unos efectos acordes a lo observado en los ensayos de apoptosis, observándose efectos mucho más drásticos en MEG-01-scramble respecto a MEG-01-shRNA-HIPK2. No obstante, como se puede observar en la **figura 4.44** y se vio anteriormente, las diferencias principales se vieron al comparar las dos muestras control, que ya eran muy diferentes entre sí debido a la inhibición de *HIPK2*. Así pues, al tratar ambas líneas celulares con 12,5µM, se vieron cambios muy drásticos en MEG-01-scramble, donde la fase G0/G1 aumentó un 22,36%, la fase S disminuyó un 23,75%, y la fase G2/M aumentó un 1,43%. Por el contrario, no se observaron grandes cambios en MEG-01-shRNA-HIPK2, donde la fase G0/G1 aumentó sólo un 7,05%, la fase S no sufrió ningún cambio, y la fase G2/M disminuyó un 7,17%.

Cuando la concentración de C646 se aumentó hasta 25µM, dichos porcentajes se incrementaron respectivamente hasta un 24,74% (fase G0/G1), un 32,29% (fase S) y un 6,06% (fase G2/M) en la línea celular scramble. Dichos porcentajes fueron respectivamente de un 13,85%, un 0,21% y un 13,65% en la línea celular con inhibición de *HIPK2*.

Es llamativo que los cambios en la línea celular scramble consistieron en un aumento de las fases G0/G1 y G2/M y un descenso muy acusado de la fase S tras el tratamiento, mientras que en la línea con inhibición de *HIPK2*, lo que se observó fue un aumento de la fase G0/G1, un descenso de G2/M, mientras que la fase S no sufrió ninguna variación.

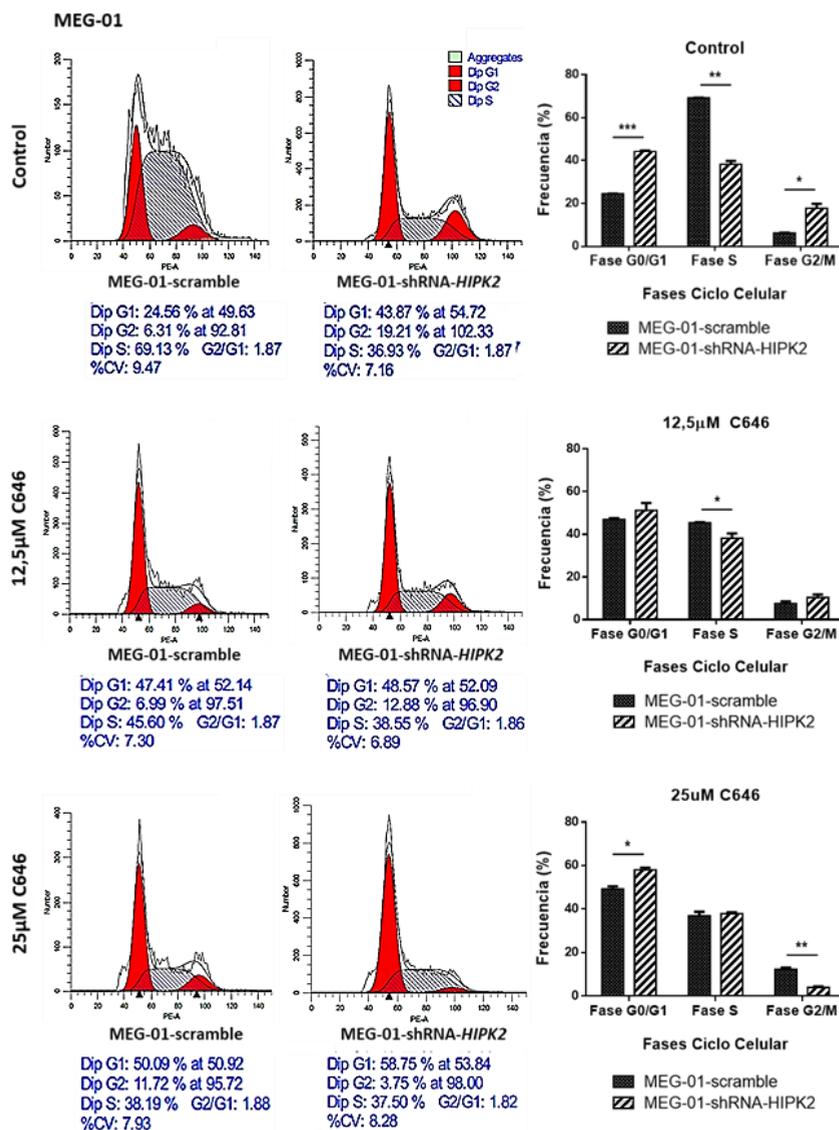


Figura 4.44 Gráficas de citometría de flujo que muestran los resultados de ciclo celular en las líneas celulares MEG-01-scramble y MEG-01-shRNA-HIPK2 tras el tratamiento durante 24h con 12,5 y 25µM de C646.

4.2.4.5. Resumen de los ensayos de inhibición simultánea de HIPK2 y p300 en la línea celular MEG01

Se puede concluir que la expresión de las proteínas HIPK2, p300 y p-AML1 disminuyeron al tratarse las células MEG-01-shRNA-HIPK2 con C646, respecto a la inhibición solamente del 50% de HIPK2. En cuanto a los resultados de los estudios funcionales, se vio que las células que presentaban inhibición de HIPK2 eran más resistentes a los efectos del tratamiento con C646, es decir, la inhibición de p300 causaba menores efectos a nivel de viabilidad, apoptosis y ciclo celular en las células con inhibición de HIPK2 respecto a las células que expresaban dicho gen normalmente, las cuales sufrían efectos más acusados.

4.3. INHIBICIÓN QUÍMICA DE P300 EN MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA Y MÉDULA ÓSEA DE DONANTES SIN NEOPLASIA HEMATOLÓGICA Y DE PACIENTES CON NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS CRÓNICAS

4.3.1. Introducción

En último lugar, se quiso comprobar si el efecto observado de la inhibición química de la acetiltransferasa p300 mediante el inhibidor C646 usado anteriormente en líneas celulares, producía un efecto similar en muestras celulares de pacientes de NMPs. Para ello se obtuvieron muestras frescas (recientemente extraídas), mediante previo consentimiento, de 17 pacientes de NMPs y de 11 donantes sin neoplasia hematológica que sirvieron como control. Todas las

muestras fueron proporcionadas por la unidad de Hematología del Hospital Clínico de Valencia y fueron de médula ósea y/o sangre periférica, según la disponibilidad, dando preferencia siempre a las muestras de médula sobre las de sangre. Además, debido a que las seis líneas celulares utilizadas en este trabajo son de origen mieloide, se decidió trabajar sólo con la porción mieloide de las muestras de los pacientes y donantes, de modo que los resultados fueran comparables a los resultados obtenidos previamente en líneas celulares. El procedimiento por el cual se separaron las células de estirpe mieloide del resto de la muestra está detallado en el apartado *MATERIALES Y MÉTODOS*.

Cabe destacar que se encontraron diferentes dificultades para llevar a cabo en este proceso, que se enumeran a continuación:

- a) En primer lugar, las muestras celulares de sangre periférica y médula ósea son muy sensibles a cualquier cambio y difíciles de mantener en cultivo, produciéndose una rápida mortalidad al poco tiempo de ser extraídas del cuerpo. Debido a esto, no todas las muestras pudieron ser analizadas mediante todas las técnicas, y muchas de las que sí que se pudieron analizar tuvieron que ser excluidas del estudio debido a la alta mortalidad celular tras el cultivo, que hacía imposible la evaluación del efecto del inhibidor C646.
- b) Las muestras no fueron extraídas para la realización exclusiva de este estudio. De este modo, las muestras disponibles fueron la parte restante que quedó disponible tras la realización de otros estudios diagnósticos, siendo a veces una muestra escasa que imposibilitaba la realización

de todos los experimentos deseados o la repetición de aquellos que no funcionaron correctamente en muchos casos.

- c) En muchas ocasiones, la muestra se recibió después de haber estado un tiempo extraída (nunca superior a 24h).
- d) Las muestras a estudio procedían de individuos de diferentes características, tratándose de personas de edades comprendidas entre los 9 meses y los 93 años de edad, de ambos sexos, pero sobre todo de diferentes casos clínicos y con distintas neoplasias mieloproliferativas.
- e) Debido a todo lo anterior, la celularidad total de cada muestra varió mucho de caso a caso. Del mismo modo los porcentajes de las diferentes subpoblaciones de la sangre eran muy distintos, dando todo esto aún más variabilidad al análisis.

Consecuentemente, es importante recalcar la dificultad de la realización de estos experimentos, a la hora de decidir qué cantidades celulares usar, discriminar qué muestras eran válidas o no, decidir unos tiempos de cultivo que fueran idóneos en todas las muestras y usar cantidades de fármacos que pudieran tener efecto en las diferentes muestras, pero sin llegar a ser suficientemente nocivas como para causar la muerte de todas las células, ya muy debilitadas por el hecho de estar en cultivo.

Se utilizaron, por tanto, tiempos de cultivo y concentraciones de fármacos que fueran válidos para todas las muestras, y se realizaron experimentos de viabilidad celular y apoptosis, así como diferentes estudios poblacionales mediante citometría de flujo. Todos ellos tras 24h de cultivo en presencia de una concentración de 12,5 μ M de C646 y/o también de 250nM de Imatinib, en el caso de las muestras de pacientes de LMC. En aquellos casos en los que la cantidad de muestra era abundante, se decidió probar además una serie extra de condiciones, evaluando diferentes tiempos de cultivo y concentraciones de fármacos, llegando en algunos casos a experimentar con tiempos de 12h, 24h, 48 y hasta 72h de cultivo, como en el caso de las líneas celulares ya descrito anteriormente. Si la cantidad de muestra viable lo permitía, se comprobó también el efecto de usar diferentes concentraciones de C646 y de Imatinib, así como de las combinaciones de ambos, por lo que en algunos casos se probaron concentraciones de C646 mayores de 12,5 μ M, tales como 25 o 50 μ M, y concentraciones de Imatinib de 500 o 1000Nm.

Se realizaron también experimentos de ciclo celular en todas las muestras. Sin embargo, estos experimentos no serán comentados en este trabajo. Esto se debe a que las células sanguíneas en cultivo rara vez proliferan, por lo que los experimentos de ciclo celular dieron como resultado patrones estáticos en los que las poblaciones celulares en cultivo se encontraban siempre en fase G0/G1 y apenas existían células en fase S/M o en fase G2. De este modo fue imposible distinguir entre unas muestras u otras antes y después de los diferentes tratamientos, ya que los únicos cambios que se observaban fueron en la fracción de células muertas, y esto es algo que puede medirse de una manera más adecuada mediante estudios de apoptosis.

Las muestras obtenidas se agruparon según el tipo de neoplasia en tres grupos básicos:

1- Grupo control: compuesto por las muestras celulares obtenidas de 11 individuos donantes (sin neoplasia mieloide). Dichas muestras procedían de la médula ósea del donante (6 de los casos) o de sangre periférica (los otros 5 casos restantes).

2- Pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC): En este caso se dispuso solamente de muestras de tres individuos con LMC de nuevo diagnóstico, debido a la poca incidencia de esta enfermedad. De dos de los individuos se obtuvo muestra medular, y del tercero, se pudieron obtener ambos tipos de muestra (médula y sangre periférica).

3- Pacientes de NMPs cromosoma Filadelfia negativos (TE, PV y MF): De este grupo se obtuvo muestra de 14 pacientes, de las cuales 4 eran muestras de médula ósea y 10 de sangre periférica. De las 14 muestras, 6 corresponden a pacientes de mielofibrosis (MF), 5 a pacientes de trombocitemia esencial (TE), una muestra es de un paciente con policitemia vera (PV), y los dos individuos restantes se trata de pacientes con síndromes mieloproliferativos cromosoma Filadelfia negativos con rasgos atípicos y no clasificables dentro de ninguno de los tres grupos anteriores (MF, TE y PV).

Se asignó un código numérico a los pacientes que hiciera más sencilla su identificación.

En el *ANEXO III*, en las **tablas 4.9, 4.10 y 4.11**, se muestra la información de los 28 individuos utilizados en este estudio y se indican algunos datos como el tipo de neoplasia, edad, sexo, porcentajes de la serie mieloide y porcentaje de blastos.

4.3.2. Estudios de viabilidad en muestras celulares de sangre periférica y médula ósea de donantes del grupo control y pacientes con NMPs, sometidas a tratamiento con C646, Imatinib o la combinación de ambos

Del mismo modo que se realizó con las líneas celulares, también se realizaron ensayos de viabilidad en las muestras celulares de los individuos sanos y enfermos. Estos ensayos sólo pudieron ser analizados correctamente en 17 de las 29 muestras. No obstante, la información obtenida en estos 17 casos permitió realizar una primera aproximación al estudio del efecto del inhibidor C646 o de su combinación con la terapia convencional en muestras de pacientes. Se probaron tres concentraciones distintas de cada inhibidor, así como la combinación de éstas, y se usaron tiempos de incubación desde las 12h hasta las 72h en algunos casos. Por ello, fue la única técnica que permitió experimentar con tiempos de exposición a los fármacos distintos a 24h.

Este grupo formado por 17 individuos se componía de 5 donantes del grupo control, dos pacientes de LMC y 10 pacientes con NMPs cromosoma Filadelfia negativos.

Los resultados de esta técnica en estos 17 pacientes recrearían perfectamente los que se obtendrían más adelante mediante los experimentos de apoptosis, de modo que la técnica de viabilidad pudo utilizarse también para corroborar aquellos efectos descritos posteriormente mediante apoptosis, a la vez que permitió probar más tiempos de exposición a los fármacos, como ya se ha comentado.

A continuación, se exponen los resultados de viabilidad obtenidos para cada grupo de individuos.

4.3.2.1. Estudios de viabilidad en muestras del grupo control

Las 5 muestras analizadas del grupo control se sometieron al tratamiento durante 12, 24 y 48h con al menos la concentración de 12,5 μ M de C646. Además, dos de ellas pudieron ser analizadas hasta la 72h de cultivo en presencia del fármaco. Los resultados obtenidos confirmaron que ninguna de las 5 muestras sufrió descenso alguno en la viabilidad tras la incubación de las células con dicha cantidad de fármaco y en ninguno de los tiempos de cultivo observados.

Además, 3 de las cinco muestras pudieron ser cultivadas también durante 12, 24 y 48h con concentraciones de 25 μ M, y de estas 3, dos de ellas también se cultivaron con una concentración de 50 μ M de C646, de nuevo durante los tres tiempos de tratamiento anteriores. Los resultados volvieron a mostrar que ninguna muestra sufrió descenso en la viabilidad bajo el tratamiento con ninguna de las concentraciones usadas de C646 y tras ninguno de los tiempos de exposición testados.

En la **figura 4.45** se observan un par de casos representativos de resultados en los controles sanos. Así pues, no se observó ningún descenso significativo en la viabilidad tras 72h de exposición a una concentración de 12,5 μ M de C646 en una muestra de médula sana (**figura 4.45 A**). Este mismo ensayo se repitió con concentraciones más altas del inhibidor (25 y 50 μ M) en otra muestra medular sana que presentaba mayor celularidad (**figura 4.45 B**), no obteniéndose de nuevo ningún descenso apreciable en la viabilidad. En el gráfico se muestra solamente el tiempo de 48h para evitar redundancia, ya que,

si no hay efecto apreciable a las 48h de tratamiento es porque tampoco lo hay a las 12 ni a las 24h.

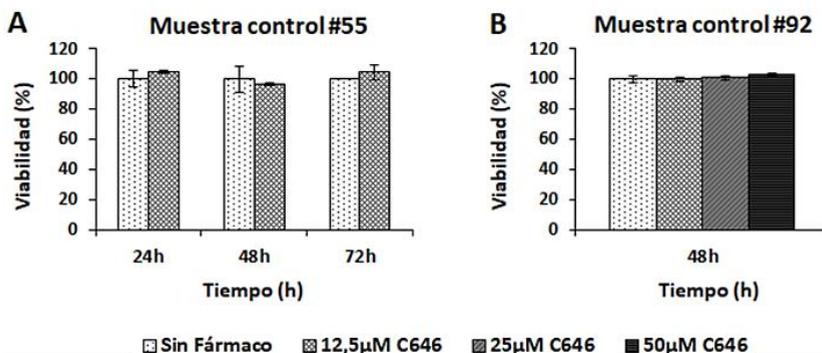


Figura 4.45 Efecto del tratamiento con el inhibidor químico C646 en la viabilidad de muestras celulares mieloides de médula ósea de donantes del grupo control. A) Efecto en la médula ósea del donante #55 tras 24, 48 y 72h de exposición a una concentración de 12,5 μM de C646. B) Efecto en la médula ósea del donante #92 tras 48h de exposición a diferentes concentraciones de C646 (12,5, 25 y 50 μM).

4.3.2.2. Estudios de viabilidad en muestras de pacientes de LMC sometidas a tratamiento con C646 y/o Imatinib

En las muestras de pacientes de leucemia mieloide crónica se procedió del mismo modo que en el caso de los donantes del grupo control. Las muestras se trataron también con el inhibidor C646, así como con el inhibidor de BCR-ABL, Imatinib, para posteriormente, ser tratadas con ambos fármacos de manera simultánea. De las 4 muestras disponibles de pacientes de LMC, sólo pudieron incluirse en este análisis dos de ellas (dos muestras de médula ósea). De estas dos muestras, una de ellas fue tratada sólo con concentraciones bajas de C646 (12,5 μM) e Imatinib (250nM), así como su combinación, pero pudo tratarse hasta 72h. La segunda de las muestras tenía un número de células suficiente como para testar las tres concentraciones de

C646 y las dos concentraciones de Imatinib que se usarían en combinación con C646, así como las combinaciones de estas dos drogas, pero sólo durante tres tiempos de exposición. En consecuencia, se trató hasta las 48h con las diferentes concentraciones de cada fármaco y sus combinaciones y se eliminó el tiempo de 72h, ya que, si existía efecto, este ya sería visible a las 24 y a las 48h.

Tras realizar los experimentos de viabilidad celular con el inhibidor C646, se observaron unos resultados llamativos. En ambas muestras se vio una disminución en el número de células vivas tras el tratamiento con la droga, a diferencia de lo observado para el grupo control. Además, este efecto se incrementaba al aumentar el tiempo de exposición al fármaco o la concentración de éste, obteniéndose valores de reducción de la viabilidad estadísticamente significativos en ambos casos (**figura 4.46**).

Cabe destacar que el efecto a las 12h era muy leve y difícil de apreciar, sin embargo, a las 24h éste ya era apreciable en las dos muestras: En el caso de la primera muestra (#92), cuando se aplicó la concentración baja de C646 (12,5 μ M) tras 24h, se obtuvo un descenso medio en la viabilidad relativa de un 6% (viab = 94%,) respecto a la muestra no tratada (viab = 100%). Estos porcentajes de reducción de viabilidad se veían aumentados con el tiempo, de modo que a las 48h este valor era de un 26,2% de reducción (viab = 73,78%), y a las 72h, de un 40,3% (viab = 59,7%).

Para la segunda muestra (#735), se pudieron probar las tres concentraciones de inhibidor como se ha comentado. Los valores de reducción en el porcentaje de células vivas a las 24h fueron de un 11,3% para la concentración baja de C646 (viab = 88,7%), del 36,37% con la concentración media (viab = 63,63%), y del 40,34% (viab =

59,65%) con la concentración alta. Esta muestra fue muy sensible al hecho de estar en cultivo y al tratamiento, por lo que los efectos a las 48h no eran ya fiables (**figura 4.46**).

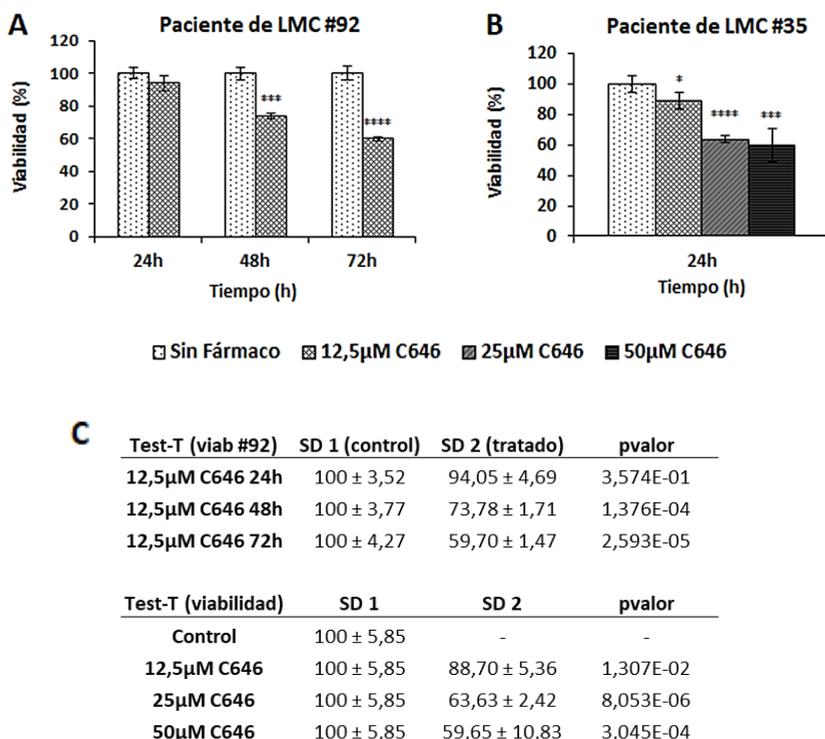


Figura 4.46 Efecto del tratamiento con el inhibidor químico C646 en la viabilidad de muestras celulares mieloides de pacientes de LMC. A) Efecto en la muestra de médula ósea del paciente #92 tras 24, 48 y 72h de exposición a una concentración de 12,5µM de C646. B) Efecto en la médula ósea del paciente #35 tras 24h de exposición a diferentes concentraciones de C646 (12,5, 25 y 50µM). C) Análisis estadístico de los resultados.

Por otra parte, las muestras de los pacientes de LMC se trataron también con imatinib de manera separada, para posteriormente ser tratadas de manera simultánea junto con C646. Se utilizaron en este caso dos concentraciones de imatinib, las

concentraciones baja y media (250nM y 500nM respectivamente), ya que estas son las que serían usadas posteriormente en el tratamiento combinado con C646. Los efectos del tratamiento con imatinib fueron los ya esperados, ya que se trata de la terapia efectiva y usada en la práctica clínica para el manejo de los pacientes de LMC. Así, la reducción en la viabilidad era más acentuada conforme se incrementaba la concentración de fármaco y el tiempo de exposición a éste.

En consecuencia, el tratamiento con ambas drogas se realizó sólo a las 24h para evitar una excesiva muerte celular, siendo el descenso medio en la viabilidad para ambas muestras cuando se usó la concentración más baja (250nM) de imatinib de un 15,4% (viab = 84,60); En la muestra del paciente #735, cuando se usó la concentración media (500nM), éste valor fue de un 22,88% (viab = 77,11%).

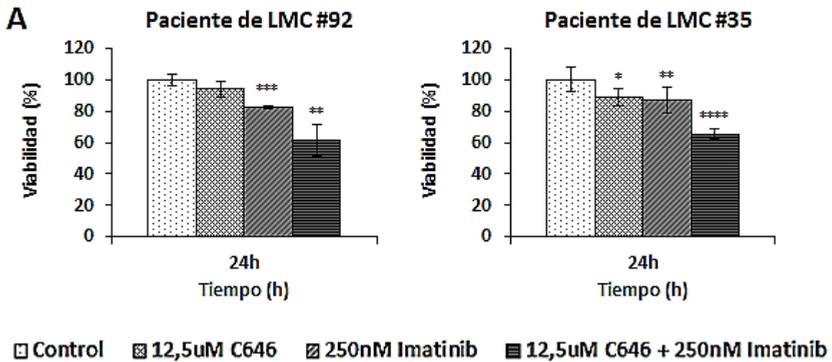
La comparación entre el efecto causado por ambas drogas individualmente dependerá lógicamente de las concentraciones utilizadas de cada una de ellas. Con todo, observamos que a concentraciones bajas de ambos, el imatinib se asoció a una mayor reducción en la viabilidad celular que el C646. Sin embargo, estos resultados se invierten cuando aumentamos las dosis de ambos fármacos, obteniéndose valores de reducción de viabilidad mayores con C646 que con imatinib cuando se usaron las concentraciones medias de cada compuesto.

Por último, se realizaron experimentos de viabilidad en los que las muestras celulares de los pacientes de LMC fueron tratadas de manera simultánea con ambas drogas. Las combinaciones fueron siempre de la concentración más baja de un fármaco con la concentración más baja del otro, o del mismo modo, pero con las

concentraciones medias, y se observó a las 24h. Sin embargo, para los experimentos en los que se combinaban ambos fármacos, C646 e imatinib, no se usaron nunca las concentraciones más altas de estos (50 μ M de C646 y 1000nM de imatinib). El motivo es que estas concentraciones, incluso de modo independiente, eran demasiado nocivas para las ya muy sensibles muestras celulares en cultivo, por lo que, si además se añadían en combinación, el resultado sería muy letal para las células como para poder medir el efecto de este tratamiento.

Los datos obtenidos para los experimentos de viabilidad con combinación de C646 e imatinib en las muestras celulares de los pacientes de LMC fueron interesantes, y es que la combinación de ambas drogas daba por resultado una reducción de la viabilidad mayor que la resultante de aplicar ambos tratamientos por separado (por lo que se observó en pacientes el mismo efecto observado ya anteriormente en líneas celulares); obteniéndose valores estadísticamente significativos (p valor $< 0,05$) en ambos casos (**figura 4.47**).

El análisis de los datos dio como resultado que la viabilidad media para ambas muestras se redujo un 36,59% cuando se combinaron las concentraciones bajas de ambos fármacos (12,5 μ M de C646, 250nM de imatinib) tras 24h de exposición (viab = 63,41%), lo que supone un 27,95% menos de viabilidad respecto al efecto medio causado exclusivamente por la misma concentración de C646 en ambas muestras, y un 22,04% menos de viabilidad cuando comparamos con el efecto causado únicamente por imatinib en ambas muestras. El efecto combinado con las concentraciones medias de ambos fármacos no pudo medirse adecuadamente mediante viabilidad.



B

Test-T (viab #92)	SD 1 (control)	SD 2 (tratado)	pvalor
Sin fármaco	100 ± 3,52	-	-
12,5µM C646	100 ± 3,52	94,02 ± 4,85	2,761E-01
250nM Imatinib	100 ± 3,39	82,40 ± 1,09	2,751E-04
12,5µM C646 + 250nM Imatinib	100 ± 3,52	61,41 ± 10,22	2,646E-03

Test-T (viab #92)	SD 1 (fármaco individual)	SD 2 (combinación)	pvalor
12,5µM C646	94,02 ± 4,85	61,41 ± 10,22	6,030E-03
250nM Imatinib	82,40 ± 1,09	61,41 ± 10,22	3,219E-02

Test-T (viab #35)	SD 1 (control)	SD 2 (tratado)	pvalor
Sin fármaco	100 ± 5,85	-	-
12,5µM C646	100 ± 5,85	88,70 ± 5,36	1,31E-02
250nM Imatinib	100 ± 7,81	86,79 ± 8,41	2,901E-03
12,5µM C646 + 250nM Imatinib	100 ± 5,85	59,65 ± 10,83	1,358E-05

Test-T (viab #35)	SD 1 (fármaco individual)	SD 2 (combinación)	pvalor
12,5µM C646	88,70 ± 5,36	59,65 ± 10,83	8,971E-05
250nM Imatinib	86,79 ± 8,41	59,65 ± 10,83	8,90E-02

Figura 4.47 A) Efecto en la viabilidad de las muestras celulares mieloides de médula ósea de los pacientes de LMC #92 y #35 tras el tratamiento durante 24h de forma separada con el inhibidor químico C646 (12,5µM) y con Imatinib (250nM) respectivamente; así como efecto del tratamiento también durante 24h con ambos fármacos de forma conjunta (en negro). B) Análisis estadístico de los resultados obtenidos.

4.3.2.3. Estudios de viabilidad en muestras celulares de sangre periférica y médula ósea de pacientes con NMPs cromosoma Filadelfia negativos

De igual modo, todas las muestras se trataron con tres concentraciones de C646 y a los tiempos de 12, 24 y 48h, llegando hasta las 72h en algún caso. Tal y como se observó en los pacientes de LMC, el tiempo de exposición de 12h tiene poca relevancia en este estudio, ya que los resultados son poco apreciables y no comparables con los estudios de apoptosis. Por otra parte, a las 48h las muestras estaban en avanzado estado de muerte celular y era difícil cuantificar con exactitud el efecto del fármaco, por lo que nos centramos en el efecto a las 24h, que pudo ser determinado con claridad.

En el caso de estos pacientes no se usó ningún otro fármaco aparte de C646, ya que las terapias convencionales empleadas en estos pacientes en práctica clínica (hidroxiurea y ruxolitinib) tienen tiempos de acción muy diferentes a C646, tal y como se describe en el **apartado 4.3.2** de *RESULTADOS*. En dichos experimentos se observó que el efecto de dichas drogas, al menos con las concentraciones utilizadas, comenzaba a ser notorio a partir de las 48h, por lo que no sería razonable realizar dichos experimentos en muestras celulares de pacientes debido a la dificultad de dichas muestras de permanecer intactas en cultivo durante 48h. Además, el objetivo sería combinar el efecto con C646, especialmente dañino para las muestras de pacientes a las 48h de exposición. Así pues, sólo se estudió el efecto de exposición a C646 en las muestras celulares de los pacientes de NMPs Filadelfia negativos.

De las 10 muestras que pudieron ser analizadas mediante experimentos de viabilidad, seis de ellas, mostraron algún efecto en el porcentaje de células vivas tras la exposición a la droga. Sin embargo,

en una de esas 6 el efecto del fármaco no pudo cuantificarse. En cuanto a las otras 5, la reducción media de la viabilidad fue del 13,19% con la concentración baja de C646 (viabilidad = 86,81%). La concentración media de C646 produjo una reducción media de la viabilidad del 25,1% (viabilidad = 74,90%); Por último, cuando se usó la concentración alta del fármaco, con tres de las cuatro muestras, esta reducción se incrementó hasta el 42,66% (viabilidad = 57,34%). Un ejemplo de lo descrito anteriormente puede observarse con mayor claridad en la **figura 4.48**.

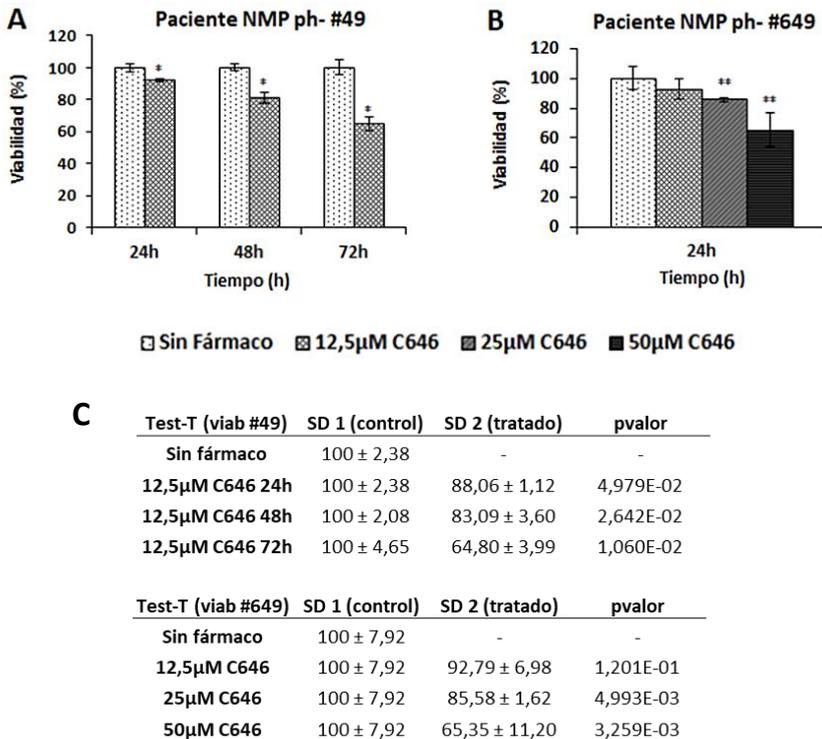


Figura 4.48 Efecto del tratamiento con el inhibidor químico C646 en la viabilidad de muestras celulares mieloides de pacientes con NMP cromosoma Filadelfia negativas. A) Efecto en la muestra medular del paciente #49 tras 24, 48 y 72h de exposición a una concentración 12,5μM de C646. B) Efecto en la médula ósea del paciente #49 tras 24h de exposición a diferentes concentraciones de C646 (12,5, 25 y 50μM).

En la **figura 4.49**, se muestra un resumen de los resultados de los experimentos con C646. Así, el efecto del tratamiento con 12,5 μ M de C646 durante 24, 48 y 72h en tres muestras representativas de un control, un paciente con LMC y un paciente con NMP Filadelfia negativa respectivamente, aparece en la **figura A**. En la **figura B** se muestran los resultados del tratamiento durante 24h con las tres concentraciones del inhibidor en tres muestras representativas de cada uno de los grupos de individuos.

Por último, se muestran varias tablas con los resultados de los experimentos de viabilidad en los tres grupos de pacientes. Los valores indican los porcentajes de viabilidad tras cada uno de los tratamientos durante 24h, respecto a la misma muestra sin tratar a las 24h (100% de viabilidad). Se incluye también una pequeña tabla con los ejemplos comentados de pacientes tratados hasta 72h con una concentración 12,5 μ M de C646.

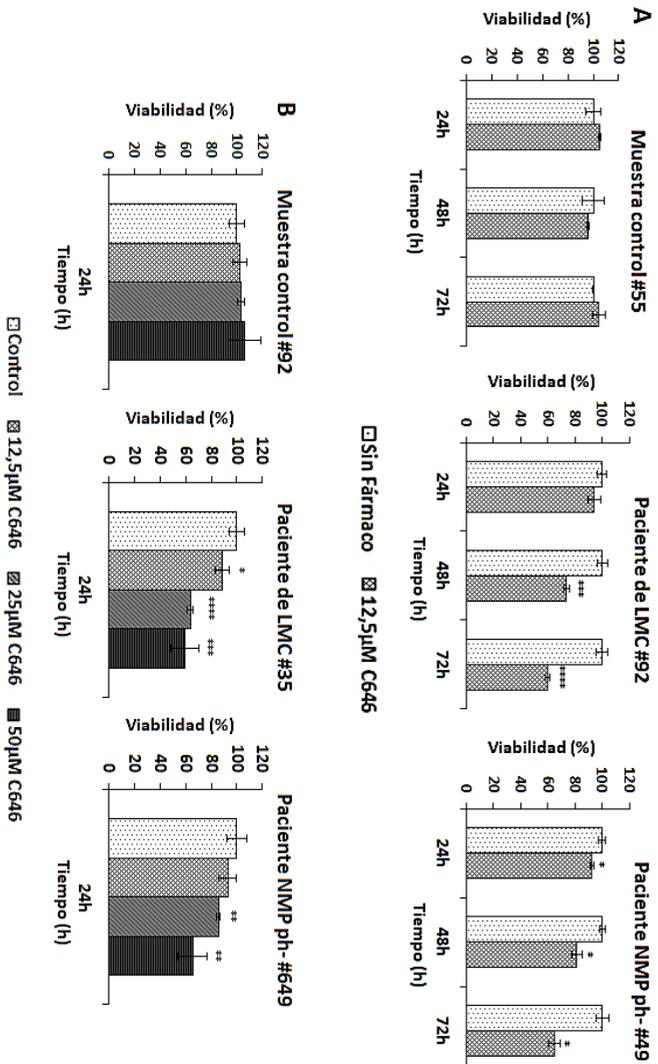


Figura 4.49 A) Efecto en la viabilidad en tres muestras celulares representativas de los tres grupos de individuos tras el tratamiento durante 24, 48 y 72h con una concentración 12,5µM del inhibidor químico C646. B) Efecto en la viabilidad tras el tratamiento durante 24h con tres concentraciones diferentes de C646 (12,5, 25 y 50µM) en otras tres muestras celulares representativas de los tres grupos de individuos.

Tabla 4.13. Resultados de viabilidad en las muestras de pacientes de LMC

Pacientes LMC #paciente	C646 24h		Imatinib 24h		C646 + Imatinib 24h	
	12,5µM	25µM	50µM	500nM	12,5µM C646 + 250mM IM	
#92	94,02	-	82,4	77,1	61,41	
#735	88,70	63,63	86,79	79,21	65,41	
Muestras afectadas	2/2 (100%)	1/1 (100%)	2/2 (100%)	2/2 (100%)	2/2 (100%)	
Media del efecto	91,36	63,63	84,60	78,16	63,41	

Tabla 4.15. Ejemplos de tratamiento durante 72h con 12,5µM de C646 en los tres casos estudiados

#paciente	12,5µM C646 24h	12,5µM C646 48h	12,5µM C646 72h
#55 (control)	104,69	97,19	104,34
#92 (LMC)	94,05	73,78	59,7
#449 (ph-)	88,06	83,09	64,8

Tabla 4.12. Resultados de viabilidad en las muestras del grupo control

Grupo control # paciente	Viabilidad C646 24h		
	12,5µM	25µM	50µM
#55	104,69	-	-
#57	105,40	102,47	-
#59	99,06	101,62	-
#92	102,19	103,22	106,17
#09	101,86	100,23	107,39
Muestras afectadas	0/5 (0%)	0/4 (0%)	0/2 (0%)

Tabla 4.14. Resultados de viabilidad en las muestras de NMPs ph-

Pacientes NMPs ph- # paciente	Viabilidad C646 24h		
	12,5µM	25µM	50µM
#449	92,26	-	-
#649	93,26	85,58	65,35
#365	103,73	107,27	-
#713	77,05	62,95	51,54
#83	84,15	70,12	55,14
#42	103,48	101,25	104,39
#73	87,35	80,96	-
#84	103,80	-	-
#13	104,85	-	-
#97	91,61	-	62,68
Muestras afectadas	6/10 (60%)	4/6 (66,66%)	4/5 (80%)
Intervalo de efecto	93,26 - 77,05	85,58 - 62,95	65,35 - 51,54
Media del efecto	86,81	74,90	57,34

4.3.3. Estudios de apoptosis por citometría de flujo en muestras celulares de sangre periférica y médula ósea de donantes del grupo control y pacientes de NMPs, sometidas a tratamiento con C646, imatinib o la combinación de ambos

Una vez confirmado el efecto de C646 sólo o en combinación con imatinib mediante la técnica de viabilidad, y tras observar que el tiempo de tratamiento más adecuado para el estudio de las muestras procedentes de pacientes es 24h, se procedió a realizar los estudios de apoptosis mediante citometría de flujo. Así pues, dichos estudios se realizaron siempre a las 24h de tratamiento utilizando entre 50.000 y 100.000 células por cada condición, según la cantidad de muestra disponible. Todos los experimentos se realizaron en triplicado, o en duplicado en caso de no disponer de muestra suficiente. Se usaron los anticuerpos Anexina V, Yoduro de propicio, y anti-CD45, estos últimos para identificar bien la población de células mieloides. En algunos casos en los que la identificación era un poco más complicada, se usaron otros anticuerpos frente a CD13, CD11b y CD14 para identificar los neutrófilos y sus precursores, CD33 y CD13 para los monocitos, y CD34 para identificar los blastos.

4.3.3.1. Estudios de apoptosis en muestras del grupo control sometidas a tratamiento con C646

Se analizaron 11 muestras de donantes sanos, de las cuales 6 eran de médula ósea, y 5, de sangre periférica. Todas las muestras pudieron ser analizadas de modo fiable mediante estudios de apoptosis por citometría de flujo. Además, 5 muestras ya habían sido analizadas anteriormente mediante viabilidad, obteniéndose

exactamente los mismos resultados por ambas técnicas, lo que da mayor validez al estudio.

Todas las muestras fueron evaluadas a las 24h de tratamiento con 12,5 μ M de C646. Tras el análisis de los resultados obtenidos se pudo confirmar que ninguna de las 11 muestras mostró una reducción significativa en el porcentaje de células vivas ni un aumento en el porcentaje de células apoptóticas y/o necróticas.

Además, debido a que en algunos casos se disponía de una mayor abundancia de muestra, 5 de las muestras fueron analizadas también tras exposiciones de 24h con 25 μ M de C646, y tres de ellas con concentraciones de 50 μ M del inhibidor. De nuevo, los resultados obtenidos mostraron que ninguna muestra de donante sano mostró una reducción significativa en el número de células vivas ni un aumento en el número de células apoptóticas y/o necróticas tras 24h de exposición con las concentraciones utilizadas.

En la **figura 4.50 A**, se puede observar un caso representativo de los gráficos obtenidos tras realizar los ensayos de apoptosis por citometría de flujo en uno de los donantes control. Tal y como se detalló en el *apartado 2* del bloque de *RESULTADOS*, los cuadrantes representan, por orden, de izquierda a derecha y de abajo a arriba, los porcentajes de células vivas, células en apoptosis temprana, apoptosis tardía y necrosis, respectivamente. El análisis de los resultados mostró claramente que no existe efecto alguno del fármaco C646 sobre las células de dicho donante para ninguna de las tres concentraciones utilizadas.

Por otra parte, en la **figura 4.50 B** se observa la cuantificación de dichos resultados mostrados en el apartado **A**.

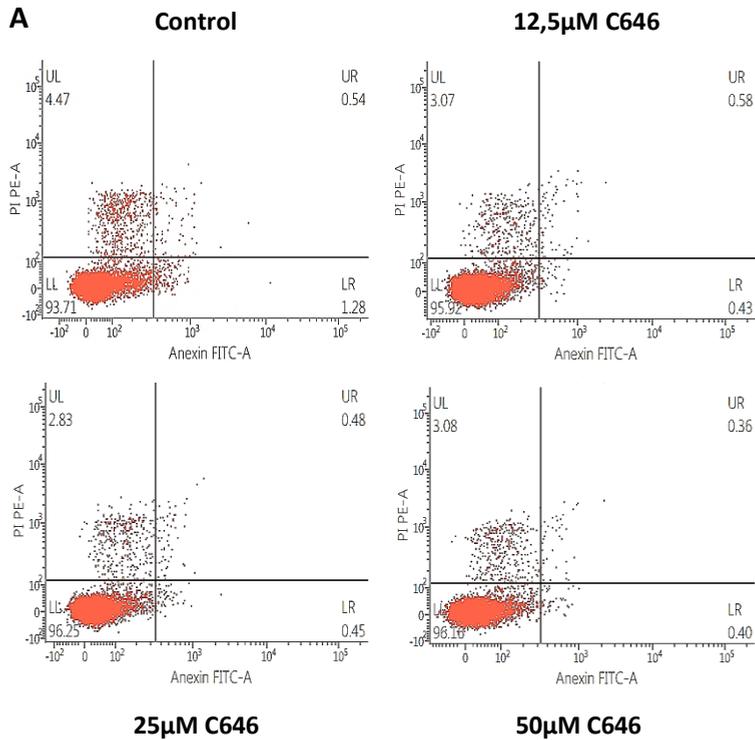
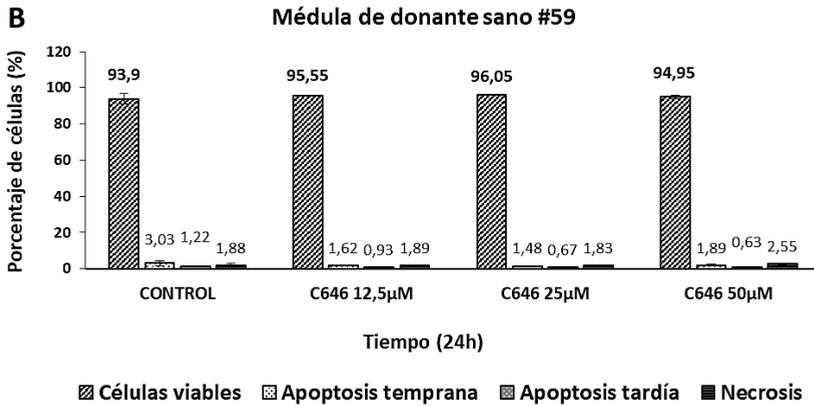


Figura 4.50 A) Gráficos obtenidos mediante citometría de flujo tras realizar estudios de apoptosis con Anexina V/Yoduro de propidio en muestras celulares de médula ósea de un donante sano. Los gráficos muestran, de izquierda a derecha y de abajo a arriba, los porcentajes de células viables, células en apoptosis temprana, apoptosis tardía y necrosis tras 24h de exposición a diferentes concentraciones de C646.



Test-T (control-tratamiento)	SD control	SD tratamiento	p-valor
Control	93,9 ± 2,8	-	-
12,5µM C646	93,9 ± 2,8	95,5 ± 0,25	0,3668
25µM C646	93,9 ± 2,8	96,05 ± 0,35	0,2574
50µM C646	93,9 ± 2,8	94,95 ± 1,05	0,5759

Continuación figura 4.50 B) Cuantificación de los porcentajes obtenidos en el apartado A y análisis estadístico de los resultados.

Se observó una muestra medular (donante #09) que mostraba un resultado diferente al resto de muestras de donantes control, y similar al observado en alguna de las muestras de pacientes, tal y como se verá más adelante. En dicha muestra, el análisis de la apoptosis por citometría de flujo mostró que a concentraciones bajas de C646 (12,5µM), el porcentaje de células vivas era casi un 15% mayor que en el control; a concentraciones un poco más altas de C646 (25µM), el porcentaje de células vivas se reducía, aunque seguía siendo mayor que en el control (un 4% mayor); por último a concentraciones altas de C646 (50µM), el porcentaje de células vivas volvía a reducirse, siendo en este caso por primera vez menor que en el control, aunque tan solo un 2,5% menor, siendo esta diferencia con el control no significativa estadísticamente. Sin embargo, la reducción en el

porcentaje de células vivas al pasar de una concentración de C646 a otra mayor sí que fue estadísticamente significativa en cada caso.

En este donante se observó un aumento del porcentaje de células vivas a concentraciones bajas y medias de C646. Sin embargo, conforme se aumentaba progresivamente la concentración del inhibidor, la viabilidad se iba reduciendo hasta llegar a ser menor que en el control cuando se utilizó la concentración más alta del fármaco. Por todo ello, aunque no se puede afirmar que en ningún momento el efecto de usar C646 causa una reducción en el número de células vivas y/o aumento de la apoptosis respecto al control, ya que esta diferencia no fue significativa, sí que se puede afirmar que existe un efecto al usar las diferentes concentraciones del inhibidor, siendo el único caso de un donante sano de 11 analizados en el que se producen cambios estadísticamente significativos al usar diferentes concentraciones de inhibidor tras 24h de exposición.

En la **figura 4.51** se muestran los gráficos de citometría de flujo en los que se observa este proceso a parte de la cuantificación de los porcentajes obtenidos.

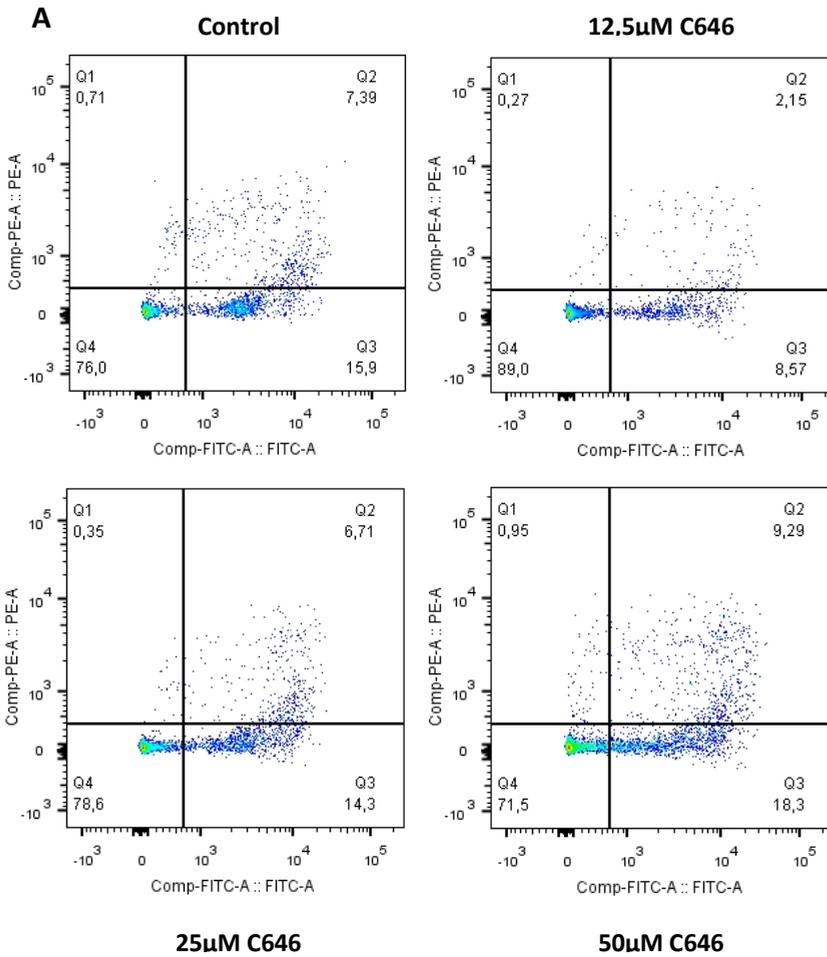
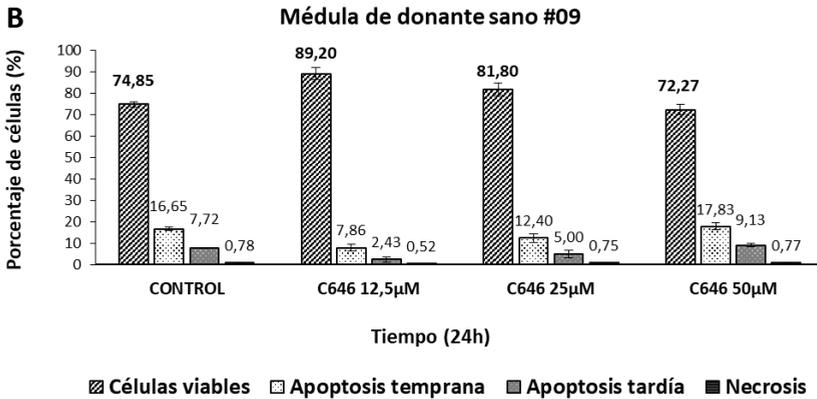


Figura 4.51 A) Gráficos obtenidos mediante estudios de apoptosis por citometría de flujo con Anexina V/Yoduro de propidio en muestras celulares de médula del donante sano #09. Los gráficos muestran, de izquierda a derecha y de abajo a arriba, los porcentajes de células viables, células en apoptosis temprana, apoptosis tardía y necrosis tras 24h de exposición a diferentes concentraciones de C646 (12,5, 25 y 50µM) en relación con la muestra sin tratar (control).



Test-T (control-tratamiento)	SD 1	SD 2	pvalor
Control	74,85 ± 1,15	-	-
12,5µM C646	74,85 ± 1,15	89,2 ± 2,605	0,0009 ***
25µM C646	74,85 ± 1,15	81,8 ± 3,2	0,0240 *
50µM C646	74,85 ± 1,15	72,27 ± 2,442	0,1727

Test-T (entre tratamientos)	SD 1	SD 2	pvalor
Control-12,5µM C646	74,85 ± 1,15	89,2 ± 2,605	0,0009 ***
12,5µM-25µM C646	89,2 ± 2,605	81,8 ± 3,2	0,0360 *
25µM-50µM C646	81,8 ± 3,2	72,27 ± 2,442	0,0148 *

Figura 4.51 B) Cuantificación de los porcentajes obtenidos en el apartado anterior y análisis estadístico de los resultados.

Como resumen de este apartado, se puede concluir que en ninguno de los 11 casos se observó un descenso en el porcentaje de células vivas tras el tratamiento con el inhibidor C646 con ninguna de las concentraciones utilizadas en comparación con la muestra sin tratar. Del mismo modo tampoco se observó ningún aumento en la apoptosis tras 24h de tratamiento con C646 para ninguna de las concentraciones utilizadas. Además, no se observaron diferencias significativas en los niveles de apoptosis entre los distintos tratamientos, con una sola excepción, el paciente #09, descrito

anteriormente. Así pues, es posible afirmar que no se produce una reducción en el porcentaje de células vivas tras tratamiento con C646 en muestras de controles sin patología mieloide con las concentraciones de 12,5 μM , 25 μM y 50 μM y tras 24h de tratamiento.

4.3.3.2. Estudios de apoptosis en muestras de pacientes de leucemia mieloide crónica (LMC) sometidas a tratamiento con C646 y/o imatinib

Para el caso de las muestras de pacientes con LMC, se procedió del mismo modo que en el caso de los donantes del grupo control. Las cuatro muestras disponibles, correspondientes a los tres individuos citados anteriormente fueron analizadas mediante éste método. Para el individuo del que se disponían ambos tipos de muestra (medular y sanguínea), se realizaron todos los experimentos y análisis usándose ambas muestras como si se trataran de muestras independientes, de modo que se pudo comprobar que los resultados eran similares en ambas porciones celulares, aunque los efectos observados eran más acusados en la muestra medular que en la de sangre periférica.

En cuanto al tratamiento con C646, las muestras se analizaron mediante experimentos de apoptosis por citometría de flujo tras 24h de exposición al fármaco y con al menos la concentración más baja de este (12,5 μM). En aquellos casos en los que la muestra fue abundante, se probaron también las concentraciones de 25 y 50 μM .

Por otra parte, de igual modo que para los ensayos de viabilidad, las muestras de sangre periférica y médula ósea de pacientes de LMC se trataron también con el inhibidor de BCR-ABL imatinib en ausencia de C646, para posteriormente, ser tratadas

simultáneamente con ambos fármacos. Así pues, el tratamiento con imatinib siguió el mismo patrón que el descrito para C646. Los experimentos se volvieron a realizar tras 24h de tratamiento con al menos la concentración baja de imatinib (250nM), y si la muestra era suficiente, también con las concentraciones media y alta del fármaco (500 y 1000nM).

Por último, se probó a tratar las muestras celulares de los pacientes de LMC con la combinación de ambos fármacos. Los experimentos de apoptosis se realizaron de nuevo tras 24h y con al menos la combinación de concentraciones bajas de ambos fármacos. Cuando fue posible, se probó también con la combinación de las concentraciones medias de ambos fármacos. No se usaron las concentraciones altas de los fármacos para evitar la excesiva toxicidad.

A continuación, se desglosará el análisis de los resultados en diferentes sub-apartados para que sea más fácil su interpretación. Tan sólo se comentarán los cambios en el porcentaje de células vivas, lo que permite la comparación de esta técnica con la técnica de la viabilidad celular (comentada más adelante), ya que el aumento en los porcentajes de células en apoptosis y necrosis va acompañado, lógicamente, de la disminución del porcentaje de células vivas.

1- Tratamiento con C646:

Los experimentos de apoptosis en las muestras celulares de los pacientes de LMC expuestas al tratamiento con C646 mostraron unos resultados muy similares a los ya observados en los estudios de viabilidad. Concretamente, las 4 muestras sufrieron un efecto en los porcentajes de células vivas y apoptóticas cuando se sometieron al

tratamiento con la concentración más baja de C646 (12,5 μ M). Teniendo en cuenta que dos de las muestras eran del mismo individuo, esto significa que los 3 pacientes mostraron efecto al tratamiento con dicha concentración de C646 (100%). Este efecto fue ligero, lo cual es normal teniendo en cuenta que la concentración usada del inhibidor es muy baja y que las células tienen que entrar en apoptosis para que dicho efecto pueda ser detectado. No obstante, el efecto observado fue constante en cada una de las repeticiones del ensayo. Concretamente, la reducción media en el porcentaje de células vivas tras el tratamiento durante 24h con una concentración de 12,5 μ M de C646 fue del 13,88% (%células vivas = 86,12%). A continuación, se analizó también el efecto al usar la concentración media de la droga, dando como resultado un efecto apoptótico en el 100% de las muestras analizadas. Al tratarse de muestras de individuos distintos, lógicamente los efectos fueron muy dispares entre ellas, obteniéndose porcentajes de reducción de células vivas notablemente diferentes dependiendo de la muestra analizada. Con todo esto, la reducción media observada al usar la concentración de 25 μ M de C646 fue de un 26,38% (% células vivas = 73,62%). Por último, se analizó el efecto de usar la concentración más alta del fármaco con las muestras celulares de los pacientes. Esto pudo realizarse sólo en tres de las cuatro muestras (dos individuos), teniendo efecto en el 100% de ellas y siendo este una reducción media en el porcentaje de células vivas de un 34,67% (% células vivas = 65,33%).

En la **figura 4.52** se pueden apreciar de forma resumida estos resultados con el ejemplo de un paciente con LMC del que se muestran las gráficas de citometría de flujo (**A**) obtenidas tras el tratamiento durante 24h con C646. En verde se indican el descenso en el porcentaje de células vivas tras los tratamientos. Por otra parte, en la

figura 4.52 B, se muestra la cuantificación y el análisis estadístico de dichos resultados.

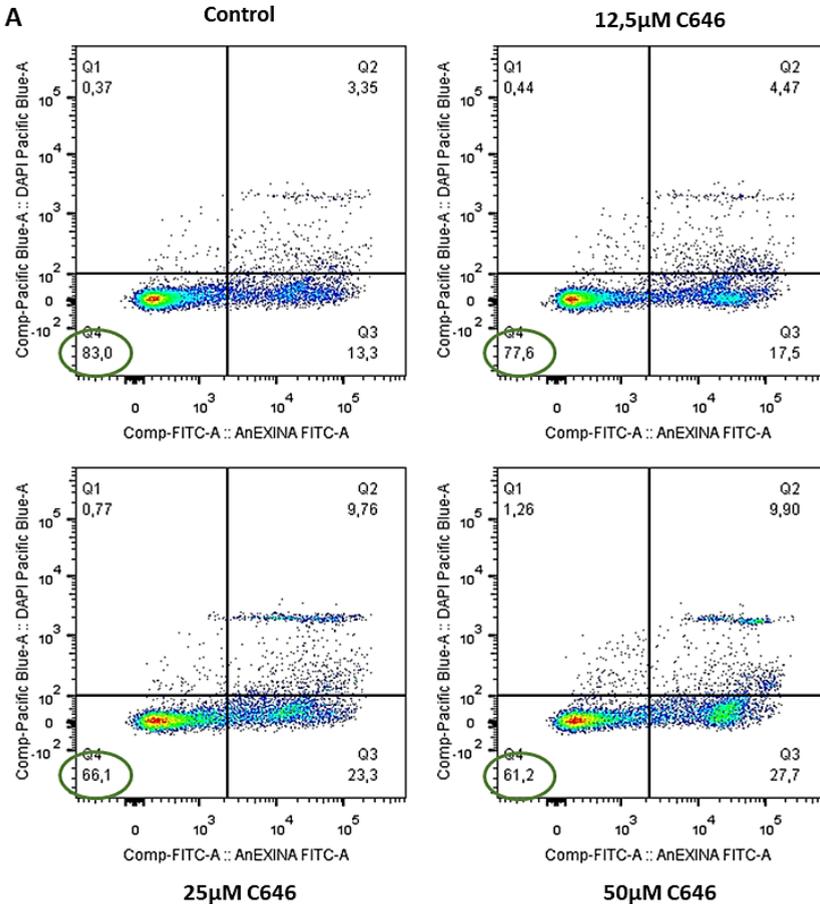
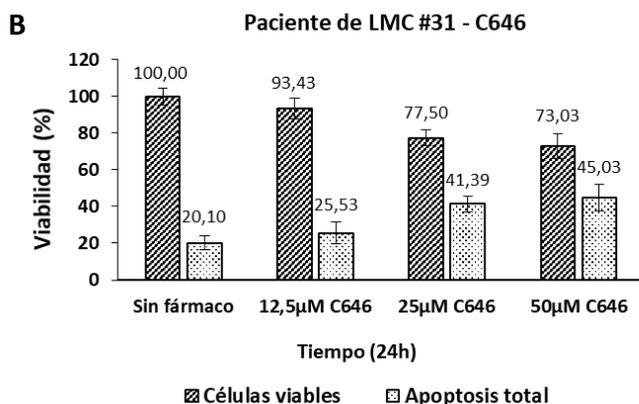


Figura 4.52 A) Gráficos obtenidos mediante estudios de apoptosis por citometría de flujo con Anexina V/Yoduro de propidio en muestras celulares de sangre periférica de un individuo con LMC (#31). Los gráficos muestran, de izquierda a derecha y de abajo a arriba, los porcentajes de células viables, células en apoptosis temprana, apoptosis tardía y necrosis tras 24h de exposición a diferentes concentraciones de C646 (12,5, 25 y 50µM) en relación con la muestra sin tratar (control).



Test-T (células vivas)	SD 1	SD 2	pvalor
Control	100 ± 4,50	-	-
12,5μM C646	100 ± 4,50	93,43 ± 5,74	4,33E-02
25μM C646	100 ± 4,50	77,50 ± 4,45	1,14E-04
50μM C646	100 ± 4,50	73,03 ± 6,82	1,13E-04

Test-T (apoptosis total)	SD 1	SD 2	Pvalor
Control	20,10 ± 3,8	-	-
12,5μM C646	20,10 ± 3,8	25,53 ± 5,89	1,36E-01
25μM C646	20,10 ± 3,8	41,39 ± 4,25	3,22E-04
50μM C646	20,10 ± 3,8	45,03 ± 7,26	1,38E-04

Continuación figura 4.52 B) Cuantificación de los resultados mostrados en el apartado A y análisis estadístico.

2- Tratamiento con imatinib:

En cuanto al tratamiento con imatinib, los efectos fueron de nuevo los esperados. Se observó un claro efecto en la apoptosis de las muestras celulares procedentes de los pacientes que se veía incrementado con el aumento en la concentración del fármaco. Un ejemplo de ensayo de apoptosis tras el tratamiento con Imatinib puede ser observado en la **figura 4.53**.

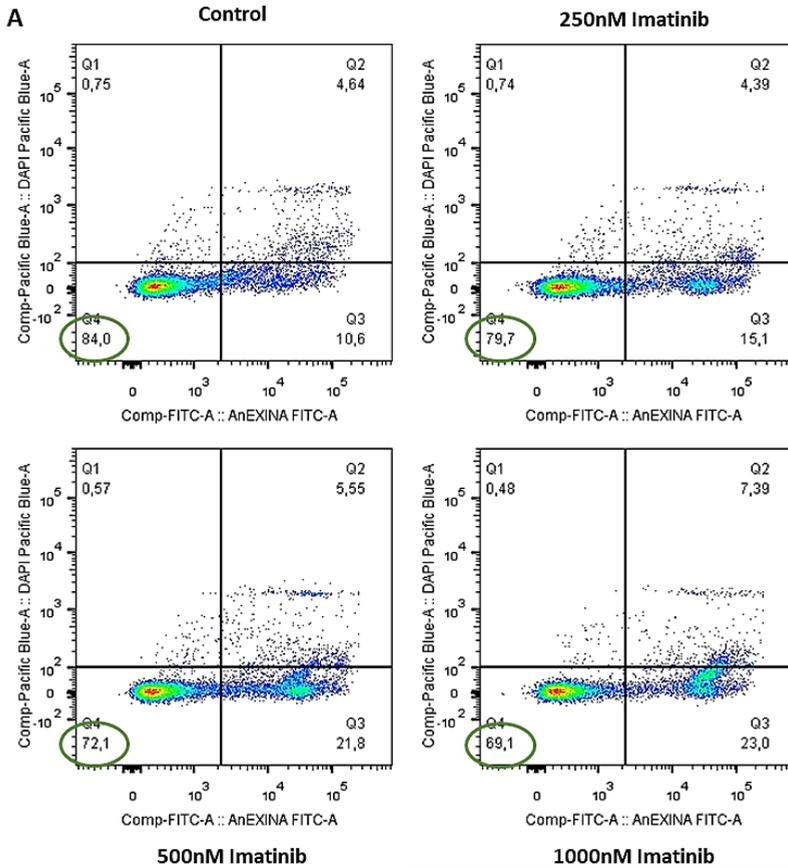
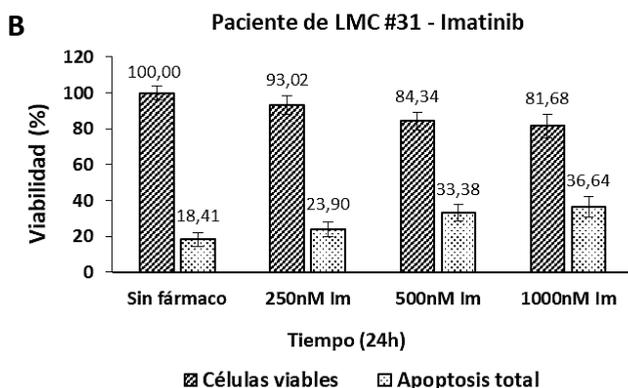


Figura 4.53 A) Gráficos obtenidos mediante estudios de apoptosis por citometría de flujo con Anexina V/Yoduro de propidio en muestras celulares de sangre periférica de un individuo con LMC (#31). Los gráficos muestran, de izquierda a derecha y de abajo a arriba, los porcentajes de células viables, células en apoptosis temprana, apoptosis tardía y necrosis tras 24h de exposición a diferentes concentraciones de Imatinib (250, 500 y 1000nM) en relación con la muestra sin tratar (control).



Test-T (células vivas)	SD 1	SD 2	pvalor
Control	100 ± 3,85	-	-
250nM Imatinib	100 ± 3,85	93,02 ± 5,16	4,77E-02
500nM Imatinib	100 ± 3,85	84,34 ± 4,83	3,34E-04
1000nM Imatinib	100 ± 3,85	81,68 ± 6,47	3,80E-04

Test-T (apoptosis total)	SD 1	SD 2	Pvalor
Control	18,41 ± 3,94	-	-
250nM Imatinib	18,41 ± 3,94	23,90 ± 4,24	6,70E-02
500nM Imatinib	18,41 ± 3,94	33,38 ± 4,67	5,94E-04
1000nM Imatinib	18,41 ± 3,94	36,64 ± 5,67	3,60E-04

Continuación figura 4.53 B) Cuantificación de los resultados mostrados en el apartado A y análisis estadístico.

Así pues, las muestras de LMC fueron tratadas con imatinib tras 24h de exposición al fármaco y con al menos la concentración baja de éste (250nM). Usándose también las concentraciones media y alta (500nM y 1000nM) en aquellos casos en los que la muestra tenía abundancia suficiente. Tres de las cuatro muestras pudieron tratarse con la concentración baja (250nM) de Imatinib, y las tres respondieron con un descenso en el porcentaje de células vivas, dando como resultado una reducción del 14,63% en el porcentaje de células vivas respecto a la muestra sin tratar. Por otra parte, cuando se usó la concentración media de la droga (500nM), las cuatro muestras

tratadas sufrieron efecto (100% de las muestras), siendo en este caso el porcentaje medio de reducción de células vivas de un 23,23%. En último lugar, tres muestras pudieron tratarse con la concentración alta de la droga (1000nM), obteniéndose un efecto en el 100% de ellas y siendo este de un 35,86% de descenso en el porcentaje medio de células vivas.

Si comparamos el efecto de ambos fármacos por separado en los experimentos de apoptosis, se observa que éste es muy similar, obteniéndose valores de reducción en el porcentaje de células vivas muy similares para ambas drogas.

3- Tratamiento con C646 e imatinib:

Por último, se realizaron ensayos de apoptosis en los que las muestras celulares de los pacientes de LMC fueron tratadas de manera simultánea con ambas drogas, siguiendo el modo de proceder descrito para los estudios de viabilidad. Como se ha comentado, el motivo de no usar concentraciones más altas, es que el daño celular sería muy alto y de ese modo la cuantificación del efecto no sería fiable.

Los datos obtenidos corroboraron los efectos observados mediante los ensayos de viabilidad, y es que la combinación de ambas drogas daba por resultado una reducción en el porcentaje de células vivas mayor que la resultante de aplicar ambos tratamientos por separado. Sin embargo, los resultados no mostraron un mayor efecto al combinar las concentraciones bajas de ambas drogas, tal vez debido a que estas concentraciones no son suficientes como para ver el efecto combinado mediante la técnica de apoptosis. Sin embargo, al combinar ambas drogas en sus concentraciones medias, en 2 de los 3

individuos analizados se detectó un efecto mayor que el efecto mostrado por ambas drogas de manera individual. Así pues, al combinar ambas drogas en sus concentraciones medias, el porcentaje de células vivas disminuyó en un 38,98% (%células vivas = 61,02%), siendo este efecto mayor que el efecto observado sólo con C646 (26,38%) y sólo con Imatinib (23,23%).

En la **figura 4.54** se muestra un ejemplo de ensayo de apoptosis con combinación de ambas drogas en una de las muestras de médula ósea de un paciente con LMC. De acuerdo con el análisis estadístico para dicho paciente, si se compara el efecto combinado de los fármacos respecto al efecto de éstos de manera individual (**figura 4.54 B**), se observa que la combinación de ambas drogas es más efectiva que el tratamiento individual. Sin embargo, debido a la poca celularidad de la muestra, el análisis no ofrece un nivel de significación estadística suficiente al comparar el efecto de la combinación de ambas drogas con el efecto causado únicamente por C646. Por otro lado, sí que se demuestra que la combinación de ambas drogas causa un efecto mayor que el tratamiento con imatinib en monoterapia (p valor céls. vivas = 1,58E-03; p valor céls. Apop = 5,85E-04). De este modo, se confirma que el uso de imatinib en combinación con un inhibidor de p300 causa un mayor efecto apoptótico en células leucémicas que el imatinib en monoterapia.

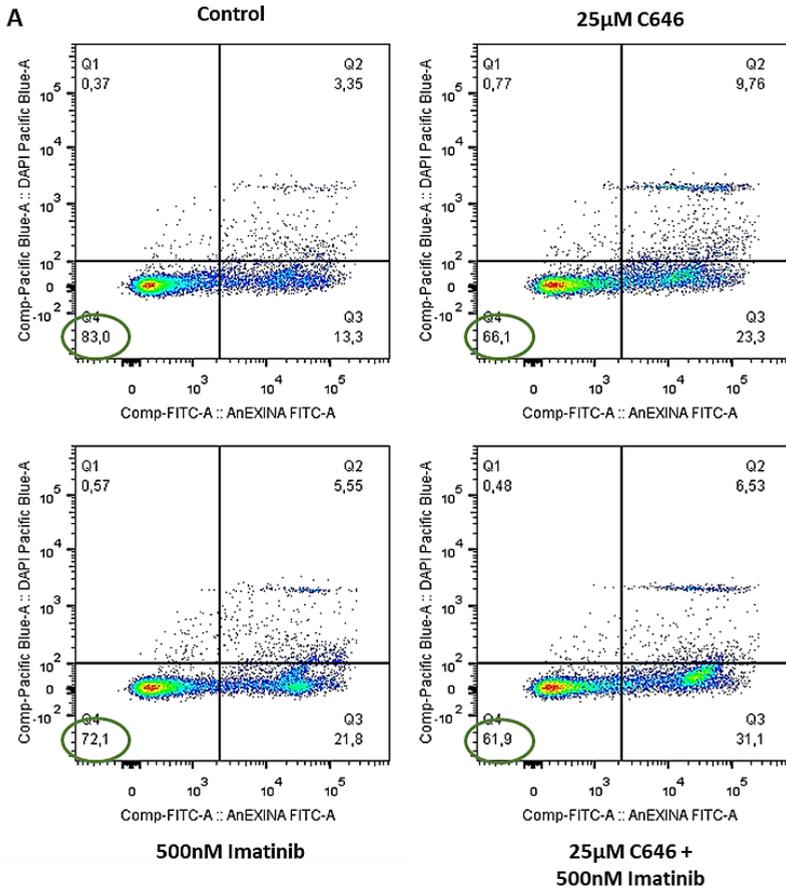
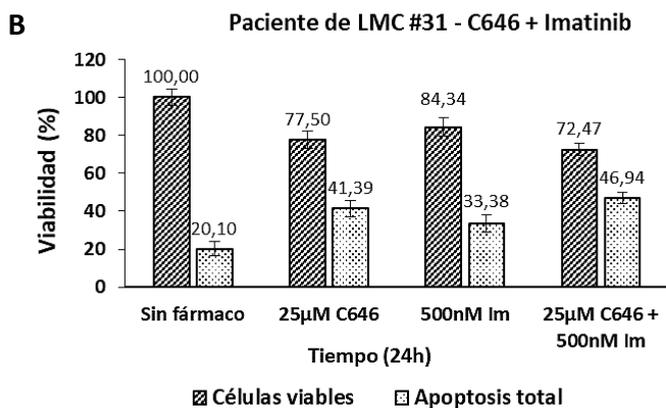


Figura 4.54 A) Gráficos obtenidos mediante estudios de apoptosis por citometría de flujo con Anexina V/Yoduro de propidio en muestras celulares de sangre periférica de un individuo con LMC (#31). Los gráficos muestran, de izquierda a derecha y de abajo a arriba, los porcentajes de células viables, células en apoptosis temprana, apoptosis tardía y necrosis tras 24h de exposición a C646 (25µM), imatinib (500nM) y la combinación de ambos fármacos, en relación con la muestra sin tratar (control).



Test-T (células vivas)	SD 1	SD 2	pvalor
Control	100 ± 4,50	-	-
25µM C646	100 ± 4,50	77,50 ± 4,45	1,14E-04
500nM Imatinib	100 ± 4,50	84,34 ± 4,83	6,35E-04
C646 + Imatinib	100 ± 4,50	72,47 ± 3,03	1,00E-06

Test-T (apoptosis total)	SD 1	SD 2	Pvalor
Control	20,10 ± 3,8	-	-
25µM C646	20,10 ± 3,8	41,39 ± 4,25	3,22E-04
500nM Imatinib	20,10 ± 3,8	33,38 ± 4,67	1,15E-03
C646 + Imatinib	20,10 ± 3,8	46,94 ± 2,95	1,60E-06

Test-T (células vivas) (fármaco-combinación)	SD 1	SD 2	pvalor
C646 + Imatinib	72,47 ± 3,03	-	-
25µM C646	72,47 ± 3,03	77,50 ± 4,45	5,44E-02
500nM Imatinib	72,47 ± 3,03	84,34 ± 4,83	1,58E-03

Test-T (apoptosis total) (fármaco-combinación)	SD 1	SD 2	Pvalor
C646 + Imatinib	46,94 ± 2,95	-	-
25µM C646	46,94 ± 2,95	41,39 ± 4,25	6,91E-02
500nM Imatinib	46,94 ± 2,95	33,38 ± 4,67	5,85E-04

Continuación figura 4.54 B) Cuantificación de los resultados mostrados en el apartado A y análisis estadístico.

En resumen, se confirma que la inhibición química de p300 mediante el inhibidor químico C646 tiene un efecto apoptótico en las muestras de los pacientes de LMC, y que dicho efecto aumentaba con el incremento de la concentración del fármaco, viéndose efecto en el 100% de las muestras analizadas; a diferencia de lo ocurrido en las muestras celulares de los donantes del grupo control, donde no existía efecto alguno en cuanto a apoptosis se refiere.

Se confirma también que el tratamiento de manera simultánea con C646 e imatinib, producía más apoptosis que el uso de dichas drogas de manera independiente. Sin embargo, el número de muestras analizadas fue muy limitado, observándose dicho efecto en las muestras de dos de los tres individuos de este grupo (66%).

Para finalizar, puesto que existía un individuo del que se obtuvo muestra celular tanto de sangre periférica como de médula ósea, cabría preguntarse si el efecto del inhibidor es el mismo en ambas muestras. En este caso, se observó que el efecto del inhibidor era mayor en la muestra de médula que en la de sangre. Del mismo modo el efecto del imatinib también era mayor en las células obtenidas de médula ósea. Sin embargo, el efecto de la combinación de ambos fármacos sólo se observó en la muestra de sangre periférica.

4.3.3.3. Estudios de apoptosis en muestras de pacientes con síndromes mieloproliferativos crónicos cromosoma Filadelfia negativos (NMPs Ph-) sometidas a tratamiento con C646

Los estudios de apoptosis por citometría de flujo se realizaron siguiendo el mismo patrón utilizado anteriormente para las muestras de los otros grupos de individuos, comenzando con la concentración

baja de C646 y aumentando ésta si la muestra era suficientemente abundante y siempre tras 24h de exposición al fármaco. De nuevo no se experimentó la combinación de C646 con ningún otro fármaco debido a las razones argumentadas en el apartado anterior. De las 14 muestras disponibles de este grupo, sólo 12 contaban con suficiente celularidad como para poder realizar los estudios de apoptosis.

Tres casos presentaron unos resultados que contrastaron con los del resto de la serie. En primer lugar, dos de las muestras de sangre periférica (pacientes #29 y #42), que sólo pudieron tratarse con las concentraciones de 12,5 y 25 μ M del inhibidor. Dichas muestras no mostraron efecto alguno en la apoptosis al tratarse con la concentración baja del fármaco, sin embargo, al ser tratadas con la concentración media, se observó cierto efecto, aunque extremadamente ligero (en torno a un 7% de reducción en el porcentaje de células vivas) si tenemos en cuenta el efecto medio observado para dicha concentración. No pudieron ser testadas con la concentración más elevada para confirmar si esta progresión en la disminución del porcentaje de células viables continuaba aumentando. Por otra parte, hubo una muestra que mostró un efecto aparentemente paradójico, que será discutido más adelante de modo separado. Así, al exponerla al fármaco sufría un incremento en el porcentaje de células vivas, excepto cuando se exponía a la concentración más alta de la droga, la cual sí causaba apoptosis en dicha muestra.

Los resultados de apoptosis obtenidos para las muestras de los 12 individuos fueron los siguientes:

Siete muestras, (un 58,33%) mostraron efectos apoptóticos cuando se usó la concentración baja de C646, siendo la reducción media en el número de células vivas tras 24h de exposición a 12,5 μ M

de C646 del 11,59% (%cél. vivas = 88,41%). Cuando la concentración del inhibidor se incrementó hasta 25 μ M, y no teniendo en consideración las dos muestras mencionadas anteriormente, la reducción media en la viabilidad fue del 18,88% (%cél. Vivas = 81,12%). Por último, la concentración más alta del inhibidor pudo testarse en 7 de las 10 muestras, causando una reducción del porcentaje de células vivas de un 26,51% (%cél. vivas = 73,49%). Un ejemplo de lo descrito anteriormente puede observarse con mayor claridad en la **figura 4.55**, donde se expone el efecto al tratamiento con C646, medido por citometría de flujo en uno de los pacientes descritos, así como la cuantificación de los resultados.

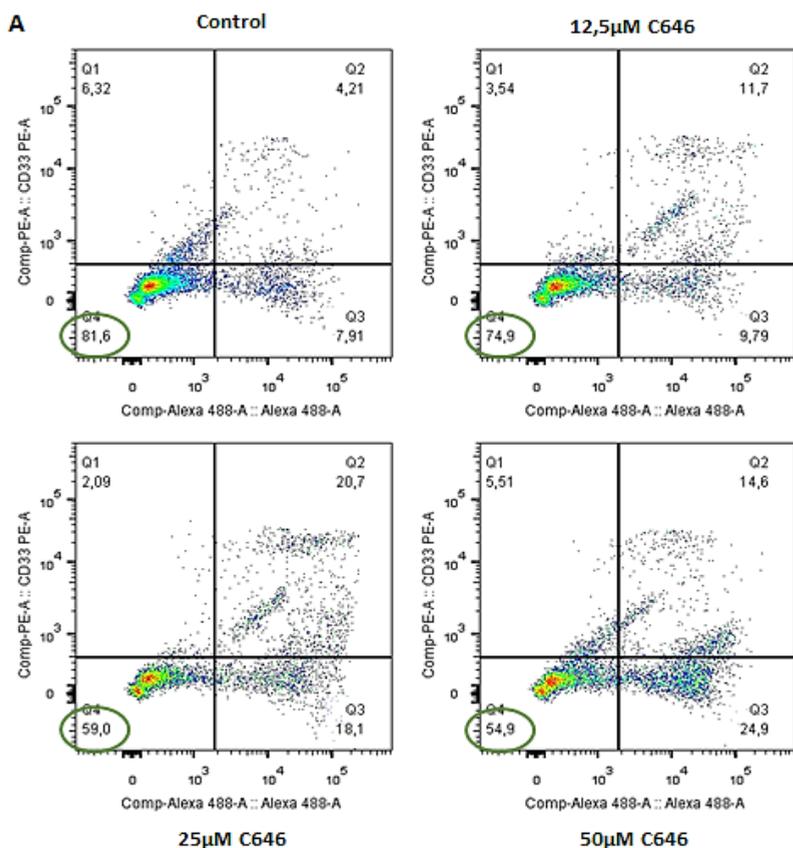
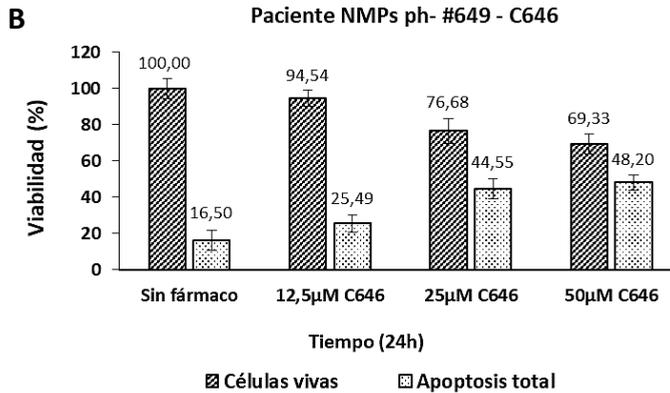


Figura 4.55 A) Gráficos obtenidos mediante estudios de apoptosis por citometría de flujo con Anexina V/Yoduro de propidio en muestras celulares de médula ósea de un individuo con trombocitemia esencial. Los gráficos muestran, de izquierda a derecha y de abajo a arriba, los porcentajes de células viables, células en apoptosis temprana, apoptosis tardía y necrosis tras 24h de exposición a tres concentraciones distintas de C646 (12,5, 25 y 50µM) en relación con la muestra sin tratar (control).



Test-T (células vivas)	SD 1	SD 2	pvalor
Control	100 ± 5,60	-	-
12,5µM C646	100 ± 5,60	94,54 ± 4,48	8,17E-02
25µM C646	100 ± 5,60	76,67 ± 6,89	7,07E-05
50µM C646	100 ± 5,60	69,33 ± 5,40	2,26E-07

Test-T (apoptosis total)	SD 1	SD 2	Pvalor
Control	17,86 ± 6,23	-	-
12,5µM C646	17,86 ± 6,23	25,49 ± 4,69	8,85E-02
25µM C646	17,86 ± 6,23	44,55 ± 5,61	1,65E-05
50µM C646	17,86 ± 6,23	48,20 ± 4,20	5,68E-05

Continuación figura 4.55 B) Cuantificación de los resultados mostrados en el apartado A y análisis estadístico.

Para finalizar este bloque, es conveniente mencionar el caso que mostró un efecto diferente al resto. Se trata de la muestra de médula ósea del paciente #73, con diagnóstico clínico de mielofibrosis. Mientras que por viabilidad pudimos medir el efecto de las concentraciones baja y media a las 24h, obteniendo una reducción en la viabilidad similar al resto de pacientes, la cual disminuía al aumentar la concentración, los resultados obtenidos por apoptosis fueron muy diferentes. Al usar la concentración baja del fármaco, el porcentaje de células vivas, en vez de disminuir, aumentó hasta un 13% de media respecto al control (no tratado). A continuación, al usar la

concentración media de C646, el porcentaje de células vivas disminuyó un poco, pero seguía siendo un 10% más alto que en el control. Por último, al usar la concentración más alta de la droga, el porcentaje de células vivas caía por primera vez por debajo del control, hasta un 83,71%, por lo que la reducción de la viabilidad era del 16,29%. Cabe destacar que, ante lo anómalo de dichos resultados, esta muestra se analizó varias veces de diferentes formas e incluso, se pudo repetir la muestra control hasta en tres ocasiones, ya que no tenía mucho sentido que la apoptosis en el control fuera mayor que en la muestra tratada con 12,5 y 25 μM de C646. Sin embargo, en todos los casos el resultado fue el mismo.

En este sentido, en el **apartado 4.3.2.1**, se describieron los resultados de apoptosis en el grupo control, donde se expuso el caso de un individuo (#09) que mostraba un efecto similar. La diferencia principal fue que la concentración más alta de C646 no llegaba a causar una reducción significativa del porcentaje de células vivas respecto a la muestra no tratada, a diferencia de este nuevo caso en el cual la concentración alta de C646 causa un descenso del 16,29%.

Por todo ello, tanto el paciente #73 como el donante control #09 se corresponden con dos casos puntuales en los que los efectos observados son diferentes a los del resto de las 28 muestras de donantes observadas por citometría de flujo.

A continuación, en la **figura 4.56**, se observan las gráficas de citometría y la cuantificación de la apoptosis para dicho paciente (#73).

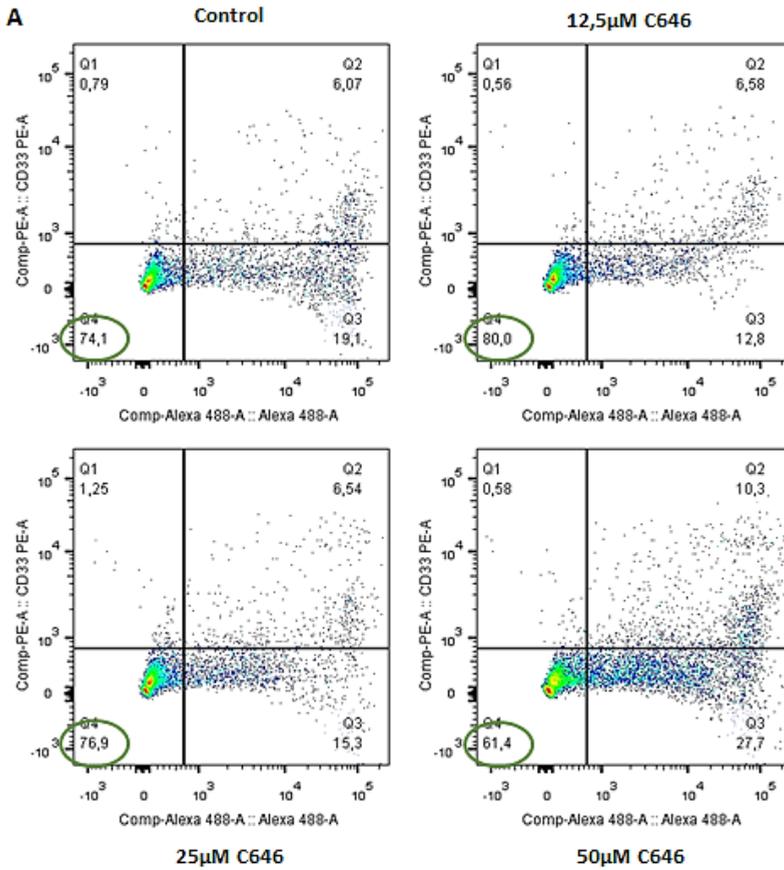
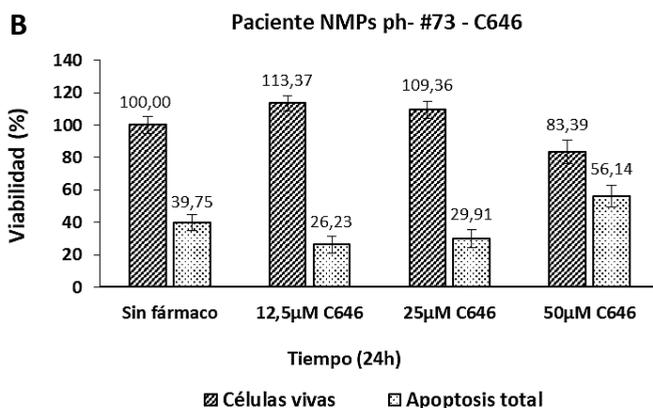


Figura 4.56 A) Gráficos obtenidos mediante estudios de apoptosis por citometría de flujo con Anexina V/Yoduro de propidio en muestras celulares de médula ósea del individuo con mielofibrosis #73. Los gráficos muestran, de izquierda a derecha y de abajo a arriba, los porcentajes de células viables, células en apoptosis temprana, apoptosis tardía y necrosis tras 24h de exposición a tres concentraciones distintas de C646 (12,5, 25 y 50μM) en relación con la muestra sin tratar (control).



Test-T (células vivas)	SD 1	SD 2	pvalor
Control	100 ± 5,44	-	-
12,5µM C646	100 ± 5,44	113,37 ± 4,75	3,27E-03
25µM C646	100 ± 5,44	109,36 ± 5,20	2,39E-02
50µM C646	100 ± 5,44	83,39 ± 7,24	3,43E-03

Test-T (apoptosis total)	SD 1	SD 2	Pvalor
Control	39,75 ± 5,07	-	-
12,5µM C646	39,75 ± 5,07	26,23 ± 5,19	2,45E-03
25µM C646	39,75 ± 5,07	29,91 ± 5,68	2,02E-02
50µM C646	39,75 ± 5,07	56,14 ± 6,85	2,61E-03

Continuación figura 4.56 B) Cuantificación de los resultados mostrados en el apartado A y análisis estadístico.

4.3.3.4. Resumen de los estudios de apoptosis en muestras de donantes del grupo control y de pacientes con síndromes mieloproliferativos crónicos

Para terminar este bloque relativo a los ensayos de apoptosis realizados en las muestras celulares de los individuos participantes en este trabajo, se construyeron unos diagramas de cajas comparativos en los que se encuentran agrupados todos los resultados obtenidos

para cada tratamiento, en cada uno de los individuos utilizados en este estudio (**figura 4.57**). De esta manera, es posible comparar fácilmente los distintos grupos de pacientes y tratamientos. Para su correcta interpretación, los resultados se agrupan según los fármacos utilizados (C646, imatinib, o la combinación de ambos). La línea recta del interior de la caja representa la mediana estadística entre los resultados para cada condición.

Tal y como se observa, el tratamiento durante 24h con el inhibidor C646, produjo un efecto de reducción en el porcentaje de células vivas (debido a un aumento de la apoptosis) en los grupos de pacientes con neoplasias mieloproliferativas crónicas (tanto LMC como cromosoma Filadelfia negativas), el cual aumentaba cuando se incrementaba la concentración. Además este efecto era un poco más acusado en las muestras de LMC respecto a las de NMPs Filadelfia negativas. De forma destacable, el tratamiento con las tres concentraciones propuestas de C646 no causó ningún efecto medible mediante ésta técnica en las muestras celulares de los donantes del grupo control.

Por último, se muestra un diagrama de cajas (**C**) que muestra la comparación en las muestras de los pacientes con LMC del tratamiento con las dos drogas de forma individual y combinada, observándose un mayor efecto en el caso del tratamiento combinado.

A continuación de la **figura 4.57**, se muestran varias tablas resumen que recogen toda la información obtenida mediante ensayos de apoptosis durante 24h para los tres grupos de individuos descritos.

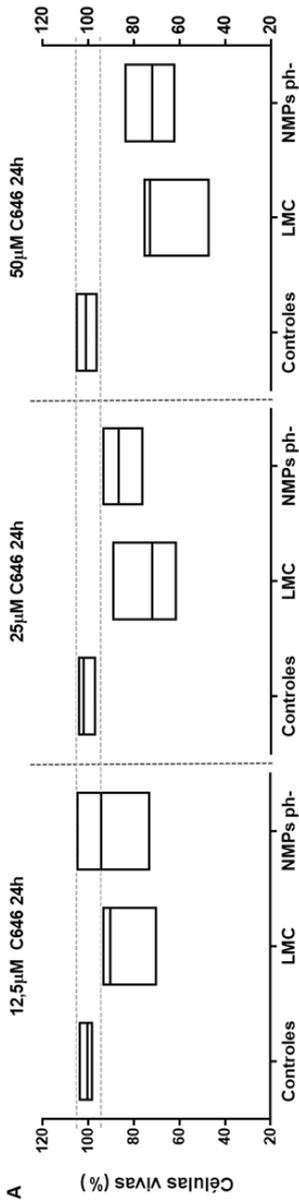


Figura 4.57 A) Diagramas de caja que recogen los efectos de reducción en el porcentaje de células vivas en los tres grupos de individuos citados tras el tratamiento durante 24h con las tres concentraciones mencionadas de C646 (12,5, 25 y 50 μM). La línea recta del interior de la caja representa la mediana de los resultados para dicha condición.

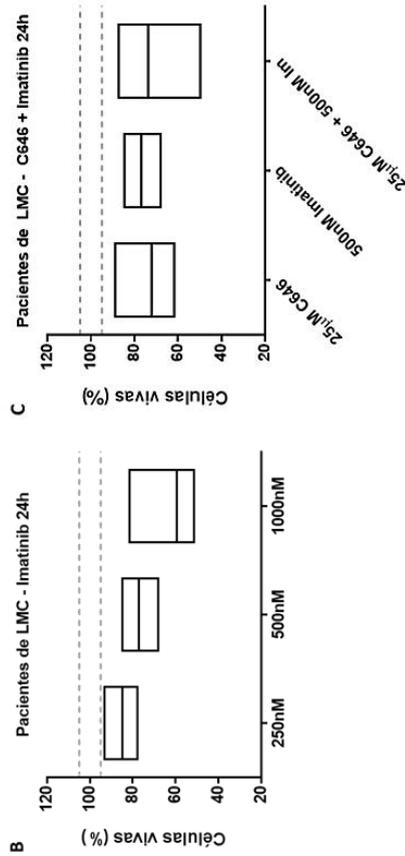


Tabla 4.16, Resultados de apoptosis en muestras del grupo control

# paciente	C646 24h		
	12.5µM	25µM	50µM
#WB1A	99,65	-	-
#WB2B	99,95	-	-
#WB3C	100,26	-	-
#WB4J	100,63	-	-
#WB5R	101,92	-	-
#99	100,40	-	-
#55	98,70	-	-
#57	103,69	104,12	-
#59	101,76	102,29	101,12
#92	98,27	97,10	105,23
#09	119,17	109,29	96,55
Muestras afectadas	0/11 (0%)	0/4 (0%)	0/4 (0%)

Tabla 4.18, Resultados de apoptosis en muestras de pacientes con NMP's ph-

# paciente	Apoptosis C646 24h		
	12.5µM	25µM	50µM
#49	99,15	-	-
#03	87,93	79,97	-
#649	94,54	76,67	69,33
#365	96,67	86,71	70,53
#713	73,42	-	62,50
#83	86,54	-	72,07
#16	89,04	-	83,24
#97	90,72	-	73,03
#29	102,21	93,38	-
#42	104,80	92,96	-
#11	102,77	-	-
#73	113,67	110,12	83,71
Muestras afectadas	6/10 (50%)	3/6 (50%)	7/7 (100%)
Intervalo de efecto	94,54 - 73,42	86,71 - 76,67	83,71 - 62,50
Media del efecto	87,03	81,12	73,49

Tabla 4.17, Resultados de apoptosis en muestras de pacientes de LMC

#paciente	C646 24h			Imatinib 24h			C646 + Imatinib 24h		
	12.5µM	25µM	50µM	250nmM	500nmM	1000nmM	25µM C646 + 500nmM IM		
#92	87,85	66,38	-	-	80,34	-	87,25		
#735	92,92	89,00	75,38	85,04	68,18	59,56	49,58		
#14	70,27	61,61	47,42	77,97	73,72	51,38	75,02		
#31	93,44	77,50	73,20	93,09	84,84	81,48	72,47		
Muestras afectadas	4/4 (100%)	4/4 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	4/4 (100%)	3/3 (100%)	2/4 (50%)		
Intervalo de efecto	92,92 - 70,27	89 - 61,61	75,38 - 47,42	93,09 - 77,97	84,84 - 68,18	87,11 - 59,56	72,47 - 49,58		
Media del efecto	86,12	73,62	65,33	85,37	76,77	64,14	61,02		

4.3.4. Resumen combinado de los resultados obtenidos mediante las técnicas de viabilidad y apoptosis en las muestras celulares de los 28 individuos participantes en el presente estudio

En primer lugar, cabe reseñar que existen muestras que sólo pudieron analizarse mediante estudios de apoptosis y muestras analizadas sólo mediante ensayos de viabilidad. Por ello, para calcular los porcentajes reales de muestras que se ven afectadas tras los distintos tratamientos, hay que tomar en consideración los resultados obtenidos mediante ambos procedimientos de forma conjunta.

Por lo que hace a las 11 muestras pertenecientes al grupo control, todas ellas fueron analizadas mediante experimentos de apoptosis, viéndose que en el 100% de los casos no hubo efecto alguno tras el tratamiento con C646. Por otro lado, 5 de las muestras fueron tratadas en experimentos de viabilidad, viéndose de nuevo ausencia de efecto en el 100% de ellas, independientemente del tiempo de exposición al fármaco. De este modo, se puede concluir que el 100% de los sujetos del grupo control mostraron resistencia al tratamiento con el inhibidor al menos con los tiempos de exposición probados y las tres concentraciones de fármaco utilizadas en este trabajo.

Cuando se analizaron las 4 muestras de los 3 pacientes de LMC, se vio que el 100% de ellas sufría efectos tras el tratamiento con C646 observados mediante la técnica de apoptosis, y que en un 66% de los individuos el efecto de la combinación de ambas drogas era mayor que el efecto observado al usarse éstos de manera individual. Dos de las muestras pudieron tratarse también mediante ensayos de viabilidad, mostrando de nuevo efectos notorios de reducción de células viables al ser tratadas con C646 mediante esta técnica; y también, un efecto en la viabilidad mayor cuando se combinaban ambas drogas que cuando se utilizaban de forma individual. Además, la única muestra en

la que no se detectó mediante los ensayos de apoptosis este mayor efecto combinado de ambos fármacos, sí que dio como resultado un mayor efecto de combinación al medirse mediante los ensayos de viabilidad. En resumen y teniendo en cuenta ambos procedimientos, en el 100% de los pacientes con LMC se vio un efecto de reducción en el porcentaje de células vivas tras el tratamiento con C646, que a su vez fue menor que el efecto observado al combinar ambos fármacos en el cultivo.

En cuanto a las 14 muestras celulares de los pacientes de NMPs cromosoma Filadelfia negativos, en 12 de ellas se analizó la apoptosis por citometría de flujo. En 10 casos se observó una reducción de la viabilidad con alguna de las concentraciones utilizadas. No obstante, como se ha comentado, dos pacientes sólo mostraron una muy ligera reducción del número de células vivas (en torno al 7%) incluso cuando se usó la concentración media de la droga (no pudiéndose probar la concentración alta). Si se eliminan por precaución estos dos pacientes, el resultado final es que en 8 de las 12 muestras (66%) se observó algún tipo de efecto tras el tratamiento con C646. Por otra parte, mediante experimentos de viabilidad se pudieron analizar 10 de las muestras de los pacientes de este grupo, incluidas dos muestras extra que no mostraron respuesta al tratamiento. De estas 10 muestras se vio efecto con C646 en un 60% de ellas. Por consiguiente, teniendo en cuenta conjuntamente los resultados obtenidos mediante ambos procedimientos, se vio que en 9 de las 14 muestras se dio algún tipo de descenso en el porcentaje de células vivas tras el tratamiento con C646. Es decir, un 64,28% de las muestras de los pacientes de NMPs Ph-neg respondieron de manera significativa al tratamiento con C646, al menos tras los tiempos de exposición y las concentraciones de inhibidor utilizados en este trabajo.

5. *DISCUSIÓN*

5. DISCUSIÓN

Los resultados del presente trabajo apoyan que el complejo transcripcional *RUNX1-CBF- β /HIPK2/EP300/TP53* puede estar alterado en la transformación aguda de las NMPs, contribuyendo potencialmente a su patogénesis. A continuación, se discuten los resultados obtenidos en el marco de los objetivos iniciales del estudio.

5.1. PRIMER OBJETIVO: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS GENES DEL COMPLEJO EN NMPS AGUDIZADAS.

Los resultados hacen patente que los genes *RUNX1-CBF- β /HIPK2/EP300/TP53* tienen una función importante en las NMPs agudizadas. Su caracterización molecular evidencia que se encontrarían activos en este tipo de patologías, siendo relevantes en el proceso de leucemogénesis. Por otro lado, sus diferentes niveles de actividad individual y los diferentes patrones de su expresión conjunta, indican una elevada heterogeneidad en cuanto al estado funcional de los elementos del complejo en las diferentes NMPs agudizadas.

Se ha descrito por varios autores que los genes *RUNX1* y *TP53* son continuamente regulados mediante modificaciones postraduccionales (PTMs), así como que dichas PTMs son relevantes en los procesos cancerígenos incluyendo la leucemogénesis³²³⁻³²⁸, proceso en el que la fosforilación y acetilación de *RUNX1/p53* por *HIPK2* y *p300* adquiere una especial importancia^{260,311,316,327-329}.

Así, es sabido que *HIPK2* controla las funciones de *RUNX1* y *p53* mediante su fosforilación en las serinas 276 y 46, respectivamente^{260,290,303}. No obstante, en este trabajo se confirma por

primera vez en el contexto de las NMPs agudizadas que sólo existen dichas fosforilaciones en aquellas muestras con expresión de HIPK2. Eso evidencia que, en dicho contexto de transformación aguda, el requerimiento de los componentes del complejo no es simultáneo, sino secuencial, por lo que existirían diferencias en el rol que tiene cada uno de los miembros y el momento en el que se requiere su actividad durante el proceso de hematopoyesis normal/maligna.

La inhibición biológica de *HIPK2* en muestras de NMPs agudizadas inhibe la fosforilación de RUNX1 y p53, constatando el rol regulador de *HIPK2* en este proceso y mostrando que su actividad quinasa previa es necesaria para que el resto de componentes del complejo desarrolle sus funciones. La inhibición de p300 también incide en la correcta fosforilación de RUNX1 y p53, inhibiendo parcialmente la función de *HIPK2*. Esto demuestra el papel estabilizador que ejerce p300 sobre la función de *HIPK2*³²⁰, colaborando a su papel regulador del complejo. Además, la inhibición simultánea de *HIPK2* y p300 conlleva una ausencia total de expresión de p-RUNX1 y p-p53, reforzando la hipótesis de que ambos genes son necesarios para la estabilidad y funcionalidad del complejo en estas patologías mediante su acción sobre el resto de componentes^{109,260,311,317,320}.

El hecho de que la relación observada entre el grado de inhibición de *HIPK2* y el grado de desfosforilación de p53 sea diferente dependiendo del tipo de neoplasia mieloproliferativa (siendo dicha correlación mayor en LMC), podría deberse a varios motivos; como un diferente requerimiento de *HIPK2* que conlleve una mayor sensibilidad a su inhibición, según las características moleculares y patogenia de cada línea celular/neoplasia (BCR-ABL, *JAK2V617F*, etc). Otra posible explicación podría ser la presencia de otros mecanismos moleculares

involucrados que se activarían al inhibir *HIPK2* y disminuirían aún más su función sobre p53, o afectarían directamente a la expresión de éste, como por ejemplo un aumento en la expresión de represores de p53 (*MDM2*, *CtBP*, etc)^{293,305,307,308,319}. En este sentido, existen trabajos que demuestran que la proteína BCR-ABL presente en LMC produce una sobreexpresión de *MDM2* y una degradación adicional de p53^{195,196}.

Nuestros resultados confirman también la existencia de una desregulación del complejo como unidad funcional en la progresión leucémica de las NMPs. Dicha desregulación se manifiesta en una gran cantidad de alteraciones citogenéticas observadas (incluyendo deleciones, amplificaciones, translocaciones o reordenamientos más complejos), así como importantes variaciones de expresión, en los genes *HIPK2*, *EP300*, *RUNX1* y *TP53* en las distintas muestras analizadas. Así pues, se confirma la información descrita acerca de la importancia de las alteraciones en *RUNX1* y *TP53* como eventos importantes asociados a la evolución leucémica de las NMPs^{17,173,182,184,244}, añadiendo como novedad complementaria las alteraciones en *HIPK2* y *EP300* como alteraciones con elevada frecuencia en dichas patologías y confirmando que las aberraciones en el funcionamiento de *RUNX1/TP53* no sólo podrían ser debidas a sus propias alteraciones sino también a las de los genes que los regulan.

Así, los resultados permiten proponer una asociación clara entre los patrones de expresión/actividad observados para los cinco genes y las alteraciones citogenéticas de cada uno de ellos. Es el caso, por ejemplo, de las dos líneas celulares con mayor expresión de *RUNX1* y que muestran ganancia génica con múltiples copias de este gen en su genoma; o la línea sin expresión de *HIPK2*, que presenta dicho gen translocado a otro cromosoma en más del 80% de sus células.

La elevada frecuencia de alteraciones citogenéticas observadas en torno a *HIPK2* concuerda con la información descrita acerca de la importancia de las deleciones en el cromosoma 7^{88,185,257}, añadiendo ahora como resultado de este trabajo las deleciones específicas de *HIPK2* como evento importante en el contexto de las NMPs agudizadas. Además, el hecho de encontrar nuevas alteraciones citogenéticas afectando a *HIPK2* (ganancia, translocación, o incluso ganancia de una sola región del gen), vuelve a poner de manifiesto la heterogeneidad en torno a la citogenética y actividad de *HIPK2*, lo que contribuye posiblemente a la desregulación del complejo y a la transformación leucémica de las NMPs. A raíz de estas observaciones es factible pensar que *HIPK2* tendría un papel importante en otras neoplasias hematológicas mieloides, ya que *RUNX1* se encuentra también muy frecuentemente alterado en LMA y SMD^{109,110,112,330,331}.

Uno de los resultados destacables de este trabajo, sería la descripción de una elevada expresión de la isoforma “leucémica” de *RUNX1* (isoforma *a*) en las muestras de NMPs agudizadas, independientemente del tipo de neoplasia. Este hecho evidencia, por una parte, la importancia de *RUNX1* en los procesos de hematopoyesis y leucemogénesis^{109,278,332,333} y, por la otra, la importancia de la isoforma *a* en el desarrollo neoplásico, siendo éste el primer trabajo, en el que se identifica la presencia de dicha isoforma en NMPs, ya que hasta la fecha sólo había sido asociada a LMA^{268,269}

Además, nuestros resultados evidencian que en las NMPs agudizadas, *HIPK2* fosforila predominantemente a la isoforma *a* de *RUNX1*, observándose una fosforilación elevada en dicha isoforma en detrimento de las isoformas funcionales (*b* y *c*), las cuales se activan con menor frecuencia y en menor medida en la gran mayoría de casos. Así, observamos muestras que expresan simultáneamente las tres

isoformas de *RUNX1*, pero sólo presentan fosforilación en la isoforma α , pudiendo esto deberse incluso a una función aberrante de *HIPK2*.

Todo lo anterior lleva a concluir que en estas patologías la función aberrante de *RUNX1* y *TP53* podría deberse no sólo a las alteraciones en su estructura, sino a las alteraciones en los genes que los regulan (*HIPK2* y *EP300*)^{260,281,334,290,303,310,311,316,317,319,331}. Como consecuencia, se favorecería una desregulación del proceso hematopoyético, el cual depende en gran medida de las correctas funciones de *RUNX1-CBF- β* ^{109,252,259,278,332,333} y *TP53*^{190,191,193,194,203,249,335}.

Por último, ponemos en evidencia que existe un patrón diferencial en cuanto a la expresión de *HIPK2*, *RUNX1* y *TP53* en las seis líneas leucémicas estudiadas, lo cual no permite realizar ninguna asociación entre el estado de expresión de los genes del complejo y la neoplasia mieloproliferativa concreta en cuestión.

Con todo ello, pese a que existen estudios anteriores que relacionan las funciones de algunos de estos cinco genes por separado, e incluso las interacciones entre algunos de ellos en los procesos de hematopoyesis normal y maligna^{109,252,315,332,260,263,264,284,297,299,311,314} o de respuesta al daño en el ADN y apoptosis^{249,281,320,289,290,303,304,308,310,316,317}, nuestros resultados muestran una aproximación diferente y novedosa por varias razones.

En primer lugar, no existe en la literatura ningún trabajo que relacione conjuntamente a los cinco genes como un complejo funcional activo en los procesos arriba citados.

En segundo lugar, no existen tampoco estudios sobre las interacciones de estos genes y su papel en la evolución leucémica de

las NMPs, ya que los estudios mencionados se centran en otras neoplasias hematológicas, principalmente LMA y SMDs^{109,260,268,284}.

En tercer lugar, no existe apenas información sobre el estado citogenético y molecular de estos genes en muestras de NMPs. De hecho, los trabajos que existen hasta la fecha se centran principalmente en alteraciones citogenéticas que incluyen cromosomas enteros o regiones cromosómicas amplias^{8,88,108,183-185,187,188,336,337}. Los pocos estudios que indagan específicamente acerca del número de copias y la citogenética de estos genes se han llevado a cabo en otras neoplasias hematológicas distintas a las NMPs, como son los estudios citogenéticos acerca del estado de *RUNX1* y *CBF- β* en LMA^{109,252,258,330,338} o LLA³³⁹, *TP53* en LMA³⁴⁰ o SMDs³⁴¹ o *EP300* en LLA³⁴². No existe tampoco, por otra parte, ningún estudio acerca de las variaciones en el número de copias/alteraciones citogenéticas de *HIPK2* en ninguna neoplasia hematológica.

Con ello, este trabajo se convierte en el primer estudio que expone una caracterización molecular y citogenética de los componentes del complejo *RUNX1-CBF β /HIPK2/p300/p53* en el contexto de la fase aguda de las NMPs, demostrando además que existen interacciones complejas entre sus componentes. Asimismo, sugiere que las alteraciones de sus elementos, debidas a alteraciones estructurales o a posibles fallos en las funciones reguladoras de su actividad integrada como complejo, podrían suponer eventos relevantes en la transformación leucémica de las NMPs.

5.2. SEGUNDO OBJETIVO: EFECTOS DE LA INHIBICIÓN DE *HIPK2*-p300 EN LA TRANSFORMACIÓN AGUDA DE LAS NMPS.

Otro de los aspectos novedosos de esta tesis doctoral es la manipulación biológica y química del complejo mediante la inhibición de *HIPK2*-p300 en el contexto de este grupo de enfermedades, con la finalidad de observar los posibles efectos funcionales de la desregulación del complejo en las células leucémicas.

Existen trabajos en los que se describe cómo los genes *HIPK2* y *EP300* podrían jugar roles importantes en leucemia^{260,284}, y cómo su manipulación podría ayudar en el tratamiento de ciertas neoplasias hematológicas^{315,331,343-346}. No obstante, dichos estudios se han realizado solamente en leucemia mieloide aguda y/o síndromes mielodisplásicos^{260,284,315,347,348}. Con estos antecedentes, nuestro trabajo se presenta como la única aproximación hasta la fecha acerca del efecto de la inhibición de *HIPK2*/p300 en las NMP agudizadas.

Cabe destacar tres resultados a este respecto. En primer lugar, tanto la inhibición de *HIPK2* como la de p300 por separado reducen considerablemente la fosforilación de RUNX1 y p53; en segundo lugar, la inhibición de p300 reduce parcialmente la expresión de *HIPK2*; finalmente, la inhibición simultánea de *HIPK2*-p300 conlleva la ausencia total de p-RUNX1 (Ser276) y p-p53 (Ser46).

Se ha visto en neoplasias diferentes a las NMPS, cómo *HIPK2* es la quinasa encargada de fosforilar y activar a RUNX1/p53^{260,290,303,311} y a p300²⁶⁰, y cómo éste último se encarga de acetilar a *HIPK2* para regular su estabilidad y actividad³²⁰. Por otra parte, CBF- β , regula la estabilidad de RUNX1 y su afinidad por el ADN e interviene en su fosforilación reclutando a *HIPK2*^{252,259,260,332}. También se ha descrito cómo una vez que RUNX1 ha sido fosforilado, CBF- β recluta a p300 (el

cual tiene que haber sido también fosforilado por HIPK2) para que regule la transcripción génica a cargo del dúo RUNX1-CBF- β ²⁶⁰.

De modo similar, se sabe también que p300 y p53 han de ser previamente fosforilados por HIPK2 para que p300 pueda mediar la transcripción de los genes diana de p53, o incluso su degradación, regulando así su función^{305,316,317,319,320}.

Asimismo, existen estudios que relacionan a CBF- β con el mecanismo de respuesta al daño en el ADN mediado por p53. Este proceso es bastante desconocido, sin embargo, se ha observado que CBF- β favorece un aumento de la apoptosis dependiente de p53 en respuesta al daño celular producido por procesos como la radiación ionizante (IR), las condiciones de hipoxia o el tratamiento con zinc. Del mismo modo, la proteína mutante CBF- β -SHMMC expresada en algunas LMAs como consecuencia de la inv(16) reduce la inducción de p53, disminuyendo la apoptosis y la interrupción del ciclo celular en respuesta a dichos procesos mencionados de estrés celular^{349,350}.

Los estudios acerca de la participación de CBF- β en el mecanismo de respuesta al daño celular dependiente de p53 fueron realizados en 1997-98. En el mismo año, 1998, se descubría la existencia del gen *HIPK2*²⁸⁵, aunque sus funciones concretas no se elucidarían hasta años posteriores²⁸¹. Hoy en día sabemos que HIPK2 es la quinasa específica que regula la apoptosis dependiente de p53 en dichos procesos concretos de estrés celular en los que se ha visto que CBF- β interfiere^{279,290,294,304,306,310,351-353}. Por tanto, la disminución de la apoptosis dependiente de p53 causada por la proteína mutante CBF- β -SHMMC en respuesta a dichos estímulos de estrés celular, ha de ser, muy probablemente, producida a través de una interferencia entre CBF- β -SHMMC y la ruta HIPK2-p53 o bien mediante una interacción

CBF- β -SHMMC-HIPK2 que produzca una disminución de la actividad quinasa de HIPK2 sobre p53.

Partiendo de esa información, nuestros resultados refuerzan claramente el concepto de complejo génico. Los cinco genes formarían una red de interacciones complejas entre sí, participando en dos rutas clave de la hematopoyesis y la leucemogénesis como son las rutas de proliferación-diferenciación celular a cargo de *RUNX1* y las rutas de apoptosis-respuesta al daño celular-quimiorresistencia a cargo de p53.

En dicho complejo, los genes *HIPK2/EP300/CBF- β* estarían participando en ambas rutas. *CBF- β* lo haría como un gen mediador en ambos procesos, interviniendo en ellos de una manera más indirecta que *HIPK2-EP300*. Éstos últimos, por su parte, actuarían como genes reguladores de ambas rutas, mediante la activación molecular de *RUNX1-p53* y la regulación de su capacidad transcripcional^{260,303,311,316}.

CBF- β actuaría sobre *RUNX1* indirectamente a través de otras proteínas, mediando su activación a través del reclutamiento de *HIPK2* y *p300*. Por otra parte, CBF- β favorecería la respuesta apoptótica de p53 en los procesos de IR, hipoxia o aumento de zinc, pero no es capaz de causarla directamente, y su proteína mutante tampoco es capaz de inhibirla por sí sola, sino de disminuirla parcialmente, lo que hace pensar que es muy probable que la participación de CBF- β en esta ruta no ocurre mediante su acción directa sobre p53, sino sobre la interferencia con la ruta *HIPK2-p53*^{260,349,350}.

En línea con lo anterior, en este estudio hemos visto cómo *CBF- β* es el único gen que no presenta variaciones de expresión ni ningún tipo de alteración citogenética en las muestras de NMPs estudiadas, lo que refuerza nuestra conjetura de que tiene una función mediadora sobre el resto, pero no activadora.

Por el contrario, *HIPK2/P300* sí que tendrían una función directa sobre *RUNX1-p53* regulando su activación y transcripción y jugando un papel importante en estas neoplasias, lo que se demuestra por la alta frecuencia de alteraciones observadas en torno a *HIPK2* y *EP300*, y por el hecho de que su inhibición simultánea conlleva la desaparición total de activación de *RUNX1-p53* a cargo de *HIPK2*.

En este sentido, pese a que la inhibición química de *p300* producía los mismos efectos moleculares que la inhibición de *HIPK2*, se observaba que las alteraciones observadas en *EP300* consistían en deleciones o translocaciones heterocigotas, las cuales no afectaban a su expresión génica/proteica, por lo que se deduce que una sola copia de *EP300* en las células de NMPs agudizadas es suficiente para que se lleve a cabo la expresión del gen y, por tanto, su función.

Se concluye pues, que *HIPK2/EP300* son necesarios para la activación de *RUNX1* y *p53* en las NMPs agudizadas, y que la desregulación del complejo observada se debería a las alteraciones en *RUNX1*, *TP53* y *HIPK2*, ya que las alteraciones encontradas en *EP300* no interfieren con su expresión normal, lo que sugeriría a *HIPK2* como gen regulador incluso en un escalón superior a *p300*.

Por otra parte, nuestros resultados demuestran cómo la inhibición biológica de *HIPK2* (y la consiguiente desregulación observada de *RUNX1-TP53*) en muestras de NMPs agudizadas tiene efectos drásticos en las funciones celulares de las células leucémicas, los cuales se hacen patentes en los resultados de proliferación, viabilidad, apoptosis y ciclo celular, confirmando nuevamente el rol fundamental de *HIPK2* como regulador bidireccional del complejo.

Los resultados demuestran que la disminución de la viabilidad provocada por la inhibición de *HIPK2* se debe a una interrupción

drástica del ciclo celular, en contraposición a un aumento de la apoptosis como cabría pensar en un principio.

Dicho efecto en proliferación/ciclo celular es tan drástico debido a que *HIPK2* actuaría doblemente sobre esta vía. Por un lado, su supresión produce una desregulación de *RUNX1-CBF- β* , los cuales regulan la transcripción de los genes diana de *RUNX1* encargados de la proliferación mieloide^{109,261,268}. Por otro lado, *HIPK2* también regula diferentes vías relacionadas con la proliferación celular^{297,354-357}, como la vía Wnt/ β -catenina o las dependientes de *HIF-1 α* ^{294,300}. Así, la inhibición de *HIPK2* causaría una desregulación simultánea de diversas vías relacionadas con la proliferación mieloide, explicando nuestras observaciones acerca de la ausencia total de proliferación en los experimentos relativos al 95% de inhibición de *HIPK2*.

Con ello, nuestros resultados indican por primera vez cómo este gen tiene también un papel fundamental en la leucemogénesis post-NMP, regulando los procesos de proliferación y ciclo celular.

Por otra parte, los resultados de apoptosis tras dicha inhibición confirman el rol descrito de *HIPK2* como oncoprotector en la activación de la apoptosis vía p53^{279,281,294,301,305,306,316}. Al encontrarse inhibido el primero, p53 no puede ser activado, de modo que las células leucémicas no entran en apoptosis dependiente de la ruta *HIPK2-p300-p53*, siendo además este estudio pionero en indagar dicha ruta en las NMPs en fase de transformación.

En resumen, los resultados de inhibición de *HIPK2* confirman su importante papel en la homeóstasis tumoral, siendo determinante en la capacidad de proliferación y metástasis, respuesta al daño en el ADN y apoptosis; y, aunque la relación entre *HIPK2* y estos procesos ha sido descrita en otras enfermedades, los resultados aquí expuestos

muestran por primera vez dichos roles durante la fase de agudización de las NMPs crónicas^{281,288,356,358}, confirmando cómo la manipulación de *HIPK2* influye en las funciones celulares de las células leucémicas.

En cuanto a la inhibición química de p300, el hecho de que el tratamiento con C646 diera como resultado los mismos efectos funcionales en proliferación/viabilidad/ciclo celular que los efectos observados tras la inhibición de *HIPK2*, confirma una vez más que p300 es también un gen regulador básico en el funcionamiento del complejo, siendo necesario en la activación transcripcional de RUNX1-CBF- β . Su inhibición, al igual que la de *HIPK2*, produce un bloqueo en el ciclo celular de las células leucémicas, impidiendo la entrada en división y provocando un descenso proliferativo.

En relación a los resultados de apoptosis, no obstante, los efectos observados tras la supresión de p300 son opuestos a los que observábamos tras la inhibición de *HIPK2*, indicando que, aunque ambos genes regulan el complejo, tienen funciones distintas.

Puesto que p300 regula la transcripción de p53 mediante su actividad acetil-transferasa³¹⁷⁻³¹⁹, promoviendo la apoptosis^{329,359,360}, cabría esperar que su supresión inhibiese/bloquease la transcripción de p53 y, por tanto, produjera un descenso de los procesos apoptóticos, tal y como ocurría al inhibir *HIPK2*. Sin embargo, nuestros resultados demuestran que la supresión de p300 produce un aumento de la apoptosis, algo que ya ha sido descrito en otras patologías³⁶¹, pero añadiendo además un descenso severo en la fosforilación de p53, indicando una interrupción de la actividad quinasa de *HIPK2* sobre p53.

Dichos resultados evidencian que las células leucémicas reaccionan al estrés celular que supone inhibir p300 e inician los procesos de apoptosis. Sin embargo, teniendo en cuenta que no se

produce activación directa HIPK2-p53 ni tampoco regulación transcripcional p300-p53, sólo cabe que la activación de la apoptosis se esté llevando a cabo mediante rutas alternativas.

Es sabido que p53 es capaz de iniciar la apoptosis mediante mecanismos independientes de transcripción. Este proceso se denomina TIPA (transcription-independent p53-induced apoptosis) y se produce, entre otras causas, cuando ocurre un aumento intracelular de la proteína p53, que al no ser degradada, se acumula en el citosol y es capaz de provocar cascadas apoptóticas directamente mediante su unión a otras proteínas y receptores^{362,363}. De hecho, se ha observado cómo la inhibición de p300 en otros contextos puede producir una acumulación de p53 intracelular y un aumento de apoptosis³⁶⁴.

Estos mecanismos TIPA se han descrito también en algunos procesos hematopoyéticos³⁶⁵ y leucemogénicos³⁶⁶, sin embargo, no se sabe con claridad cómo se inician o regulan y, además, tampoco han sido estudiados en el contexto de las neoplasias mieloides.

HIPK2 ha sido definido como “gen guardián”, capaz de detectar el daño celular y activar una serie de procesos de respuesta. Además de su función en la activación directa de p53, *HIPK2* también puede activar la apoptosis dependiente de p53 a través de rutas que no implican su interacción directa, mediante la regulación de sus represores o de otros represores apoptóticos generales. De esta manera, *HIPK2* puede controlar la acumulación de p53 e intervenir en los citados procesos TIPA. Por otro lado, *HIPK2* también puede mediar la apoptosis directamente mediante la interacción con otros factores pro-apoptóticos independientes de p53^{281,294,367}. En definitiva, *HIPK2* puede tanto inducir como reprimir la apoptosis, a través o no de p53.

Entre los mecanismos que favorecen la acumulación intracelular de p53, HIPK2 inhibe a varios represores de éste, cómo el citado MDM2²⁹³, o las proteínas Nox1 y MT2A²⁹⁴. Además, también puede activar la ruta de señalización JNK, estimulando la acumulación citosólica de p53 y la activación de la apoptosis vía mitocondrial³⁶⁸.

HIPK2 puede también inhibir a los genes represores de la apoptosis CtBP^{305,368}, Δ p63 (represor del gen apoptótico p63^{294,306}) o HIF-1 α , restaurando también la apoptosis independiente de p53^{294,351}.

Además, HIPK2 puede activar directamente a moléculas proapoptóticas, como p73³⁶⁸ o PML (activando a través de ella la transcripción de los genes apoptóticos p53/p73³⁶⁸).

A la vista de estos antecedentes, nuestros resultados de apoptosis ponen de manifiesto varios aspectos relevantes en el contexto de las NMPs agudizadas. En primer lugar, la inhibición de p300 en presencia de HIPK2 produce un aumento de la muerte celular que es independiente de la activación directa HIPK2-p53. Por otra parte, la inhibición de HIPK2 en presencia de p300 produce un descenso en la apoptosis el cual sí que es, al menos en gran parte, causado por disminuir la vía de fosforilación HIPK2-p53. Por último, la inhibición simultánea de HIPK2 + p300, produce los mismos resultados que la inhibición única de HIPK2.

Dichas observaciones indican que, efectivamente, HIPK2 es el gen encargado de iniciar los mecanismos de respuesta al daño celular. Si el complejo está funcionando correctamente, estos mecanismos se inician a través de la interacción directa con p53, proceso para el cual p300 es requerido. Sin embargo, en el caso en que dicha interacción no sea posible debido a la inhibición de p300, HIPK2 es capaz de activar la apoptosis mediante rutas independientes de la fosforilación directa

de p53. Así pues, nuestros resultados demuestran el papel fundamental del complejo en las rutas de respuesta al daño celular, siendo HIPK2 el gen encargado de detectar y responder a ese daño. La ausencia de éste conlleva menor respuesta al daño celular, mientras que su presencia confiere una mayor sensibilidad.

Finalmente, es importante resaltar el doble bucle regulatorio formado entre MDM2/p53 en relación con HIPK2 y p300. Mientras que HIPK2 inhibe a MDM2 favoreciendo la acumulación de p53²⁹³; p300 activa a MDM2 favoreciendo en este caso la degradación de p53³¹⁹. Este doble bucle regulatorio podría ser responsable, al menos en parte, de que al suprimir la expresión de p300 todo el mecanismo se oriente hacia la inhibición de MDM2 por parte de HIPK2, con la consiguiente acumulación de p53, lo cual concuerda con el aumento de apoptosis observado en nuestros resultados.

Al describir el marco teórico antecedente de este trabajo se ha expuesto el rol fundamental de *EP300* en los procesos de desarrollo y cómo se ha estudiado dicho rol en varios tipos de cáncer, incluidas algunas neoplasias hematológicas distintas a las NMPs^{260,347}. Pese a que existen algunos estudios de inhibición de p300 mediante shRNA o pequeños inhibidores químicos (C646, celastrol, naphthoquinonas) en procesos leucemogénicos asociados a la LMA *de novo* o LMA post-MSD^{315,343,344,348,369,370}, nuestros resultados abren el camino al estudio del papel de *EP300* en la agudización de las NMPs, y además, como parte del complejo regulador analizado.

Existen hasta la fecha solamente dos estudios acerca del efecto de inhibir p300 mediante el inhibidor C646 en líneas leucémicas. En 2013, el grupo de Yu. L, publicaba un trabajo en el que varias líneas eran tratadas del mismo modo que se ha realizado en este estudio³⁷¹, siendo también tres de esas líneas HEL, K-562 y HL-60. No

obstante, los efectos que observaban eran muy ligeros, con aumentos en el porcentaje de células apoptóticas tras el tratamiento de un 4,5% en el mejor caso. En cuanto al ciclo celular, sólo la línea HEL mostraba cambios en los porcentajes de las diferentes fases mayores al 10%, mientras que la línea HL-60 no mostraba efecto alguno.

Por otra parte, en 2016, el grupo de *Giotopoulos. G*, publicaba otro trabajo en el que se inhibía p300 con C646 en la línea K-562³¹⁵, la cual era utilizada y denominada como “línea celular resistente” a C646, observándose efectos extremadamente ligeros o nulos en la mayoría de los casos y contradiciendo así el trabajo expuesto anteriormente³⁷¹.

En contraposición a dichos trabajos, nuestros resultados muestran que la inhibición de p300 tiene efectos mucho más acusados en dichas líneas leucémicas, obteniendo incrementos mucho mayores en los porcentajes de apoptosis tras la inhibición (25% - 75%) y siendo además la línea celular HL-60 la más afectada de las seis líneas testadas. En cuanto al ciclo celular, nuestros resultados demuestran cómo las tres líneas experimentan un bloqueo celular en la fase G0/G1, y un descenso de la fase S. Así pues, en comparación con ambos estudios³⁷¹, el presente trabajo demuestra un efecto drástico en la apoptosis y ciclo celular de las células leucémicas tras la inhibición de p300, el cual puede a su vez ser explicado debido al rol regulador de éste sobre *RUNX1-CBF-β* y *TP53*, añadiendo también su papel de colaborador con *HIPK2* como principal regulador del complejo, al actuar como estabilizador de éste mediante su acetilación.

En resumen, nuestro trabajo presenta la novedad de explorar el efecto de la inhibición de *HIPK2* y p300 como elementos del complejo estudiado en el contexto de las NMPs agudizadas, abarcando líneas y técnicas que no hemos encontrado en otros trabajos^{315,371}.

Otro de los aspectos novedosos de este trabajo respecto al estudio de la actividad de p300, es el estudio *ex vivo* de su inhibición en muestras cultivadas de médula ósea y sangre periférica de pacientes con NMPs, ya que en los dos estudios citados anteriormente también se analizaron las funciones de *EP300* en muestras celulares de pacientes en cultivo, pero en ambos casos dichas muestras procedían de pacientes afectados con LMA *de novo*^{315,371}.

En este sentido, nuestros resultados confirman las observaciones obtenidas en líneas celulares y las amplían a muestras de pacientes con NMPs agudizadas, abriendo el camino a nuevos estudios que exploren la posibilidad de incidir sobre la función de *EP300* en pacientes como parte de la terapéutica de estas patologías.

Además, nuestros resultados confirman observaciones previas acerca de la inmunidad de las células sanguíneas de individuos sanos al tratamiento con C646, al menos en las funciones aquí descritas.

Una posible explicación del distinto efecto observado en muestras de pacientes respecto a las de donantes control, podría ser la diferente composición celular de ambas muestras. Así, las muestras de pacientes con NMPs poseen un alto porcentaje de blastos, progenitores mieloides y otras células hematológicas en estadios primarios del desarrollo, las cuales presentan un bloqueo de la diferenciación y no poseen ninguna función aparente debido a su estado inmaduro permanente. Por el contrario, las muestras de los donantes control se componen en su mayor parte de poblaciones celulares diferenciadas y funcionales, siendo menor el porcentaje de blastos (los cuales sí que siguen el proceso de desarrollo normal), no habiendo *a priori* poblaciones celulares carentes de función.

Debido a que *EP300* es un gen clave en los procesos de desarrollo normal y maligno, especialmente en el desarrollo temprano, su papel en la hematopoyesis es también fundamental, sobre todo en la hematopoyesis temprana, mediante la regulación transcripcional de *RUNX1-CBF-β* y *p53* y la regulación de la actividad de *HIPK2*. Su ausencia en los progenitores mieloides conlleva desarrollo leucémico y las deficiencias en *p300* durante la hematopoyesis fetal en ratones produce letalidad, evidenciando su importancia en el proceso de diferenciación mieloide^{260,311,344,347,348,372}.

Debido a dicha importancia de *p300* en la hematopoyesis temprana, su inhibición en muestras neoplásicas con altas proporciones de células mieloides en desarrollo (indiferenciadas) produce efectos drásticos, conduciendo a una parada de ciclo celular y a la entrada en apoptosis, ya que su presencia es estrictamente necesaria para el desarrollo final de los elementos hematopoyéticos^{260,311}. En contraposición, en las células sanas y diferenciadas la función de *p300* no es tan requerida, por lo que su inhibición no causaría dichos efectos, indicando que existe una menor dependencia de las funciones de *EP300* en células hematopoyéticas no neoplásicas, con respecto a las poblaciones celulares leucémicas, donde la función de *EP300* sería más crucial.

En definitiva, los resultados de inhibición de *p300* (junto con los de *HIPK2*) confirman que la manipulación de los elementos reguladores del complejo puede alterar su actividad como unidad funcional. Nuestros resultados concuerdan con las observaciones realizadas en otras neoplasias hematológicas acerca del importante rol de *EP300* en el desarrollo benigno y maligno^{315,371}, añadiendo en este caso la leucemogénesis-post NMP, debido al efecto regulador de *p300* en la transcripción de *RUNX1-CBF-β*^{260,311} y de *TP53*^{316,317}.

La inhibición por separado de *HIPK2*/p300 causa efectos importantes en las funciones del complejo, evidenciando que ambos regulan su actividad. No obstante, puesto que *HIPK2* regula a p300 mediante fosforilación directa²⁶⁰, y éste a su vez regula la estabilidad y actividad de *HIPK2* mediante acetilación³²⁰, cabe preguntarse cuál es exactamente la jerarquía reguladora del complejo, es decir, cuál es la jerarquía existente entre ambos genes *HIPK2* y *EP300*.

La realización en este trabajo de una inhibición doble *HIPK2*-p300 permitía responder a esta cuestión, confirmando que ambos genes son necesarios para la activación de RUNX1 y de p53 a cargo de *HIPK2*. Sin embargo, el hecho de que la supresión de p300 en el contexto de un 50% de inhibición de *HIPK2* conlleve la disminución del 50% restante de su expresión, significaría una función más importante de p300 sobre *HIPK2* de la que se ha descrito al respecto hasta la fecha.

La expresión de *HIPK2* es continuamente regulada mediante modificaciones post-traduccionales³⁷³, siendo una ellas la acetilación a cargo de p300³¹¹. Un estudio anterior demostró que la sobreexpresión de p300 conlleva un incremento de su actividad acetiltransferasa y un incremento de expresión de *HIPK2*, aumentando la vida media de la proteína, protegiéndola de la degradación por ubiquitinación, e incluso potenciando sus efectos en la respuesta ante el daño celular³²⁰. No obstante, dicho estudio explora esta relación únicamente mediante la sobreexpresión de p300 y no mediante su inhibición.

Nuestros resultados demuestran efectivamente cómo en un contexto de expresión normal de *HIPK2*, p300 favorece su expresión debido al aumento de su estabilidad. Por ello observamos cómo la ausencia de p300 inhibe parcialmente la expresión de *HIPK2*. Pero, además, nuestros resultados añaden la observación de que, en un contexto en el que la expresión de *HIPK2* esté ya altamente mermada,

la presencia de p300 se vuelve crucial para mantener su estabilidad y actividad restante, de modo que, si en este contexto p300 es también inhibido, la presencia de HIPK2 desaparece por completo.

Por otra parte, mientras la inhibición de p300 en condiciones normales de expresión de HIPK2 produce efectos funcionales importantes en las células leucémicas, dicha inhibición en ausencia de HIPK2 no provoca los mismos efectos, siendo éstos mucho más atenuados. Ello demuestra que la desaparición de HIPK2 conlleva la incapacidad para mediar el mecanismo de respuesta ante el daño celular causado por C646, el cual depende en última instancia de la presencia de HIPK2.

Se ha visto a lo largo de este trabajo que una de las funciones de *HIPK2* en su asociación con p300 y p53 es la función oncoprotectora^{281,294}, capaz de detectar el daño celular y activar los mecanismos de respuesta mediante la activación de las rutas de apoptosis dependientes de p53^{279,305,310,334} ó influyendo en la capacidad de las células para dejar de dividirse y diferenciarse mediante su interacción con múltiples factores de transcripción como RUNX1-CBF- β o Wnt/ β -catenina^{109,260,300,311}. Por todo ello, es evidente que si p300 es inhibido en presencia de una expresión normal de *HIPK2*, este último actuaría como “gen guardián”, capaz de detectar dicho estrés celular y activar los procesos en respuesta^{316,320}.

Nuestros resultados confirman este hecho. Así pues, en este trabajo proponemos a *HIPK2* como un gen marcador de respuesta al tratamiento con C646. Su presencia causa efectos importantes tras el tratamiento, mientras que su ausencia confiere resistencia a éste.

5.3. TERCER OBJETIVO: ROL DEL COMPLEJO EN LA RESPUESTA FARMACOLÓGICA.

Finalmente, otro de los aspectos novedosos de la presente tesis doctoral fue explorar el efecto de fármacos convencionales para el tratamiento de las NMPs durante el contexto de una inhibición parcial del complejo (inhibición única de p300).

En primer lugar, los experimentos con líneas celulares de LMC permitieron comprobar cómo la terapia convencional (Imatinib) es siempre más efectiva durante el contexto de inhibición de p300 que sin dicha inhibición; y cómo ocurre lo mismo en las células cromosoma Filadelfia negativas en la mayoría de los casos cuando éstas se tratan con las terapias convencionales en presencia de la inhibición de p300.

Estas observaciones podrían dar lugar a pensar que la toxicidad observada tras el tratamiento con las terapias convencionales durante la inhibición de p300 se debe exclusivamente al efecto nocivo que ya tiene por sí sola la inhibición de p300 en las células leucémicas. No obstante, nuestros resultados descartan este hecho y confirman cómo el aumento en la toxicidad observada se debe a la combinación de ambos procesos y no a la inhibición única de p300.

Por otra parte, en muestras celulares de pacientes de LMC, la inhibición de p300 aumenta también la respuesta celular al tratamiento con Imatinib, en la mayoría de los casos analizados.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se concluye que la inhibición parcial del complejo (p300) aumenta los efectos funcionales causados por las terapias convencionales para el tratamiento de las NMPs, Imatinib, Ruxolitinib e Hidroxiurea. Además, se confirma también en muestras humanas el rol del complejo en la

regulación de los mecanismos de respuesta ante los efectos farmacológicos causados en este caso por Imatinib. Todo ello podría explicarse *a priori* debido a dos motivos diferentes.

En primer lugar, cabe la posibilidad de que, puesto que los dos procedimientos por separado producen efectos funcionales relevantes, la suma de ambos produzca el efecto sumatorio resultante, sin que exista ningún otro efecto colateral diferente a dicha suma.

En segundo lugar, debido al importante rol de *HIPK2*, *EP300* y *TP53* en los procesos de respuesta al estrés celular/quimiorresistencia, y a que la supresión de p300 afecta a la función de los tres genes, es posible que la desregulación de los tres componentes de la ruta produzca como efecto adicional, una menor capacidad en las células leucémicas para detectar el daño y responder a él, o lo que es lo mismo, una mayor sensibilidad a las terapias. La desregulación de dicha vía produciría, además, efectos funcionales que propiciarían un mayor daño de los fármacos. Las células tendrían una capacidad de proliferación reducida debido al bloqueo del ciclo celular impidiendo la división y la diferenciación. Todo ello unido al incremento de los procesos apoptóticos causados por la inhibición de p300 propiciaría que las células no tuvieran mecanismos para “evadir” las terapias.

Hemos visto en nuestros resultados como la primera posibilidad, se cumple en algunos de los casos estudiados. No obstante, la gran mayoría de ellos (tanto líneas celulares como muestras de pacientes) no responden a dicho patrón sumatorio. Por ello, cabe insistir en la segunda posibilidad y en el hecho de que la desregulación de la ruta *HIPK2*-p300-p53 esté produciendo efectivamente los efectos anteriormente mencionados.

Se sabe que esta vía es una de las rutas de respuesta al daño en el ADN más importantes en las células, “usando” a HIPK2 como gen “detector” del daño en el ADN y a p53 como gen “ejecutor” de la respuesta apoptótica ante dicho estrés^{279,281,289,294,304,310,358}. De hecho, muchos de los mecanismos de resistencia farmacológica en células cancerígenas se basan en la desregulación de esta vía, siendo p53 el gen más frecuentemente desregulado en cáncer^{253,254,293,323,324,352,357}.

El hecho de incidir en la desregulación de esta ruta, pero manteniendo íntegra la función del gen detector del daño (HIPK2) y del gen efector de la respuesta apoptótica (p53), mediante la supresión de la actividad de un gen regulador de ambos (p300)^{316,318-320}, permite en este caso aumentar los efectos potenciales de respuesta producidos por los fármacos utilizados en estas patologías. En nuestros resultados se explora la desregulación de esta vía de respuesta farmacológica (lo cual ya causa apoptosis por sí solo), unido a la utilización de terapias que causan muy probablemente la participación de la misma vía de actuación para causar sus efectos nocivos en las células. Por ello, nuestros resultados muestran un efecto más potente cuando dichos fármacos son aplicados en presencia de la desregulación de dicha ruta, pero manteniendo íntegra la expresión de HIPK2; demostrando además el papel de HIPK2 como regulador general del complejo, capaz de inducir la apoptosis compensando la desaparición de la vía normal HIPK2-p300-p53.

Nuestros resultados sugieren un posible papel de la inhibición de p300 en el tratamiento de las NMP agudizadas y, el hecho de que C646 sea un inhibidor químico, facilita que pudiera usarse en futuras terapias combinadas. Así, los resultados obtenidos en esta tesis doctoral añaden nuevas posibilidades para el estudio de los mecanismos de respuesta farmacológica en pacientes resistentes a las

terapias, arrojando luz a la posibilidad de realizar nuevos estudios futuros sobre la importancia de la integridad reguladora del complejo en la fisiopatología de los pacientes afectados con NMPs crónicas.

Para concluir, se confirma cómo los cinco genes forman parte de un complejo transcripcional con elevada importancia en los procesos de hematopoyesis y leucemogénesis que ocurren durante la evolución leucémica de las NMPs. Dicho complejo, basa su actividad en las diversas y complejas interacciones entre sus componentes, las cuales determinan en última instancia sus funciones finales.

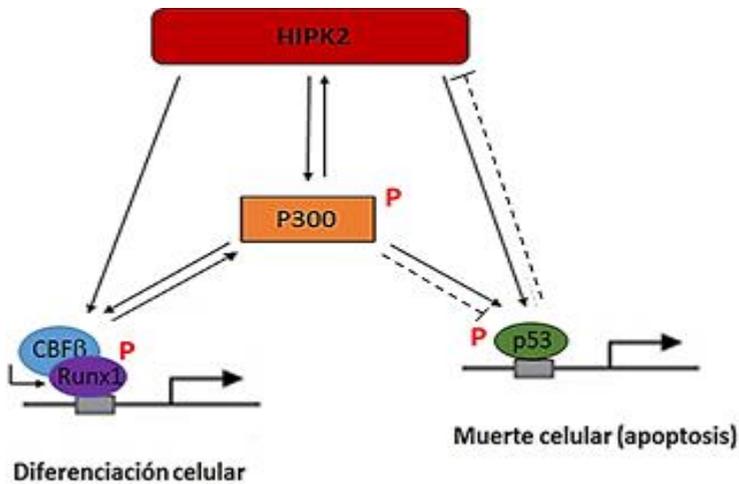


Figura 5.1 Rutas de interacción principales entre los componentes del complejo RUNX1/CBF-β/HIPK2/p300/p53.

Además, este trabajo supone la primera aproximación que conocemos al estudio del papel molecular y funcional de estos cinco genes como parte del citado complejo durante el desarrollo leucémico de las NMPs, explorando su función en los procesos de resistencia farmacológica frente a las terapias usadas en estas patologías y abriendo el camino a futuras investigaciones y posibilidades para el manejo clínico de los pacientes afectados con este tipo de neoplasias.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

A la vista de los resultados obtenidos a lo largo de la fase experimental de nuestro trabajo, se alcanzan las siguientes conclusiones:

- 1- Los genes *RUNX1-CBF- β /HIPK2/p300/p53* forman un complejo transcripcional con relaciones de interdependencia entre ellos, en el que HIPK2 regula mediante fosforilación a los restantes, pero requiere a su vez la función de acetilación de p300 sobre todos ellos.
- 2- El complejo se encuentra expresado y desregulado en las diferentes NMPs agudizadas, lo cual se debe, en gran medida, a la elevada presencia de alteraciones citogenéticas en sus componentes.
- 3- La isoforma *a* de RUNX1 es la isoforma mayoritaria en las NMPs agudizadas, siendo además ésta la diana de fosforilación predominante de HIPK2, en detrimento de las isoformas *b* y *c*.
- 4- La ausencia de *HIPK2* o p300 en el contexto de las NMPs agudizadas conlleva una importante disminución de la proliferación debido a la desregulación del ciclo celular, siendo mayor este efecto si ambos se suprimen simultáneamente.
- 5- *HIPK2* actúa como marcador de respuesta a la supresión de p300, induciendo apoptosis y reduciendo la resistencia farmacológica de las células leucémicas. En cambio, la supresión de *HIPK2* en presencia o no de p300 no conlleva

apoptosis, revelando el papel de *HIPK2* como favorecedor de los procesos apoptóticos.

- 6- La inhibición de p300 en muestras hematopoyéticas sanas no conlleva efectos funcionales, indicando una menor dependencia de p300 en las células no neoplásicas.
- 7- Cuando se reduce la expresión de *HIPK2*, p300 es imprescindible para mantener su estabilidad y actividad en las NMPs agudizadas.
- 8- La desregulación del complejo *RUNX1-CBF- β /HIPK2/p300/p53* en las NMPs favorece el proceso leucemogénico, por lo que su supresión reduce la supervivencia de las células leucémicas, actuando sobre las vías de proliferación, apoptosis y resistencia farmacológica.

7. BIBLIOGRAFÍA

7. Bibliografía

1. Vardiman JW, Ergen Thiele J, Arber DA, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. 2009. doi:10.1182/blood-2009-03-209262
2. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. 2002. doi:10.1182/blood-2002-04-1199
3. Tefferi A, Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: The 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia*. 2008;22:14-22. doi:10.1038/sj.leu.2404955
4. Smith CA, Fan G. The saga of JAK2 mutations and translocations in hematologic disorders: pathogenesis, diagnostic and therapeutic prospects, and revised World Health Organization diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms. *Hum Pathol*. 2008;39(6):795-810. doi:10.1016/j.humpath.2008.02.004
5. Orazi A, Germing U. The myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms: myeloproliferative diseases with dysplastic features. doi:10.1038/leu.2008.119
6. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-2406. doi:10.1182/blood-2016-03-643544.The
7. Thompson PA, Kantarjian HM, Cortes JE. Diagnosis and Treatment of Chronic Myeloid Leukemia in 2015. *Mayo Clin Proc*. 2015;90(10):1440-1454. doi:10.1016/j.mayocp.2015.08.010
8. Tarín-Arzaga L, Gómez-de-León A. Neoplasias mieloproliferativas crónicas Filadelfia negativas. *Fundam Hematol*. 2016:195-203.
9. Campbell PJ, Green AR. The myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2006;355(23):2452-2466. doi:10.1056/NEJMra063728
10. Tefferi A. Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1. *Leukemia*. 2010. doi:10.1038/leu.2010.69

11. Vainchenker W, Delhommeau F, Constantinescu SN, Bernard OA. New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. 2011. doi:10.1182/blood-2011-02-292102
12. Mareschal S, Dubois S, Vially P-J, et al. Telomerase Activity is a Biomarker for High Grade Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors in Neurofibromatosis Type 1 Individuals. *Genes Chromosomes Cancer*. 2012;55(March):238-246. doi:10.1002/gcc
13. Thapa B, Rogers HJ. *Cancer, Myeloproliferative Neoplasms*. StatPearls Publishing; 2019.
14. Vainchenker W, Kralovics R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. *Blood Rev Ser*. 2017. doi:10.1182/blood-2016-10
15. Ferreira Cristina S, Polo B, Lacerda JF. Somatic Mutations in Philadelphia Chromosome-Negative Myeloproliferative Neoplasms. *Semin Hematol*. 2018;55(4):215-222. doi:10.1053/j.seminhematol.2018.04.005
16. Delic S, Rose D, Kern W, et al. Application of an NGS-based 28-gene panel in myeloproliferative neoplasms reveals distinct mutation patterns in essential thrombocythaemia, primary myelofibrosis and polycythaemia vera. *Br J Haematol*. 2016;175(3):419-426. doi:10.1111/bjh.14269
17. Schischlik F, Kralovics R. Mutations in myeloproliferative neoplasms—their significance and clinical use. *Expert Rev Hematol*. 2017;10(11):961-973. doi:10.1080/17474086.2017.1380515
18. Bennett J. Case of hypertrophy of the spleen and liver, which death took place from suppuration of the blood. *Edin Med Surg J*. 1845;64:413-423.
19. Virchow R. Weisses Blut. *Froriep's Notizen*. 1845;36:151-156.
20. Craigie D. Case of disease and enlargement of the spleen in which death took place from the presence of purulent matter in the blood. *Edin Med Surg J*. 1845;64:400-413.
21. Vaquez H. Sur une forme speciale de cyanose s'accompagnant d'hyperglobulie excessive et persistente (On a special form of cyanosis accompanied by excessive and persistent erythrocytosis). *Compt rend Soc biol suppl note, Bull mem Soc med d'hop Paris*. 1892;4:384-388.
22. Heuck G. Zwei Falle von Leukamie mit eigenthumlichem Blutresp.

- Knochenmarksbefund (Two cases of leukemia with peculiar blood and bone marrow findings, respectively). *Arch Pathol Anat Physiol Virchows*. 1879;78:475–496.
23. Osler W. Chronic cyanosis, with polycythemia and enlarged spleen: a new clinical entity. *Am J Med Sci*. 1903;126:187–201.
 24. Epstein E GA. Hamorrhagische thrombozythamie bei vascularer schrumpfmilz (Hemorrhagic thrombocytopenia with a vascular, sclerotic spleen). *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1934;293:233–248.
 25. Neumann E. Ueber die Bedeutung des Knochenmarkes für die Blutbildung. Ein Beitrag zur Entwicklungsgeschichte der Blutkörperchen. *Arch Heilkd*. 1869;10:68–102.
 26. Ehrlich P. Über die Bedeutung der neutrophilen Körnung. *Charite Ann*. 1887;12:288–295.
 27. Vaughan JM HC. Leuco-erythroblastic anaemia and myelosclerosis. *J Pathol Bacteriol*. 1939;48:339–352.
 28. Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood*. 1951;6(4):372–375.
 29. Tefferi A. *The History of Myeloproliferative Disorders: Before and after Dameshek*. Vol 22.; 2008:3–13. doi:10.1038/sj.leu.2404946
 30. Michiels JJ, Berneman Z, Schroyens W, De Raeve H. Changing concepts of diagnostic criteria of myeloproliferative disorders and the molecular etiology and classification of myeloproliferative neoplasms: From Dameshek 1950 to Vainchenker 2005 and beyond. *Acta Haematol*. 2015;133(1):36–51. doi:10.1159/000358580
 31. Tefferi A. Myeloproliferative neoplasms: A decade of discoveries and treatment advances. *Am J Hematol*. 2016;91(1):50–58. doi:10.1002/ajh.24221
 32. Nowell PC, Hungerford DA. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J Natl Cancer Inst*. 1960;25:85–109.
 33. Nowell PC. The minute chromosome (Ph1) in chronic granulocytic leukemia. *Blut*. 1962;8:65–66.
 34. Boveri T. Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren. *Gustav Fischer, Jena*. 1914.
 35. Linder D, Gartler SM. Glucose-6-phosphate dehydrogenase

- mosaicism: utilization as a cell marker in the study of leiomyomas. *Science*. 1965;150(3692):67-69.
36. Fialkow PJ, Gartler SM, Yoshida A. Clonal origin of chronic myelocytic leukemia in man. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1967;58(4):1468-1471. doi:10.1073/pnas.58.4.1468
37. Adamson JW, Fialkow PJ, Murphy S, Prchal JF, Steinmann L. Polycythemia vera: stem-cell and probable clonal origin of the disease. *N Engl J Med*. 1976;295(17):913-916. doi:10.1056/NEJM197610212951702
38. Jacobson RJ, Salo A, Fialkow PJ. Agnogenic myeloid metaplasia: a clonal proliferation of hematopoietic stem cells with secondary myelofibrosis. *Blood*. 1978;51(2):189-194.
39. Fialkow PJ, Faguet GB, Jacobson RJ, Vaidya K, Murphy S. Evidence that essential thrombocythemia is a clonal disorder with origin in a multipotent stem cell. *Blood*. 1981;58(5):916-919.
40. Martin PJ, Najfeld V, Hansen JA, Penfold GK, Jacobson RJ, Fialkow PJ. Involvement of the B-lymphoid system in chronic myelogenous leukaemia. *Nature*. 1980;287(5777):49-50.
41. Raskind WH, Jacobson R, Murphy S, Adamson JW, Fialkow PJ. Evidence for the involvement of B lymphoid cells in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *J Clin Invest*. 1985;75(4):1388-1390. doi:10.1172/JCI111840
42. Wasserman LR. The treatment of polycythemia. A panel discussion. *Blood*. 1968;32(3):483-487.
43. Wasserman LR. Polycythemia Vera Study Group: a historical perspective. *Semin Hematol*. 1986;23(3):183-187.
44. Murphy S, Iland H, Rosenthal D, Laszlo J. Essential thrombocythemia: an interim report from the Polycythemia Vera Study Group. *Semin Hematol*. 1986;23(3):177-182.
45. Rowley JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*. 1973;243(5405):290-293.
46. Heisterkamp N, Groffen J, Stephenson JR, et al. Chromosomal localization of human cellular homologues of two viral oncogenes. *Nature*. 1982;299(5885):747-749.
47. Stam K, Heisterkamp N, Reynolds FH, Groffen J. Evidence that the phl

- gene encodes a 160,000-dalton phosphoprotein with associated kinase activity. *Mol Cell Biol.* 1987;7(5):1955-1960. doi:10.1128/MCB.7.5.1955
48. Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N, de Klein A, Bartram CR, Grosveld G. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell.* 1984;36(1):93-99.
 49. Heisterkamp N, Stam K, Groffen J, de Klein A, Grosveld G. Structural organization of the bcr gene and its role in the Ph' translocation. *Nature.* 1985;315(6022):758-761.
 50. Konopka JB, Watanabe SM, Witte ON. An alteration of the human c-abl protein in K562 leukemia cells unmasks associated tyrosine kinase activity. *Cell.* 1984;37(3):1035-1042.
 51. Ben-Neriah Y, Daley GQ, Mes-Masson AM, Witte ON, Baltimore D. The chronic myelogenous leukemia-specific P210 protein is the product of the bcr/abl hybrid gene. *Science.* 1986;233(4760):212-214.
 52. Erikson J, Griffin CA, ar-Rushdi A, et al. Heterogeneity of chromosome 22 breakpoint in Philadelphia-positive (Ph+) acute lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci.* 1986;83(6):1807-1811. doi:10.1073/pnas.83.6.1807
 53. Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science.* 1990;247(4944):824-830.
 54. Elefanty AG, Hariharan IK, Cory S. bcr-abl, the hallmark of chronic myeloid leukaemia in man, induces multiple haemopoietic neoplasms in mice. *EMBO J.* 1990;9(4):1069-1078.
 55. Kelliher MA, McLaughlin J, Witte ON, Rosenberg N. Induction of a chronic myelogenous leukemia-like syndrome in mice with v-abl and BCR/ABL. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(17):6649-6653. doi:10.1073/pnas.87.17.6649
 56. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med.* 1996;2(5):561-566.
 57. Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, et al. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2006;355(23):2408-2417. doi:10.1056/NEJMoa062867

58. Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, et al. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med*. 2001;344(14):1038-1042. doi:10.1056/NEJM200104053441402
59. Talpaz M, Shah NP, Kantarjian H, et al. Dasatinib in Imatinib-Resistant Philadelphia Chromosome-Positive Leukemias. *N Engl J Med*. 2006;354(24):2531-2541. doi:10.1056/NEJMoa055229
60. Druker BJ. Circumventing resistance to kinase-inhibitor therapy. *N Engl J Med*. 2006;354(24):2594-2596. doi:10.1056/NEJMe068073
61. Kantarjian H, Giles F, Wunderle L, et al. Nilotinib in Imatinib-Resistant CML and Philadelphia Chromosome-Positive ALL. *N Engl J Med*. 2006;354(24):2542-2551. doi:10.1056/NEJMoa055104
62. Barbui T, Tefferi A, Vannucchi AM, et al. Philadelphia chromosome-negative classical myeloproliferative neoplasms: Revised management recommendations from European LeukemiaNet. *Leukemia*. 2018;32(5):1057-1069. doi:10.1038/s41375-018-0077-1
63. James C, Ugo V, Le Couédic J-P, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005;434(7037):1144-1148. doi:10.1038/nature03546
64. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. 2005;7(4):387-397. doi:10.1016/j.ccr.2005.03.023
65. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005;352(17):1779-1790. doi:10.1056/NEJMoa051113
66. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet (London, England)*. 2005;365(9464):1054-1061. doi:10.1016/S0140-6736(05)71142-9
67. Verstovsek S, Silver RT, Cross NCP, Tefferi A. JAK2V617F mutational frequency in polycythemia vera: 100%, >90%, less? *Leukemia*. 2006;20(11):2067-2067. doi:10.1038/sj.leu.2404379
68. Tefferi A, Lasho TL, Schwager SM, et al. The clinical phenotype of wild-type, heterozygous, and homozygous JAK2V617F in polycythemia vera. *Cancer*. 2006;106(3):631-635. doi:10.1002/cncr.21645

69. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, et al. MPLW515L Is a Novel Somatic Activating Mutation in Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia. 2006. doi:10.1371/journal
70. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood*. 2006;108(10):3472-3476. doi:10.1182/blood-2006-04-018879
71. Lasho TL, Pardanani A, McClure RF, et al. Concurrent MPL515 and JAK2V617F mutations in myelofibrosis: chronology of clonal emergence and changes in mutant allele burden over time. *Br J Haematol*. 2006;135(5):683-687. doi:10.1111/j.1365-2141.2006.06348.x
72. Scott LM, Tong W, Levine RL, et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med*. 2007;356(5):459-468. doi:10.1056/NEJMoa065202
73. Pardanani A, Lasho TL, Finke C, Hanson CA, Tefferi A. Prevalence and clinicopathologic correlates of JAK2 exon 12 mutations in JAK2V617F-negative polycythemia vera. *Leukemia*. 2007;21(9):1960-1963. doi:10.1038/sj.leu.2404810
74. Tefferi A, Gilliland DG, Gilliland / D Gary. Oncogenes in Myeloproliferative Disorders Oncogenes in Myeloproliferative Disorders. *Cell Cycle*. 2007;6(5):550-566. doi:10.4161/cc.6.5.3919
75. Tefferi A, Thiele J, Orazi A, et al. Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel. *Blood*. 2007. doi:10.1182/blood-2007-04-083501
76. Tefferi A, Pardanani A. Evaluation of "increased" hemoglobin in the JAK2 mutations era: a diagnostic algorithm based on genetic tests. *Mayo Clin Proc*. 2007;82(5):599-604. doi:10.4065/82.5.599
77. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, et al. Somatic Mutations of Calreticulin in Myeloproliferative Neoplasms. *N Engl J Med*. 2013;369(25):2379-2390. doi:10.1056/NEJMoa1311347
78. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ et al. Somatic CALR Mutations in Myeloproliferative Neoplasms with Nonmutated JAK2. *n engl j med*. 2013. doi:10.1056/NEJMoa1312542

79. Claire N. Harrison and Alessandro M. Vannucchi. Closing the gap: genetic landscape of MPN. *Blood*. 2016;127(3):275-276. doi:10.1182/blood-2015-10-676908
80. Nangalia J, Green AR. Myeloproliferative neoplasms: from origins to outcomes. *Blood*. 2017. doi:10.1182/blood-2017-06
81. Vannucchi AM, Lasho TL, Guglielmelli P, et al. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. *Leukemia*. 2013;27(9):1861-1869. doi:10.1038/leu.2013.119
82. Tefferi A, Lasho TL, Guglielmelli P, et al. Targeted deep sequencing in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Blood Adv*. 2016. doi:10.1182/bloodadvances.2016000216
83. Tefferi A, Pardanani A. Mutations and prognosis in myeloproliferative neoplasms. *Leuk Lymphoma*. 2019;60(5):1112-1113. doi:10.1080/10428194.2018.1537490
84. Li B, Gale RP, Xu Z, et al. Non-driver mutations in myeloproliferative neoplasm-associated myelofibrosis. *J Hematol Oncol*. 2017;10(1):99. doi:10.1186/s13045-017-0472-5
85. Tefferi A, Vannucchi AM. Genetic Risk Assessment in Myeloproliferative Neoplasms. *Mayo Clin Proc*. 2017;92(8):1283-1290. doi:10.1016/j.mayocp.2017.06.002
86. Grinfeld J, Nangalia J, Baxter EJ, et al. Classification and Personalized Prognosis in Myeloproliferative Neoplasms. *N Engl J Med*. 2018;379(15):1416-1430. doi:10.1056/NEJMoa1716614
87. Maslah N, Cassinat B, Verger E, Kiladjian JJ, Velazquez L. The role of LNK/SH2B3 genetic alterations in myeloproliferative neoplasms and other hematological disorders. *Leukemia*. 2017;31(8):1661-1670. doi:10.1038/leu.2017.139
88. Milosevic JD, Puda A, Malcovati L, et al. Clinical significance of genetic aberrations in secondary acute myeloid leukemia. *Am J Hematol*. 2012;87(11):1010-1016. doi:10.1002/ajh.23309
89. Delhommeau F, Dupont S, Valle V Della, et al. Mutation in *TET2* in Myeloid Cancers. *N Engl J Med*. 2009;360(22):2289-2301. doi:10.1056/NEJMoa0810069
90. Busque L, Patel JP, Figueroa ME, et al. Recurrent somatic *TET2* mutations in normal elderly individuals with clonal hematopoiesis. *Nat Genet*. 2012;44(11):1179-1181. doi:10.1038/ng.2413

91. Xie M, Lu C, Wang J, et al. Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. *Nat Med*. 2014;20(12):1472-1478. doi:10.1038/nm.3733
92. Steensma DP, Bejar R, Jaiswal S, et al. Perspectives Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2015. doi:10.1182/blood-2015-03-631747
93. Stegelmann F, Bullinger L, Schlenk RF, et al. DNMT3A mutations in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2011;25(7):1217-1219. doi:10.1038/leu.2011.77
94. Abdel-Wahab O, Pardanani A, Rampal R, Lasho TL, Levine RL, Tefferi A. DNMT3A mutational analysis in primary myelofibrosis, chronic myelomonocytic leukemia and advanced phases of myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2011;25(7):1219-1220. doi:10.1038/leu.2011.82
95. Tefferi A, Lasho TL, Abdel-Wahab O, et al. IDH1 and IDH2 mutation studies in 1473 patients with chronic-, fibrotic- or blast-phase essential thrombocythemia, polycythemia vera or myelofibrosis. *Leukemia*. 2010;24(7):1302-1309. doi:10.1038/leu.2010.113
96. Green A, Beer P. Somatic Mutations of *IDH1* and *IDH2* in the Leukemic Transformation of Myeloproliferative Neoplasms. *N Engl J Med*. 2010;362(4):369-370. doi:10.1056/NEJMc0910063
97. Pardanani A, Lasho TL, Finke CM, Mai M, McClure RF, Tefferi A. IDH1 and IDH2 mutation analysis in chronic- and blast-phase myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2010;24(6):1146-1151. doi:10.1038/leu.2010.77
98. Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, et al. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell*. 2010;18(6):553-567. doi:10.1016/j.ccr.2010.11.015
99. Tefferi A, Jimma T, Sulai NH, et al. IDH mutations in primary myelofibrosis predict leukemic transformation and shortened survival: clinical evidence for leukemogenic collaboration with JAK2V617F. *Leukemia*. 2012;26(3):475-480. doi:10.1038/leu.2011.253
100. Shih AH, Abdel-Wahab O, Patel JP, Levine RL. The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(9):599-612. doi:10.1038/nrc3343

101. Guglielmelli P, Biamonte F, Score J, et al. EZH2 mutational status predicts poor survival in myelofibrosis. *Blood*. 2011;118(19):5227-5234. doi:10.1182/blood-2011-06-363424
102. Lasho TL, Finke CM, Hanson CA, et al. SF3B1 mutations in primary myelofibrosis: clinical, histopathology and genetic correlates among 155 patients. *Leukemia*. 2012;26(5):1135-1137. doi:10.1038/leu.2011.320
103. Boiocchi L, Hasserjian RP, Pozdnyakova O, et al. Clinicopathological and molecular features of SF3B1-mutated myeloproliferative neoplasms. *Hum Pathol*. 2019;86:1-11. doi:10.1016/j.humpath.2018.11.022
104. Szymańska J, Smolewski P, Majchrzak A, Cebula-Obrzut B, Chojnowski K, Treliński J. Pro-Apoptotic Activity of Ruxolitinib Alone and in Combination with Hydroxyurea, Busulphan, and PI3K/mTOR Inhibitors in JAK2-Positive Human Cell Lines. *Adv Clin Exp Med*. 2015;24(2):195-202.
105. Lasho TL, Jimma T, Finke CM, et al. SRSF2 mutations in primary myelofibrosis: significant clustering with IDH mutations and independent association with inferior overall and leukemia-free survival. *Blood*. 2012;120(20):4168-4171. doi:10.1182/blood-2012-05-429696
106. Zhang S-J, Rampal R, Manshouri T, et al. Genetic analysis of patients with leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms shows recurrent SRSF2 mutations that are associated with adverse outcome. *Blood*. 2012. doi:10.1182/blood-2011-11-390252
107. Tosi S, Scherer SW, Giudici G, Czepulkowski B, Biondi A, Kearney L. Delineation of multiple deleted regions in 7q in myeloid disorders. *Genes Chromosomes Cancer*. 1999;25(4):384-392.
108. Klampfl T, Harutyunyan A, Berg T, et al. Genome integrity of myeloproliferative neoplasms in chronic phase and during disease progression. *Blood*. 2011. doi:10.1182/blood-2011-01-331678
109. Lam K, Zhang D-E. *RUNX1 and RUNX1-ETO: Roles in Hematopoiesis and Leukemogenesis*. Vol 17.; 2012. doi:10.2741/3977
110. Yanagida M, Osato M, Yamashita N, et al. Increased dosage of Runx1/AML1 acts as a positive modulator of myeloid leukemogenesis in BXH2 mice. *Oncogene*. 2005;24(28):4477-4485. doi:10.1038/sj.onc.1208675

111. Ding Y, Harada Y, Imagawa J, Kimura A, Harada H. Brief report AML1/RUNX1 point mutation possibly promotes leukemic transformation in myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2009. doi:10.1182/blood-2009-06
112. Goyama S, Schibler J. Transcription factor RUNX1 promotes survival of acute myeloid leukemia cells. *J Clin Invest*. 2013;123(9):3876-3888. doi:10.1172/JCI68557DS1
113. Jutzi JS, Bogeska R, Nikoloski G, et al. MPN patients harbor recurrent truncating mutations in transcription factor NF-E2. *J Exp Med*. 2013;210(5):1003-1019. doi:10.1084/jem.20120521
114. Mutschler M, Magin AS, Buerge M, et al. NF-E2 overexpression delays erythroid maturation and increases erythrocyte production. *Br J Haematol*. 2009;146(2):203-217. doi:10.1111/j.1365-2141.2009.07742.x
115. Wang W, Schwemmers S, Hexner EO, Pahl HL. MYELOID NEOPLASIA AML1 is overexpressed in patients with myeloproliferative neoplasms and mediates JAK2 V617F-independent overexpression of NF-E2. 2010. doi:10.1182/blood-2009-11-254664
116. Kaufmann KB, Gründer A, Hadlich T, et al. A novel murine model of myeloproliferative disorders generated by overexpression of the transcription factor NF-E2. *J Exp Med*. 2012;209(1):35-50. doi:10.1084/jem.20110540
117. Aumann K, Frey A-V, May AM, et al. Subcellular mislocalization of the transcription factor NF-E2 in erythroid cells discriminates prefibrotic primary myelofibrosis from essential thrombocythemia. *Blood*. 2013;122(1):93-99. doi:10.1182/blood-2012-11-463257
118. Ferri C, Weich N, Gutiérrez L, et al. Single nucleotide polymorphism in PTEN-Long gene: A risk factor in chronic myeloid leukemia. *Gene*. 2019;694:71-75. doi:10.1016/j.gene.2019.01.038
119. Cottin L, Riou J, Boyer F, et al. WT1 gene is overexpressed in myeloproliferative neoplasms, especially in myelofibrosis. *Blood Cells, Mol Dis*. 2019;75(October 2018):35-40. doi:10.1016/j.bcmd.2018.12.004
120. Lally J, Boasman K, Brown L, et al. GATA-1: A potential novel biomarker for the differentiation of essential thrombocythemia and myelofibrosis. *J Thromb Haemost*. 2019. doi:10.1111/jth.14433
121. Lundberg P, Karow A, Nienhold R, et al. Clonal evolution and clinical

- correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2014;123(14):2220-2228. doi:10.1182/blood
122. Kralovics R, Teo S-S, Li S, et al. Acquisition of the V617F mutation of JAK2 is a late genetic event in a subset of patients with myeloproliferative disorders. *Blood*. 2006;108(4):1377-1380. doi:10.1182/blood-2005-11-009605
123. Ortmann CA, Kent DG, Nangalia J, et al. Effect of mutation order on myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med*. 2015;372(7):601-612. doi:10.1056/NEJMoa1412098
124. Nangalia J, Nice FL, Wedge DC, et al. DNMT3A mutations occur early or late in patients with myeloproliferative neoplasms and mutation order influences phenotype. *Haematologica*. 2015;100(11):e438-e442. doi:10.3324/haematol.2015.129510
125. Passamonti F, Mora B, Maffioli M. New molecular genetics in the diagnosis and treatment of myeloproliferative neoplasms. *Curr Opin Hematol*. 2016;23(2):137-143. doi:10.1097/MOH.0000000000000218
126. Zhou A, Afzal A, Oh ST, Oh S. Prognostication in Philadelphia Chromosome Negative Myeloproliferative Neoplasms: A review of the recent literature. *Curr Hematol Malig Rep*. 2017;12(5):397-405. doi:10.1007/s11899-017-0401-2
127. Caponetti GC, Bagg A. Genetic studies in the evaluation of myeloproliferative neoplasms. *Semin Hematol*. 2019;56(1):7-14. doi:10.1053/j.seminhematol.2018.05.004
128. Hehlmann R, Hochhaus A, Baccarani M, European LeukemiaNet. Chronic myeloid leukaemia. *Lancet (London, England)*. 2007;370(9584):342-350. doi:10.1016/S0140-6736(07)61165-9
129. Bower H, Björkholm M, Dickman PW, Höglund M, Lambert PC, Andersson TM-L. Life Expectancy of Patients With Chronic Myeloid Leukemia Approaches the Life Expectancy of the General Population. *J Clin Oncol*. 2016;34(24):2851-2857. doi:10.1200/JCO.2015.66.2866
130. Huang X, Cortes J, Kantarjian H. Estimations of the increasing prevalence and plateau prevalence of chronic myeloid leukemia in the era of tyrosine kinase inhibitor therapy. *Cancer*. 2012;118(12):3123-3127. doi:10.1002/cncr.26679
131. Höglund M, Sandin F, Simonsson B. Epidemiology of chronic myeloid leukaemia: an update. *Ann Hematol*. 2015;94(S2):241-247.

doi:10.1007/s00277-015-2314-2

132. Hochhaus A, Saussele S, Rosti G, et al. Chronic myeloid leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2017;28(February):iv41-iv51. doi:10.1093/annonc/mdx219
133. Sasaki K, Strom SS, O'Brien S, et al. Prospective Analysis: Relative Survival in Patients with Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase in the Era of Tyrosine Kinase Inhibitors. *Lancet Haematol.* 2015. doi:10.1016/S2352-3026(15)00048-4
134. O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2003;348(11):994-1004. doi:10.1056/NEJMoa022457
135. Hochhaus A, Larson RA, Guilhot F, et al. Long-Term Outcomes of Imatinib Treatment for Chronic Myeloid Leukemia. *N Engl J Med.* 2017;376(10):917-927. doi:10.1056/NEJMoa1609324
136. Preudhomme C, Guilhot J, Nicolini FE, et al. Imatinib plus peginterferon alfa-2a in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2010;363(26):2511-2521. doi:10.1056/NEJMoa1004095
137. Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood.* 2013;122(6). doi:10.1182/blood-2013-05
138. Lipton JH, Chuah C, Guerci-Bresler A, et al. Ponatinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukaemia: an international, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2016;17(5):612-621. doi:10.1016/S1470-2045(16)00080-2
139. Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2014 update on diagnosis, monitoring, and management. *Am J Hematol.* 2014;89(5):547-556. doi:10.1002/ajh.23691
140. O'Brien S, Radich JP, Abboud CN, et al. Chronic myelogenous leukemia, version 1.2015. *J Natl Compr Canc Netw.* 2014;12(11):1590-1610.
141. Tefferi A, Barbui T. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2019 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol.* 2019;94(1):133-143. doi:10.1002/ajh.25303

142. Tefferi A, Barbui T. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2017 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol.* 2017;92(1):94-108. doi:10.1002/ajh.24607
143. Tefferi A, Rumi E, Finazzi G, et al. Survival and prognosis among 1545 patients with contemporary polycythemia vera: an international study. *Leukemia.* 2013;27(9):1874-1881. doi:10.1038/leu.2013.163
144. Szuber N, Vallapureddy RR, Penna D, et al. Myeloproliferative neoplasms in the young: Mayo Clinic experience with 361 patients age 40 years or younger. *Am J Hematol.* 2018;93(12):1474-1484. doi:10.1002/ajh.25270
145. Barbui T, Thiele J, Vannucchi AM, Tefferi A. Rationale for revision and proposed changes of the WHO diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia and primary myelofibrosis. *Blood Cancer J.* 2015;5(8):e337. doi:10.1038/bcj.2015.64
146. Demuyneck T, Verhoef G, Delforge M, Vandenberghe P, Devos T. Polycythemia vera and hydroxyurea resistance/intolerance: a monocentric retrospective analysis. *Ann Hematol.* 2019;98(6):1421-1426. doi:10.1007/s00277-019-03654-6
147. Berk P, Wasserman LR, Fruchtman S GJ. Treatment of polycythemia vera: a summary of clinical trials conducted by the polycythemia vera study group. In Wasserman LR, Berk PD, Berlin BI, editors. *Polycythemia vera and the myeloproliferative disorders.* Philadelphia WB Saunders company. 1995:Pages 166-192.
148. Barosi G, Birgegard G, Finazzi G, et al. A unified definition of clinical resistance and intolerance to hydroxycarbamide in polycythaemia vera and primary myelofibrosis: results of a European LeukemiaNet (ELN) consensus process. *Br J Haematol.* 2010;148(6):961-963. doi:10.1111/j.1365-2141.2009.08019.x
149. Vannucchi AM. Ruxolitinib versus Standard Therapy for the Treatment of Polycythemia Vera. *N Engl J Med.* 2015;372(17):1670-1671. doi:10.1056/NEJMc1502524
150. Treatment of polycythaemia vera by radiophosphorus or busulphan: A randomized trial. *Br J Cancer.* 1981;44(1):75-80. doi:10.1038/bjc.1981.150
151. Kiladjian J-J, Cassinat B, Chevret S, et al. Pegylated interferon-alfa-2a induces complete hematologic and molecular responses with low toxicity in polycythemia vera. *Blood.* 2008;112(8):3065-3072.

doi:10.1182/blood-2008-03-143537

152. Quintás-Cardama A, Kantarjian H, Manshouri T, et al. Pegylated interferon alfa-2a yields high rates of hematologic and molecular response in patients with advanced essential thrombocythemia and polycythemia vera. *J Clin Oncol.* 2009;27(32):5418-5424. doi:10.1200/JCO.2009.23.6075
153. Alvarez-Larrán A, Martínez-Avilés L, Hernández-Boluda JC, et al. Busulfan in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia refractory or intolerant to hydroxyurea. *Ann Hematol.* 2014;93(12):2037-2043. doi:10.1007/s00277-014-2152-7
154. Alvarez-Larrán A, Bellosillo B, Pereira A, et al. JAK2V617F monitoring in polycythemia vera and essential thrombocythemia: clinical usefulness for predicting myelofibrotic transformation and thrombotic events. *Am J Hematol.* 2014;89(5):517-523. doi:10.1002/ajh.23676
155. Passamonti F, Rumi E, Pietra D, et al. A prospective study of 338 patients with polycythemia vera: the impact of JAK2 (V617F) allele burden and leukocytosis on fibrotic or leukemic disease transformation and vascular complications. *Leukemia.* 2010;24(9):1574-1579. doi:10.1038/leu.2010.148
156. Besses C, Hernández-Boluda JC, Pérez Encinas M, et al. Current opinion and consensus statement regarding the diagnosis, prognosis, and treatment of patients with essential thrombocythemia: a survey of the Spanish Group of Ph-negative Myeloproliferative Neoplasms (GEMFIN) using the Delphi method. *Ann Hematol.* 2016;95(5):719-732. doi:10.1007/s00277-016-2614-1
157. Harrison CN, Butt N, Campbell P, et al. Modification of British Committee for Standards in Haematology diagnostic criteria for essential thrombocythaemia. *Br J Haematol.* 2014;167(3):421-423. doi:10.1111/bjh.12986
158. Elala YC, Lasho TL, Gangat N, et al. Calreticulin variant stratified driver mutational status and prognosis in essential thrombocythemia. *Am J Hematol.* 2016;91(5):503-506. doi:10.1002/ajh.24338
159. Gangat N, Tefferi A, Thanarajasingam G, et al. Cytogenetic abnormalities in essential thrombocythemia: prevalence and prognostic significance. *Eur J Haematol.* 2009;83(1):17-21. doi:10.1111/j.1600-0609.2009.01246.x
160. Jovanovic J V, Ivey A, Vannucchi AM, et al. Establishing optimal

- quantitative-polymerase chain reaction assays for routine diagnosis and tracking of minimal residual disease in JAK2-V617F-associated myeloproliferative neoplasms: a joint European LeukemiaNet/MPN&MPNr-EuroNet (COST action BM0902). *Leukemia*. 2013;27(10):2032-2039. doi:10.1038/leu.2013.219
161. Thiele J, Kvasnicka HM, Müllauer L, Buxhofer-Ausch V, Gisslinger B, Gisslinger H. Essential thrombocythemia versus early primary myelofibrosis: a multicenter study to validate the WHO classification. *Blood*. 2011;117(21):5710-5718. doi:10.1182/blood-2010-07-293761
162. Cortelazzo S, Finazzi G, Ruggeri M, et al. Hydroxyurea for Patients with Essential Thrombocythemia and a High Risk of Thrombosis. *N Engl J Med*. 1995;332(17):1132-1137. doi:10.1056/NEJM199504273321704
163. Hernández-Boluda J-C, Alvarez-Larrán A, Gómez M, et al. Clinical evaluation of the European LeukaemiaNet criteria for clinicohaematological response and resistance/intolerance to hydroxycarbamide in essential thrombocythaemia. *Br J Haematol*. 2011;152(1):81-88. doi:10.1111/j.1365-2141.2010.08430.x
164. Gisslinger H, Gotic M, Holowiecki J, et al. Anagrelide compared with hydroxyurea in WHO-classified essential thrombocythemia: the ANAHYDRET Study, a randomized controlled trial. *Blood*. 2013;121(10):1720-1728. doi:10.1182/blood-2012-07-443770
165. Barbui T, Barosi G, Birgegard G, et al. Philadelphia-negative classical myeloproliferative neoplasms: critical concepts and management recommendations from European LeukemiaNet. *J Clin Oncol*. 2011;29(6):761-770. doi:10.1200/JCO.2010.31.8436
166. Barosi G, Mesa RA, Thiele J, et al. Proposed criteria for the diagnosis of post-polycythemia vera and post-essential thrombocythemia myelofibrosis: a consensus statement from the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Leukemia*. 2008;22(2):437-438. doi:10.1038/sj.leu.2404914
167. Rumi E, Pietra D, Pascutto C, et al. Clinical effect of driver mutations of JAK2, CALR, or MPL in primary myelofibrosis. *Blood*. 2014;124(7):1062-1069. doi:10.1182/blood-2014-05-578435
168. Kröger NM, Deeg JH, Olavarria E, et al. Indication and management of allogeneic stem cell transplantation in primary myelofibrosis: a consensus process by an EBMT/ELN international working group. *Leukemia*. 2015;29(11):2126-2133. doi:10.1038/leu.2015.233
169. Cervantes F. How I treat myelofibrosis. *Blood*. 2014;124(17):2635-

2642. doi:10.1182/blood-2014-07-575373

170. Martínez-Trillos A, Gaya A, Maffioli M, et al. Efficacy and tolerability of hydroxyurea in the treatment of the hyperproliferative manifestations of myelofibrosis: results in 40 patients. *Ann Hematol.* 2010;89(12):1233-1237. doi:10.1007/s00277-010-1019-9
171. Verstovsek S, Mesa RA, Gotlib J, et al. A Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of Ruxolitinib for Myelofibrosis. *N Engl J Med.* 2012;366(9):799-807. doi:10.1056/NEJMoa1110557
172. Harrison C, Kiladjian J-J, Al-Ali HK, et al. JAK inhibition with ruxolitinib versus best available therapy for myelofibrosis. *N Engl J Med.* 2012;366(9):787-798. doi:10.1056/NEJMoa1110556
173. Yogarajah M, Tefferi A. Leukemic Transformation in Myeloproliferative Neoplasms: A Literature Review on Risk, Characteristics, and Outcome. *Mayo Clin Proc.* 2017;92(7):1118-1128. doi:10.1016/j.mayocp.2017.05.010
174. Schmidt M, Rinke J, Schäfer V, et al. Molecular-defined clonal evolution in patients with chronic myeloid leukemia independent of the BCR-ABL status. 2014. doi:10.1038/leu.2014.272
175. Hehlmann R, Sauße S, Voskanyan A, Silver RT. Management of CML-blast crisis. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2016;29(3):295-307. doi:10.1016/j.beha.2016.10.005
176. Kantarjian HM, Dixon D, Keating MJ, et al. Characteristics of accelerated disease in chronic myelogenous leukemia. *Cancer.* 1988;61(7):1441-1446. doi:10.1002/1097-0142(19880401)61:7<1441::aid-cnrcr2820610727>3.0.co;2-c
177. Söderlund S, Dahlén T, Sandin F, et al. Advanced phase chronic myeloid leukaemia (CML) in the tyrosine kinase inhibitor era - a report from the Swedish CML register. *Eur J Haematol.* 2017;98(1):57-66. doi:10.1111/ejh.12785
178. Cervantes F, López-Guillermo A, Bosch F, Terol MJ, Rozman C, Montserrat E. An assessment of the clinicohematological criteria for the accelerated phase of chronic myeloid leukemia. *Eur J Haematol.* 1996;57(4):286-291.
179. Urbano-Ispizua A, Cervantes F, Matutes E, et al. Immunophenotypic characteristics of blast crisis of chronic myeloid leukaemia: correlations with clinico-biological features and survival. *Leukemia.* 1993;7(9):1349-1354.

180. Deininger MW. Diagnosing and Managing Advanced Chronic Myeloid Leukemia. *Am Soc Clin Oncol Educ B*. 2015;35:e381-e388. doi:10.14694/EdBook_AM.2015.35.e381
181. Calabretta B, Perrotti D. The biology of CML blast crisis. *Blood*. 2004;103(11):4010-4022. doi:10.1182/blood-2003-12-4111
182. Tan S-Y, Ooi A-S, Ang M-K, et al. A deep-sequencing study of chronic myeloid leukemia patients in blast crisis (BC-CML) detects mutations in 76.9% of cases. *Leukemia*. 2011;25:557-560. doi:10.1038/leu.2010.298
183. Ertz-Archambault N, Kelemen K. Relapse and cytogenetic evolution in myeloid neoplasms. *Panminerva Med*. 2017;59(4):308-319. doi:10.23736/S0031-0808.17.03380-8
184. Chen Z, Shao C, Wang W, et al. Cytogenetic landscape and impact in blast phase of chronic myeloid leukemia in the era of tyrosine kinase inhibitor therapy. *Leukemia*. 2017;31(3):585-592. doi:10.1038/leu.2016.231
185. Molica M, Massaro F, Breccia M. Diagnostic and prognostic cytogenetics of chronic myeloid leukaemia: an update. *Expert Rev Mol Diagn*. 2017;17(11):1001-1008. doi:10.1080/14737159.2017.1383156
186. Bedi A, Barber JP, Bedi GC, et al. BCR-ABL-mediated inhibition of apoptosis with delay of G2/M transition after DNA damage: a mechanism of resistance to multiple anticancer agents. *Blood*. 1995;86(3):1148-1158.
187. Fabarius A, Leitner A, Hochhaus A, et al. Impact of additional cytogenetic aberrations at diagnosis on prognosis of CML: long-term observation of 1151 patients from the randomized CML Study IV. 2011. doi:10.1182/blood-2011
188. Wang W, Cortes JE, Tang G, et al. Risk stratification of chromosomal abnormalities in chronic myelogenous leukemia in the era of tyrosine kinase inhibitor therapy Key Points. *Blood*. 2016;127(22). doi:10.1182/blood-2016-01
189. Soverini S, Hochhaus A, Nicolini FE, et al. BCR-ABL kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet. *Blood*. 2011;118(5):1208-1215. doi:10.1182/blood-2010-12-326405

190. Neubauer A, He M, Schmidt CA, Huhn D, Liu ET. Genetic alterations in the p53 gene in the blast crisis of chronic myelogenous leukemia: analysis by polymerase chain reaction based techniques. *Leukemia*. 1993;7(4):593-600.
191. Nakai H, Misawa S. Chromosome 17 abnormalities and inactivation of the p53 gene in chronic myeloid leukemia and their prognostic significance. *Leuk Lymphoma*. 1995;19(3-4):213-221. doi:10.3109/10428199509107891
192. Sill H, Goldman JM, Cross NC. Homozygous deletions of the p16 tumor-suppressor gene are associated with lymphoid transformation of chronic myeloid leukemia. *Blood*. 1995;85(8):2013-2016.
193. Brusa G, Benvenuti M, Mazzacurati L, et al. p53 loss of function enhances genomic instability and accelerates clonal evolution of murine myeloid progenitors expressing the p(210)BCR-ABL tyrosine kinase. *Haematologica*. 2003;88(6):622-630.
194. Calabretta B, Perrotti D. Review in translational hematology The biology of CML blast crisis. 2004. doi:10.1182/blood-2003
195. Trotta R, Vignudelli T, Candini O, et al. BCR/ABL activates mdm2 mRNA translation via the La antigen. *Cancer Cell*. 2003;3(2):145-160.
196. Levav-Cohen Y, Goldberg Z, Zuckerman V, Grossman T, Haupt S, Haupt Y. C-Abl as a modulator of p53. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;331(3):737-749. doi:10.1016/j.bbrc.2005.03.152
197. Soverini S, Martinelli G, Rosti G, et al. ABL mutations in late chronic phase chronic myeloid leukemia patients with up-front cytogenetic resistance to imatinib are associated with a greater likelihood of progression to blast crisis and shorter survival: A study by the GIMEMA working party on chr. *J Clin Oncol*. 2005;23(18):4100-4109. doi:10.1200/JCO.2005.05.531
198. Asimakopoulos FA, Shteper PJ, Krichevsky S, et al. ABL1 methylation is a distinct molecular event associated with clonal evolution of chronic myeloid leukemia. *Blood*. 1999;94(7):2452-2460.
199. Zion M, Ben-Yehuda D, Avraham A, et al. Progressive de novo DNA methylation at the bcr-abl locus in the course of chronic myelogenous leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(22):10722-10726. doi:10.1073/pnas.91.22.10722
200. Malinen T, Palotie A, Pakkala S, Peltonen L, Ruutu T, Jansson SE. Acceleration of chronic myeloid leukemia correlates with calcitonin

- gene hypermethylation. *Blood*. 1991;77(11):2435-2440.
201. Xu D, Hong W, Wang S. [Relationship between blast crisis of chronic myeloid leukemias and abnormality of p16 and calcitonin genes]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*. 2000;22(2):151-153.
202. Xie X-H, Chen Z-Z, Zhang X-M, Huang M-Q. [Detecting methylation of the calcitonin gene in monitoring treatment and disease evolution for myelogenous leukemia]. *Ai Zheng*. 2003;22(6):616-619.
203. Gaidano G, Serra A, Guerrasio A, Rege-Cambrin G, Mazza U, Saglio G. Genetic analysis of p53 and RB1 tumor-suppressor genes in blast crisis of chronic myeloid leukemia. *Ann Hematol*. 1994;68(1):3-7.
204. Radich JP. The Biology of CML Blast Crisis. *Hematology*. 2007;2007(1):384-391. doi:10.1182/asheducation-2007.1.384
205. Zhao L-J, Wang Y-Y, Li G, et al. MYELOID NEOPLASIA Functional features of RUNX1 mutants in acute transformation of chronic myeloid leukemia and their contribution to inducing murine full-blown leukemia. 2012. doi:10.1182/blood-2011-08-370981
206. Tsai SC, Shih LY, Liang ST, et al. Biological activities of RUNX1 mutants predict secondary acute leukemia transformation from chronic myelomonocytic leukemia and myelodysplastic syndromes. *Clin Cancer Res*. 2015;21(15):3541-3551. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-2203
207. Salem A, Loghavi S, Tang G, et al. Myeloid neoplasms with concurrent BCR-ABL1 and CFBF rearrangements: A series of 10 cases of a clinically aggressive neoplasm. *Am J Hematol*. 2017;92(6):520-528. doi:10.1002/ajh.24710
208. Elmaagacli AH, Beelen DW, Opalka B, Seeber S, Schaefer UW. The amount of BCR-ABL fusion transcripts detected by the real-time quantitative polymerase chain reaction method in patients with Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia correlates with the disease stage. *Ann Hematol*. 2000;79(8):424-431.
209. Gaiger A, Henn T, Hörth E, et al. Increase of bcr-abl chimeric mRNA expression in tumor cells of patients with chronic myeloid leukemia precedes disease progression. *Blood*. 1995;86(6):2371-2378.
210. Dahéron L, Salmeron S, Patri S, et al. Identification of several genes differentially expressed during progression of chronic myelogenous leukemia. *Leukemia*. 1998;12(3):326-332.

211. Jennings BA, Mills KI. c-myc locus amplification and the acquisition of trisomy 8 in the evolution of chronic myeloid leukaemia. *Leuk Res.* 1998;22(10):899-903.
212. Preisler HD, Agarwal R, Sato H, Singh PK, Wang ZQ, Sandberg AA. Studies of proto-oncogene expression in the chronic and blastic phases of chronic myelogenous leukemia. *Eur J Cancer.* 1990;26(9):960-965.
213. Sharma N, Magistroni V, Piazza R, et al. BCR/ABL1 and BCR are under the transcriptional control of the MYC oncogene. *Mol Cancer.* 2015;14(1):132. doi:10.1186/s12943-015-0407-0
214. Albajar M, Gomez-Casares MT, Llorca J, et al. MYC in Chronic Myeloid Leukemia: Induction of Aberrant DNA Synthesis and Association with Poor Response to Imatinib. *Mol Cancer Res.* 2011;9(5):564-576. doi:10.1158/1541-7786.MCR-10-0356
215. Ogawa S, Kurokawa M, Tanaka T, et al. Increased Evi-1 expression is frequently observed in blastic crisis of chronic myelocytic leukemia. *Leukemia.* 1996;10(5):788-794.
216. Nucifora G. The EVI1 gene in myeloid leukemia. *Leukemia.* 1997;11(12):2022-2031.
217. Carapeti M, Goldman JM, Cross NC. Overexpression of EVI-1 in blast crisis of chronic myeloid leukemia. *Leukemia.* 1996;10(9):1561.
218. Cuenco GM, Ren R. Cooperation of BCR-ABL and AML1/MDS1/EVI1 in blocking myeloid differentiation and rapid induction of an acute myelogenous leukemia. *Oncogene.* 2001;20(57):8236-8248. doi:10.1038/sj.onc.1205095
219. Cortez D, Stoica G, Pierce JH, Pendergast AM. The BCR-ABL tyrosine kinase inhibits apoptosis by activating a Ras-dependent signaling pathway. *Oncogene.* 1996;13(12):2589-2594.
220. Goga A, McLaughlin J, Afar DE, Saffran DC, Witte ON. Alternative signals to RAS for hematopoietic transformation by the BCR-ABL oncogene. *Cell.* 1995;82(6):981-988.
221. Mayotte N, Roy D-C, Yao J, Kroon E, Sauvageau G. Oncogenic interaction between BCR-ABL and NUP98-HOXA9 demonstrated by the use of an in vitro purging culture system. *Blood.* 2002;100:4177-4184. doi:10.1182/blood-2002-04-1244
222. Zhang S-J, Ma L-Y, Huang Q-H, et al. Gain-of-function mutation of

- GATA-2 in acute myeloid transformation of chronic myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(6):2076-2081. doi:10.1073/pnas.0711824105
223. Deutsch E. BCR-ABL down-regulates the DNA repair protein DNA-PKcs. *Blood*. 2001;97(7):2084-2090. doi:10.1182/blood.V97.7.2084
224. Deutsch E, Jarrousse S, Buet D, et al. Down-regulation of BRCA1 in BCR-ABL-expressing hematopoietic cells. *Blood*. 2003;101(11):4583-4588. doi:10.1182/blood-2002-10-3011
225. Gordon MY, Dazzi F, Marley SB, et al. Cell biology of CML cells. *Leukemia*. 1999;13 Suppl 1:S65-71.
226. Cambier N, Chopra R, Strasser A, Metcalf D, Elefanty AG. BCR-ABL activates pathways mediating cytokine independence and protection against apoptosis in murine hematopoietic cells in a dose-dependent manner. *Oncogene*. 1998;16(3):335-348. doi:10.1038/sj.onc.1201490
227. Verstovsek S, Kantarjian H, Manshour T, et al. Increased telomerase activity is associated with shorter survival in patients with chronic phase chronic myeloid leukemia. *Cancer*. 2003;97(5):1248-1252. doi:10.1002/cncr.11217
228. Boulwood J, Peniket A, Watkins F, et al. Telomere length shortening in chronic myelogenous leukemia is associated with reduced time to accelerated phase. *Blood*. 2000;96(1):358-361.
229. Ohyashiki JH, Iwama H, Hayashi S, Shay JW TK. Telomerase activity and cytogenetic changes in chronic myeloid leukemia with disease progression. *Leukemia*. 1997.
230. Perrotti D, Cesi V, Trotta R, et al. BCR-ABL suppresses C/EBPalpha expression through inhibitory action of hnRNP E2. *Nat Genet*. 2002;30(1):48-58. doi:10.1038/ng791
231. Tavor S, Park DJ, Gery S, Vuong PT, Gombart AF, Koeffler HP. Restoration of C/EBPalpha expression in a BCR-ABL+ cell line induces terminal granulocytic differentiation. *J Biol Chem*. 2003;278(52):52651-52659. doi:10.1074/jbc.M307077200
232. Jamieson CHM, Ailles LE, Dylla SJ, et al. Granulocyte-Macrophage Progenitors as Candidate Leukemic Stem Cells in Blast-Crisis CML. *N Engl J Med*. 2004;351(7):657-667. doi:10.1056/NEJMoa040258
233. Selleri C, Maciejewski JP. The Role of FAS-Mediated Apoptosis in Chronic Myelogenous Leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2000;37(3-4):283-

297. doi:10.3109/10428190009089429
234. Pierson BA, Miller JS. The Role of Autologous Natural Killer Cells in Chronic Myelogenous Leukemia. *Leuk Lymphoma*. 1997;27(5-6):387-399. doi:10.3109/10428199709058306
235. Koptyra M, Falinski R, Nowicki MO, et al. BCR/ABL kinase induces self-mutagenesis via reactive oxygen species to encode imatinib resistance. *Blood*. 2006. doi:10.1182/blood-2005-07-2815
236. Iurlo A, Cattaneo D, Gianelli U. Blast Transformation in Myeloproliferative Neoplasms: Risk Factors, Biological Findings, and Targeted Therapeutic Options. *Int J Mol Sci*. 2019;20(8):1839. doi:10.3390/ijms20081839
237. Badar T, Kantarjian HM, Ravandi F, et al. Therapeutic benefit of decitabine, a hypomethylating agent, in patients with high-risk primary myelofibrosis and myeloproliferative neoplasm in accelerated or blastic/acute myeloid leukemia phase. *Leuk Res*. 2015;39(9):950-956. doi:10.1016/j.leukres.2015.06.001
238. Eghtedar A, Verstovsek S, Estrov Z, et al. Phase 2 study of the JAK kinase inhibitor ruxolitinib in patients with refractory leukemias, including postmyeloproliferative neoplasm acute myeloid leukemia. *Blood*. 2012;119(20):4614-4618. doi:10.1182/blood-2011-12-400051
239. Kennedy JA, Atenafu EG, Messner HA, et al. Treatment outcomes following leukemic transformation in Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2013;121(14):2725-2733. doi:10.1182/blood-2012-10-464248
240. Tam CS, Nussenzveig RM, Papat U, et al. The natural history and treatment outcome of blast phase BCR-ABL- myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2008;112(5):1628-1637. doi:10.1182/blood-2008-02-138230
241. Venton G, Courtier F, Charbonnier A, et al. Impact of gene mutations on treatment response and prognosis of acute myeloid leukemia secondary to myeloproliferative neoplasms. *Am J Hematol*. 2018;93(3):330-338. doi:10.1002/ajh.24973
242. Beer PA, Delhommeau F, Lecoué J-P, et al. Two routes to leukemic transformation after a JAK2 mutation-positive myeloproliferative neoplasm. *Blood*. 2010;115(14):2891-2900. doi:10.1182/blood-2009-08-236596
243. Kim SY, Koo M, Park Y, et al. Cytogenetic evolution in

- myeloproliferative neoplasms with different molecular abnormalities. *Blood Cells, Mol Dis.* 2019;77(February):120-128. doi:10.1016/j.bcmd.2019.04.007
244. Lasho TL, Mudireddy M, Finke CM, et al. Targeted next-generation sequencing in blast phase myeloproliferative neoplasms. *Blood Advances.* 2018. doi:10.1182/bloodadvances.2018015875
245. Mcnamara CJ, Panzarella T, Kennedy JA, et al. The mutational landscape of accelerated-and blast-phase myeloproliferative neoplasms impacts patient outcomes. *Blood Advances.* 2018. doi:10.1182/bloodadvances.2018021469
246. Spiegel JY, McNamara C, Kennedy JA, et al. Impact of genomic alterations on outcomes in myelofibrosis patients undergoing JAK1/2 inhibitor therapy. *Blood Adv.* 2017;1(20):1729-1738. doi:10.1182/bloodadvances.2017009530
247. Tefferi A. Mutations galore in myeloproliferative neoplasms: Would the real Spartacus please stand up? *Leukemia.* 2011;25(7):1059-1063. doi:10.1038/leu.2011.92
248. Abdel-Wahab O, Manshouri T, Patel J, et al. Genetic analysis of transforming events that convert chronic myeloproliferative neoplasms to leukemias. *Cancer Res.* 2010;70(2):447-452. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3783
249. Harutyunyan A, Klampfl T, Cazzola M, Kralovics R. p53 Lesions in Leukemic Transformation. *N Engl J Med.* 2011;364(5):488-490. doi:10.1056/NEJMc1012718
250. Jäger R, Gisslinger H, Passamonti F, et al. Deletions of the transcription factor Ikaros in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia.* 2010;24:1290-1298. doi:10.1038/leu.2010.99
251. Abdel-Wahab O, Manshouri T, Patel J, et al. Genetic Analysis of Transforming Events That Convert Chronic Myeloproliferative Neoplasms to Leukemias. *Cancer Res.* 2010;70(2):447-452. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3783
252. Hyde RK, Liu P, Friedman AD. RUNX1 and CBF β Mutations and Activities of Their Wild-Type Alleles in AML. 2017;962. doi:10.1007/978-981-10-3233-2
253. Levine AJ, Oren M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(10):749-758. doi:10.1038/nrc2723

254. Di Agostino S, Fontemaggi G, Strano S, Blandino G, D'orazi G. Targeting mutant p53 in cancer: the latest insights. 2019. doi:10.1186/s13046-019-1302-0
255. Levine AJ, Finlay CA, Hinds PW. P53 is a Tumor Suppressor Gene. *Cell*. 2004;116:67-69.
256. Lozano G. The oncogenic roles of p53 mutants in mouse models. *Curr Opin Genet Dev*. 2007;17(1):66-70. doi:10.1016/j.gde.2006.12.003
257. Ding Y, Harada Y, Imagawa J, Kimura A, Harada H. AML1/RUNX1 point mutation possibly promotes leukemic transformation in myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2009;114(25). doi:10.1182/blood-2008-03-077966
258. Okuda T, Van Deursen J, Hiebert SW. *AML1, the Target of Multiple Chromosomal Translocations in Human Leukemia, Is Essential for Normal Fetal Liver Hematopoiesis*. Vol 84.; *Cell*. 1996.
259. Wang Q, Stacy T, Miller JD, et al. The CBFbeta subunit is essential for CBFalpha2 (AML1) function in vivo. *Cell*. 1996;87(4):697-708. doi:10.1016/s0092-8674(00)81389-6
260. Wee H-J, Chih-Cheng Voon D, Bae S-C, Ito Y. PEBP2-/CBF-dependent phosphorylation of RUNX1 and p300 by HIPK2: implications for leukemogenesis. *Blood*. 2008. doi:10.1182/blood-2008-01-134122
261. Tanaka T, Tanaka K, Ogawa S, et al. An acute myeloid leukemia gene, AML1, regulates hemopoietic myeloid cell differentiation and transcriptional activation antagonistically by two alternative spliced forms. *EMBO J*. 1995;14(2):341-350.
262. Sun W. Haploinsufficiency of AML1 results in a decrease in the number of LTR-HSCs while simultaneously inducing an increase in more mature progenitors. *Blood*. 2004;104(12):3565-3572. doi:10.1182/blood-2003-12-4349
263. Growney JD, Shigematsu H, Li Z, et al. Loss of Runx1 perturbs adult hematopoiesis and is associated with a myeloproliferative phenotype. *Blood*. 2005;106(2):494-504. doi:10.1182/blood-2004-08-3280
264. Ichikawa M, Asai T, Saito T, et al. AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. *Nat Med*. 2004;10(3):299-304. doi:10.1038/nm997

265. Ichikawa M, Goyama S, Asai T, et al. AML1/Runx1 negatively regulates quiescent hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. *J Immunol.* 2008;180(7):4402-4408. doi:10.4049/jimmunol.180.7.4402
266. Jacob B, Osato M, Yamashita N, et al. Stem cell exhaustion due to Runx1 deficiency is prevented by Evi5 activation in leukemogenesis. *Blood.* 2010;115(8):1610-1620. doi:10.1182/blood-2009-07-232249
267. Motoda L, Osato M, Yamashita N, et al. *Runx1* Protects Hematopoietic Stem/Progenitor Cells from Oncogenic Insult. *Stem Cells.* 2007;25(12):2976-2986. doi:10.1634/stemcells.2007-0061
268. Liu X, Zhang Q, Zhang D-E, et al. Overexpression of an isoform of AML1 in acute leukemia and its potential role in leukemogenesis. *Leukemia.* 2009;23(4):739-745. doi:10.1038/leu.2008.350
269. Sakurai H, Harada Y, Ogata Y, et al. Overexpression of RUNX1 short isoform has an important role in the development of myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood Adv.* 2017;1(18):1382-1386. doi:10.1182/bloodadvances.2016002725
270. Real PJ, Navarro-Montero O, Ramos-Mejía V, et al. The role of RUNX1 isoforms in hematopoietic commitment of human pluripotent stem cells. *Blood.* 2013;121(26):5250-5252. doi:10.1182/blood-2013-03-487587
271. Levanon D, Glusman G, Bangsow T, et al. Architecture and anatomy of the genomic locus encoding the human leukemia-associated transcription factor RUNX1/AML1. *Gene.* 2001;262(1-2):23-33. doi:10.1016/s0378-1119(00)00532-1
272. Grant A, Challen MAG. Runx1 Isoforms Show Differential Expression Patterns During Hematopoietic Development But Have Similar Functional Effects in Adult Hematopoietic Stem Cells. *Exp Hematol.* 2011;38(5):403-416. doi:10.1016/j.exphem.2010.02.011.Runx1
273. Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2016 update on diagnosis, therapy, and monitoring. *Am J Hematol.* 2016;91(2):252-265. doi:10.1002/ajh.24275
274. Challen GA, Goodell MA. Runx1 isoforms show differential expression patterns during hematopoietic development but have similar functional effects in adult hematopoietic stem cells. *Exp Hematol.* 2010;38(5):403-416. doi:10.1016/j.exphem.2010.02.011
275. Komeno Y, Yan M, Matsuura S, et al. Runx1 exon 6–related alternative splicing isoforms differentially regulate hematopoiesis in mice. *Blood.*

- 2014;123(24):3760-3769. doi:10.1182/BLOOD-2013-08-521252
276. Guo H, Ma O, Speck NA, Friedman AD. Runx1 deletion or dominant inhibition reduces Cebpa transcription via conserved promoter and distal enhancer sites to favor monopoiesis over granulopoiesis. *Blood*. 2012;119(19):4408-4418. doi:10.1182/blood-2011-12-397091
277. Ran D, Shia W-J, Lo M-C, et al. RUNX1a enhances hematopoietic lineage commitment from human embryonic stem cells and inducible pluripotent stem cells. *Blood*. 2013;121(15):2882-2890. doi:10.1182/BLOOD-2012-08-451641
278. Tsuzuki S, Seto M. Expansion of functionally defined mouse hematopoietic stem and progenitor cells by a short isoform of RUNX1/AML1. *Blood*. 2012;119(3):727-735. doi:10.1182/blood-2011-06-362277
279. Puca R, Nardinocchi L, Givol D, D'Orazi G. Regulation of p53 activity by HIPK2: molecular mechanisms and therapeutical implications in human cancer cells. *Oncogene*. 2010;29(31):4378-4387. doi:10.1038/onc.2010.183
280. Hernández-Boluda J-C, Pereira A, Cervantes F, et al. A polymorphism in the XPD gene predisposes to leukemic transformation and new nonmyeloid malignancies in essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Myeloid Neoplasia*. 2012. doi:10.1182/blood-2012-02-411215
281. Feng Y, Zhou L, Sun X, Li Q. *Homeodomain-Interacting Protein Kinase 2 (HIPK2): A Promising Target for Anti-Cancer Therapies*. Vol 8.; *Oncotarget*. 2017.
282. Mielcarek M, Bryant E, Loken M, Zaucha JM, Torok-storb B, Storb R. To the editor : More on Myb in myelofibrosis : molecular analyses of MYB and EP300 in 55 patients with myeloproliferative disorders. *Blood*. 2006;107(4):1733-1735. www.bloodjournal.org.
283. Andersen CL, Hasselbalch H, Grønbaek K. Lack of somatic mutations in the catalytic domains of CREBBP and EP300 genes implies a role for histone deacetylase inhibition in myeloproliferative neoplasms. *Leuk Res*. 2012;36(4):485-487. doi:10.1016/j.leukres.2011.11.018
284. Li X-L, Arai Y, Harada H, et al. Mutations of the HIPK2 gene in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome impair AML1-and p53-mediated transcription. *Oncogene*. 2007;26:7231-7239. doi:10.1038/sj.onc.1210523

285. Kim YH, Choi CY, Lee S-J, Conti MA, Kim Y. Homeodomain-interacting Protein Kinases, a Novel Family of Co-repressors for Homeodomain Transcription Factors. *J Biol Chem.* 1998;273(40):25875-25879. doi:10.1074/jbc.273.40.25875
286. Sung KS, Go YY, Ahn J-H, Kim YH, Kim Y, Choi CY. Differential interactions of the homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2) by phosphorylation-dependent sumoylation. *FEBS Lett.* 2005;579(14):3001-3008. doi:10.1016/j.febslet.2005.04.053
287. Hofmann TG, Mincheva A, Lichter P, Dröge W, Schmitz ML. Human homeodomain-interacting protein kinase-2 (HIPK2) is a member of the DYRK family of protein kinases and maps to chromosome 7q32-q34. *Biochimie.* 2000;82(12):1123-1127.
288. Calzado MA, Renner F, Roscic A, Schmitz ML. HIPK2: a versatile switchboard regulating the transcription machinery and cell death. *Cell Cycle.* 2007;6(2):139-143. doi:10.4161/cc.6.2.3788
289. Rinaldo C, Prodosmo A, Siepi F, Soddu S. HIPK2: a multitasking partner for transcription factors in DNA damage response and development. *Biochem Cell Biol.* 2007;85(4):411-418. doi:10.1139/O07-071
290. Hofmann TG, Möller A, Sirma H, et al. Regulation of p53 activity by its interaction with homeodomain-interacting protein kinase-2. *Nat Cell Biol.* 2002;4(1):1-10. doi:10.1038/ncb715
291. Kim E-J, Park J-S, Um S-J. Identification and Characterization of HIPK2 Interacting with p73 and Modulating Functions of the p53 Family *in Vivo.* *J Biol Chem.* 2002;277(35):32020-32028. doi:10.1074/jbc.M200153200
292. Gresko E, Ritterhoff S, Sevilla-Perez J, et al. PML tumor suppressor is regulated by HIPK2-mediated phosphorylation in response to DNA damage. *Oncogene.* 2009;28(5):698-708. doi:10.1038/onc.2008.420
293. Zhang X-P, Liu F, Wang W. Interplay between Mdm2 and HIPK2 in the DNA damage response. *J R Soc Interface.* 2014;11(96):20140319. doi:10.1098/rsif.2014.0319
294. D'Orazi G, Rinaldo C, Soddu S. Updates on HIPK2: a resourceful oncosuppressor for clearing cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2012;31(1):63. doi:10.1186/1756-9966-31-63
295. De la Vega L, Grishina I, Moreno R, Krüger M, Braun T, Schmitz ML. A Redox-Regulated SUMO/Acetylation Switch of HIPK2 Controls the

- Survival Threshold to Oxidative Stress. *Mol Cell*. 2012;46(4):472-483. doi:10.1016/j.molcel.2012.03.003
296. Hailemariam K, Iwasaki K, Huang B-W, Sakamoto K, Tsuji Y. Transcriptional regulation of ferritin and antioxidant genes by HIPK2 under genotoxic stress. *J Cell Sci*. 2010;123(22):3863-3871. doi:10.1242/jcs.073627
297. Iacovelli S, Ciuffini L, Lazzari C, et al. HIPK2 is involved in cell proliferation and its suppression promotes growth arrest independently of DNA damage. *Cell Prolif*. 2009;42(3):373-384. doi:10.1111/j.1365-2184.2009.00601.x
298. Valente D, Bossi G, Moncada A, et al. HIPK2 deficiency causes chromosomal instability by cytokinesis failure and increases tumorigenicity. *Oncotarget*. 2015;6(12):10320-10334. doi:10.18632/oncotarget.3583
299. Hattangadi SM, Burke KA, Lodish HF. Homeodomain-interacting protein kinase 2 plays an important role in normal terminal erythroid differentiation. *Blood*. 2010;115(23):4853-4861. doi:10.1182/blood-2009-07-235093
300. Kim E-A, Kim JE, Sung KS, Choi DW, Lee BJ, Choi CY. Homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2) targets β -catenin for phosphorylation and proteasomal degradation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;394(4):966-971. doi:10.1016/j.bbrc.2010.03.099
301. Zhou L, Feng Y, Jin Y, et al. Verbascoside promotes apoptosis by regulating HIPK2-p53 signaling in human colorectal cancer. *BMC Cancer*. 2014;14(1):747. doi:10.1186/1471-2407-14-747
302. Wang L, Gao S, Jiang W, et al. Antioxidative dietary compounds modulate gene expression associated with apoptosis, DNA repair, inhibition of cell proliferation and migration. *Int J Mol Sci*. 2014;15(9):16226-16245. doi:10.3390/ijms150916226
303. D'Orazi G, Cecchinelli B, Bruno T, et al. Homeodomain-interacting protein kinase-2 phosphorylates p53 at Ser 46 and mediates apoptosis. *Nat Cell Biol*. 2002;4(1):11-19. doi:10.1038/ncb714
304. Dauth I, Krüger J, Hofmann TG. Homeodomain-Interacting Protein Kinase 2 Is the Ionizing Radiation-Activated p53 Serine 46 Kinase and Is Regulated by ATM. 2007. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2884
305. Zhang Q, Yoshimatsu Y, Hildebrand J, Frisch SM, Goodman RH. Homeodomain interacting protein kinase 2 promotes apoptosis by

- downregulating the transcriptional corepressor CtBP. *Cell*. 2003;115(2):177-186. doi:10.1016/s0092-8674(03)00802-x
306. Lazzari C, Prodosmo A, Siepi F, et al. HIPK2 phosphorylates Δ np63 α and promotes its degradation in response to DNA damage. *Oncogene*. 2011;30(48):4802-4813. doi:10.1038/onc.2011.182
307. Rinaldo C, Prodosmo A, Mancini F, et al. MDM2-Regulated Degradation of HIPK2 Prevents p53Ser46 Phosphorylation and DNA Damage-Induced Apoptosis. *Mol Cell*. 2007;25(5):739-750. doi:10.1016/j.molcel.2007.02.008
308. Di Stefano V, Mattiussi M, Sacchi A, D'Orazi G. HIPK2 inhibits both MDM2 gene and protein by, respectively, p53-dependent and independent regulations. *FEBS Lett*. 2005;579(25):5473-5480. doi:10.1016/j.febslet.2005.09.008
309. Polonio-Vallon T, Kirkpatrick J, Krijgsveld J, Hofmann TG. Src kinase modulates the apoptotic p53 pathway by altering HIPK2 localization. *Cell Cycle*. 2014;13(1):115-125. doi:10.4161/cc.26857
310. Mao J-H, Wu D, Kim I-J, et al. Hipk2 cooperates with p53 to suppress γ -ray radiation-induced mouse thymic lymphoma. *Oncogene*. 2011;31:1176-1180. doi:10.1038/onc.2011.306
311. Aikawa Y, Nguyen LA, Isono K, et al. Roles of HIPK1 and HIPK2 in AML1- and p300-dependent transcription, hematopoiesis and blood vessel formation. *EMBO J*. 2006;25(17):3955-3965. doi:10.1038/sj.emboj.7601273
312. Eckner R, Ewen ME, Newsome D, et al. Molecular cloning and functional analysis of the adenovirus E1A-associated 300-kD protein (p300) reveals a protein with properties of a transcriptional adaptor. *Genes Dev*. 1994;8(8):869-884. doi:10.1101/gad.8.8.869
313. Ogryzko V V, Schiltz RL, Russanova V, Howard BH, Nakatani Y. The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell*. 1996;87(5):953-959. doi:10.1016/s0092-8674(00)82001-2
314. Kasper LH, Boussouar F, Ney PA, et al. A transcription-factor-binding surface of coactivator p300 is required for haematopoiesis. *Nature*. 2002;419(6908):738-743. doi:10.1038/nature01062
315. Giotopoulos G, Chan W-I, Horton SJ, et al. The epigenetic regulators CBP and p300 facilitate leukemogenesis and represent therapeutic targets in acute myeloid leukemia. *Oncogene*. 2016;35(3):279-289.

doi:10.1038/onc.2015.92

316. Puca R, Nardinocchi L, Sacchi A, Rechavi G, Givol D, D'orazi G. HIPK2 modulates p53 activity towards pro-apoptotic transcription. 2009. doi:10.1186/1476-4598-8-85
317. Avantiaggiati ML, Ogryzko V, Gardner K, Giordano A, Levine AS, Kelly K. Recruitment of p300/CBP in p53-dependent signal pathways. *Cell*. 1997;89(7):1175-1184. doi:10.1016/s0092-8674(00)80304-9
318. Livengood JA, Scoggin KES, Van Orden K, et al. p53 Transcriptional Activity Is Mediated through the SRC1-interacting Domain of CBP/p300. *J Biol Chem*. 2002;277(11):9054-9061. doi:10.1074/jbc.M108870200
319. Grossman SR, Perez M, Kung AL, et al. p300/MDM2 complexes participate in MDM2-mediated p53 degradation. *Mol Cell*. 1998;2(4):405-415.
320. Choi JR, Lee SY, Shin KS, Choi CY, Kang SJ. P300-mediated acetylation increased the protein stability of HIPK2 and enhanced its tumor suppressor function. *Sci Rep*. 2017;7(1):1-9. doi:10.1038/s41598-017-16489-w
321. Pear WS, Nolan GP, Scott ML, Baltimore D. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(18):8392-8396. doi:10.1073/pnas.90.18.8392
322. Pear WS, Scott ML, Nolan GP. Generation of high-titer, helper-free retroviruses by transient transfection. *Methods Mol Med*. 1997;7:41-57. doi:10.1385/0-89603-484-4:41
323. Meek DW. Regulation of the p53 response and its relationship to cancer. *Biochem J*. 2015;469(3):325-346. doi:10.1042/BJ20150517
324. Liu Y, Tavana O, Gu W. p53 modifications: exquisite decorations of the powerful guardian. *J Mol Cell Biol*. July 2019. doi:10.1093/jmcb/mjz060
325. Sankunny M, Eng C. KLLN-mediated DNA damage-induced apoptosis is associated with regulation of p53 phosphorylation and acetylation in breast cancer cells. *Cell death Discov*. 2018;4:31. doi:10.1038/s41420-018-0094-x
326. Goyama S, Huang G, Kurokawa M, Mulloy JC. Posttranslational modifications of RUNX1 as potential anticancer targets. *Oncogene*. 2015;34(27):3483-3492. doi:10.1038/onc.2014.305

327. Bae SC, Lee YH. Phosphorylation, acetylation and ubiquitination: The molecular basis of RUNX regulation. *Gene*. 2006;366(1):58-66. doi:10.1016/j.gene.2005.10.017
328. Blumenthal E, Greenblatt S, Huang G, Ando K, Xu Y, Nimer SD. Covalent Modifications of RUNX Proteins: Structure Affects Function. *Adv Exp Med Biol*. 2017;962:33-44. doi:10.1007/978-981-10-3233-2_3
329. Sakaguchi K, Herrera JE, Saito S, et al. DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes Dev*. 1998;12(18):2831-2841. doi:10.1101/gad.12.18.2831
330. Akagi T, Ogawa S, Dugas M, et al. Frequent genomic abnormalities in acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome with normal karyotype. *Haematologica*. 2009;94(2):213-223. doi:10.3324/haematol.13024
331. Chen G, Liu A, Xu Y, et al. The RUNX1-ETO fusion protein transactivates c-KIT expression by recruiting histone acetyltransferase P300 on its promoter. *FEBS J*. 2019;286(5):901-912. doi:10.1111/febs.14751
332. Downing JR. AML1/CBFbeta transcription complex: its role in normal hematopoiesis and leukemia. *Leukemia*. 2001;15(4):664-665. doi:10.1038/sj/leu/2402035
333. Ichikawa M, Asai T, Saito T, et al. AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. *Nat Med*. 2004;10(3):299-304. doi:10.1038/nm997
334. Wang Y, Debatin K-M, Hug H. HIPK2 overexpression leads to stabilization of p53 protein and increased p53 transcriptional activity by decreasing Mdm2 protein levels. *BMC Mol Biol*. 2001;2(1):8. doi:10.1186/1471-2199-2-8
335. Beck Z, Kiss A, Tóth FD, et al. Alterations of *P53* and *RB* Genes and the Evolution of the Accelerated Phase of Chronic Myeloid Leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2000;38(5-6):587-597. doi:10.3109/10428190009059278
336. Jasek M, Gondek LP, Bejanyan N, et al. TP53 mutations in myeloid malignancies are either homozygous or hemizygous due to copy number-neutral loss of heterozygosity or deletion of 17p. *Leukemia*. 2010;24(1):216-219. doi:10.1038/leu.2009.189

337. Nibourel O, Guihard S, Roumier C, et al. Copy-number analysis identified new prognostic marker in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2017;31(3):555-564. doi:10.1038/leu.2016.265
338. Li L, Qi XL, Chen XH, et al. Identification of RUNX1 gene breakage and copy number variation in acute myeloid leukemia. *Int J Lab Hematol*. 2016;38(2):e23-6. doi:10.1111/ijlh.12452
339. Kutlay NY, Pekpak E, Altiner S, et al. Prognostic impact of RUNX1 and ETV6 gene copy number on pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with or without hyperdiploidy. *Int J Hematol*. 2016;104(3):368-377. doi:10.1007/s12185-016-2034-y
340. Rucker FG, Schlenk RF, Bullinger L, et al. TP53 alterations in acute myeloid leukemia with complex karyotype correlate with specific copy number alterations, monosomal karyotype, and dismal outcome. *Blood*. 2012;119(9):2114-2121. doi:10.1182/blood-2011-08-375758
341. Svobodova K, Zemanova Z, Lhotska H, et al. Copy number neutral loss of heterozygosity at 17p and homozygous mutations of TP53 are associated with complex chromosomal aberrations in patients newly diagnosed with myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*. 2016;42:7-12. doi:10.1016/j.leukres.2016.01.009
342. Qian M, Zhang H, Kham SKY, et al. Whole-transcriptome sequencing identifies a distinct subtype of acute lymphoblastic leukemia with predominant genomic abnormalities of EP300 and CREBBP. *Genome Res*. 2017. doi:10.1101/gr.209163.116
343. Uttarkar S, Dassé E, Coulibaly A, et al. Targeting acute myeloid leukemia with a small molecule inhibitor of the Myb/p300 interaction. *Blood*. 2016;127(9):1173-1182. doi:10.1182/blood-2015-09-668632
344. Cheng G, Liu F, Asai T, et al. Loss of p300 accelerates MDS-associated leukemogenesis. *Leukemia*. 2017;31(6):1382-1390. doi:10.1038/leu.2016.347
345. Uttarkar S, Piontek T, Dukare S, et al. Small-molecule disruption of the Myb/p300 cooperation targets acute myeloid leukemia cells. *Mol Cancer Ther*. 2016;15(12):2905-2915. doi:10.1158/1535-7163.MCT-16-0185
346. Therapeutics T, Biology C. Generation of a Selective Small Molecule Inhibitor of the CBP/p300 Bromodomain for Leukemia Therapy. 2015. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-0236

347. Man N, Nimer SD. p300 suppresses leukemia development in NUP98-HOXD13 driven myelodysplastic syndrome. *Oncotarget*. 2018;9(42):26603-26604. doi:10.18632/oncotarget.23402
348. Pattabiraman DR, McGirr C, Shakhbazov K, et al. Interaction of c-Myb with p300 is required for the induction of acute myeloid leukemia (AML) by human AML oncogenes. *Blood*. 2014;123(17):2682-2690. doi:10.1182/blood-2012-02-413187
349. Britos-Bray M, Ramirez M, Cao W, et al. CBF-SMMHC, Expressed in M4eo Acute Myeloid Leukemia, Reduces p53 Induction and Slows Apoptosis in Hematopoietic Cells Exposed to DNA-Damaging Agents. *Blood*. 1998;92(11).
350. Cao W, Britos-Bray M, Claxton DF, et al. CBF β -SMMHC, expressed in M4Eo AML, reduced CBF DNA-binding and inhibited the G1 to S cell cycle transition at the restriction point in myeloid and lymphoid cells. *Oncogene*. 1997;15(11):1315-1327. doi:10.1038/sj.onc.1201305
351. Nardinocchi L, Puca R, D’Orazi G. HIF-1 α antagonizes p53-mediated apoptosis by triggering HIPK2 degradation. *Aging (Albany NY)*. 2011;3(1):33-43. doi:10.18632/aging.100254
352. Puca R, Nardinocchi L, Porru M, et al. Restoring p53 active conformation by zinc increases the response of mutant p53 tumor cells to anticancer drugs. *Cell Cycle*. 2011;10(10):1679-1689. doi:10.4161/cc.10.10.15642
353. Margalit O, Simon AJ, Yakubov E, et al. Zinc supplementation augments in vivo antitumor effect of chemotherapy by restoring p53 function. *Int J cancer*. 2012;131(4):E562-8. doi:10.1002/ijc.26441
354. Tan X, Tang H, Bi J, Li N, Jia Y. MicroRNA-222-3p associated with Helicobacter pylori targets HIPK2 to promote cell proliferation, invasion, and inhibits apoptosis in gastric cancer. *J Cell Biochem*. 2018;119(7):5153-5162. doi:10.1002/jcb.26542
355. Zhang M, Zhang M-Z, Wen S-H, et al. The distribution and time-dependent expression of HIPK2 during the repair of contused skeletal muscle in mice. *Histol Histopathol*. 2019;34(7):745-753. doi:10.14670/HH-18-072
356. Liu F, Li N, Liu Y, Zhang J, Zhang J, Wang Z. Homeodomain interacting protein kinase-2 phosphorylates FOXM1 and promotes FOXM1-mediated tumor growth in renal cell carcinoma. *J Cell Biochem*. 2019;120(6):10391-10401. doi:10.1002/jcb.28323

357. Qin Y, Hu Q, Ji S, et al. Homeodomain-interacting protein kinase 2 suppresses proliferation and aerobic glycolysis via ERK/cMyc axis in pancreatic cancer. *Cell Prolif.* 2019;52(3):e12603. doi:10.1111/cpr.12603
358. Wook Choi D, Yong Choi C. HIPK2 modification code for cell death and survival. *Mol Cell Oncol.* 2014;1(2):e955999. doi:10.1080/23723548.2014.955999
359. Shi D, Dai C, Qin J, Gu W. Negative regulation of the p300-p53 interplay by DDX24. *Oncogene.* 2016;35(4):528-536. doi:10.1038/onc.2015.77
360. Magni M, Buscemi G, Maita L, et al. TSPYL2 is a novel regulator of SIRT1 and p300 activity in response to DNA damage. *Cell Death Differ.* 2019;26(5):918-931. doi:10.1038/s41418-018-0168-6
361. Oh M, Lee JH, Moon H, Hyun YJ, Lim HS. A Chemical Inhibitor of the Skp2/p300 Interaction that Promotes p53-Mediated Apoptosis. *Angew Chemie - Int Ed.* 2016;55(2):602-606. doi:10.1002/anie.201508716
362. Chipuk JE, Green DR. p53's believe it or not: lessons on transcription-independent death. *J Clin Immunol.* 2003;23(5):355-361. doi:10.1023/a:1025365432325
363. Liu B, Bhatt D, Oltvai ZN, Greenberger JS, Bahar I. Significance of p53 dynamics in regulating apoptosis in response to ionizing radiation, and polypharmacological strategies. *Sci Rep.* 2014;4. doi:10.1038/srep06245
364. He H, Lai Y, Hao Y, et al. Selective p300 inhibitor C646 inhibited HPV E6-E7 genes, altered glucose metabolism and induced apoptosis in cervical cancer cells. *Eur J Pharmacol.* 2017;812:206-215. doi:10.1016/j.ejphar.2017.06.005
365. Luff SA, Kao C-Y, Papoutsakis ET. Role of p53 and transcription-independent p53-induced apoptosis in shear-stimulated megakaryocytic maturation, particle generation, and platelet biogenesis. *PLoS One.* 2018;13(9):e0203991. doi:10.1371/journal.pone.0203991
366. Steele AJ, Prentice AG, Hoffbrand AV, et al. p53-mediated apoptosis of CLL cells: evidence for a transcription-independent mechanism. *Blood.* 2008;112(9):3827-3834. doi:10.1182/blood-2008-05-156380
367. Hofmann TG, Glas C, Bitomsky N. HIPK2: A tumour suppressor that

- controls DNA damage-induced cell fate and cytokinesis. *Bioessays*. 2013;35(1):55-64. doi:10.1002/bies.201200060
368. Bitomsky N, Hofmann TG. Apoptosis and autophagy: Regulation of apoptosis by DNA damage signalling - Roles of p53, p73 and HIPK2. *FEBS J.* 2009;276(21):6074-6083. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07331.x
369. Picaud S, Fedorov O, Thanasopoulou A, et al. Generation of a Selective Small Molecule Inhibitor of the CBP/p300 Bromodomain for Leukemia Therapy. *Cancer Res.* 2015;75(23):5106-5119. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-0236
370. Oike T, Komachi M, Ogiwara H, et al. C646, a selective small molecule inhibitor of histone acetyltransferase p300, radiosensitizes lung cancer cells by enhancing mitotic catastrophe. *Radiother Oncol.* 2014;111(2):222-227. doi:10.1016/j.radonc.2014.03.015
371. Gao X, Lin J, Ning Q, et al. A histone acetyltransferase p300 inhibitor C646 induces cell cycle arrest and apoptosis selectively in AML1-ETO-positive AML cells. *PLoS One.* 2013;8(2):e55481. doi:10.1371/journal.pone.0055481
372. Kasper LH, Boussouar F, Ney PA, et al. A transcription-factor-binding surface of coactivator p300 is required for haematopoiesis. *Nature.* 2002. doi:10.1038/nature01062
373. Saul V V., Schmitz ML. *Posttranslational Modifications Regulate HIPK2, a Driver of Proliferative Diseases*. Vol 91.; 2013:1051-1058. doi:10.1007/s00109-013-1042-0

8. ANEXOS

8. ANEXOS

ANEXO I

Tabla 4.9. Individuos del grupo control

#paciente	Tipo de muestra	Sexo	F. Nac	Edad	Diagnóstico	Granulocitos (%)												
						% Mielobl.	% Promiel.	% Mieloc.	% Metamiel.	% Cayados	% Segm	% Linfoc.	% Monoc.	% Blastos				
#703	Médula Ósea	M	15/06/52		No patológico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
#00	Médula Ósea	H	04/04/56		No patológico	0	4	10	24	20	20	7	2	0				
#99	Médula Ósea	M	30/10/43	73	No patológico	0	8	11	18	26	12	2	3	0				
#55	Médula Ósea	H	06/12/16	<1 año	No patológico	0	3	7	18	20	23	4	3	0				
#57	Médula Ósea	H	19/06/68	49	No patológico	0	3	7	18	20	23	4	3	0				
#59	Médula Ósea	H	23/07/91		No patológico	0	1	9	16	14	17	7	1	0				
#392	Médula Ósea	M	28/02/52	65	No patológico	0	0	10	18	18	15	10	0	0				
#09	Médula Ósea	M	22/09/04	13	No patológico	0	0	10	18	18	15	10	0	0				
#W1A	Sangre periférica	H	-	-	No patológico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
#W2B	Sangre periférica	M	-	-	No patológico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
#W3C	Sangre periférica	H	10/88	29	No patológico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
#W4J	Sangre periférica	H	07/83	34	No patológico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
#W5R	Sangre periférica	H	06/90	27	No patológico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 4.10. Individuos con diagnóstico de LMC

#paciente	Tipo de muestra	Sexo	F. Nac	Edad	Diagnóstico	Granulocitos (%)												
						% Mielobl.	% Promiel.	% Mieloc.	% Metamiel.	% Cayados	% Segm	% Linfoc.	% Monoc.	% Blastos				
#735	Médula Ósea	H	13/09/1945	72	LMC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
#14*	Médula Ósea	H	27/07/1981	36	LMC	2	17	22	18	14	20	6	7	2				
#31*	Sangre periférica	H	27/07/1981	36	LMC	5	20	14	13	30								
#92	Médula Ósea	M	06/02/2009	8	LMC	0	2	5	10	5	29							

* Ambos muestras proceden del mismo individuo

Tabla 4.11. Individuos con NMP filadelfia negativo

# paciente	Tipo de muestra	Sexo	F. Nac	Edad	Diagnóstico	Granulocitos (%)										
						% Mielobl.	% Promiel.	% Mieloc.	% Metamiel.	% Cayados	% Segm.	% Linfoc.	% Monoc.	% Blastos		
#73	Médula Ósea	H	15/03/41	76	Mielofibrosis	0	0	12	14	14	33					
#649	Médula Ósea	H	10/08/53	24	Trombocitemia Esencial											
#803	Médula Ósea	H	31/01/1957	60	Mielodisplasia AREB-tipo 2	0	2	26	19	11	9	2	1	1		
#449	Médula Ósea	H	-	92	NMP no clasificable	0	7	19	20	18	17	4	0	0	11	
#365	Sangre periférica	M	06/10/45		Mielofibrosis-post-PV											
#97	Sangre periférica	M	15/09/55	62	Trombocitemia Esencial											
#16	Sangre periférica	H	13/06/43	74	Mielofibrosis			1	5	4	49	32	4			
#83	Sangre periférica	M	07/03/30	87	Policitemia Vera											
#713	Sangre periférica	H	09/06/53	64	Trombocitemia Esencial											
#84	Sangre periférica	M	04/08/61	56	Trombocitemia Esencial											
#513	Sangre periférica	-	-		Trombocitemia Esencial											
#42	Sangre periférica	-	-		Mielofibrosis											
#29	Sangre periférica	-	-		Mielofibrosis											
#11	Sangre periférica	-	-		Mielofibrosis											

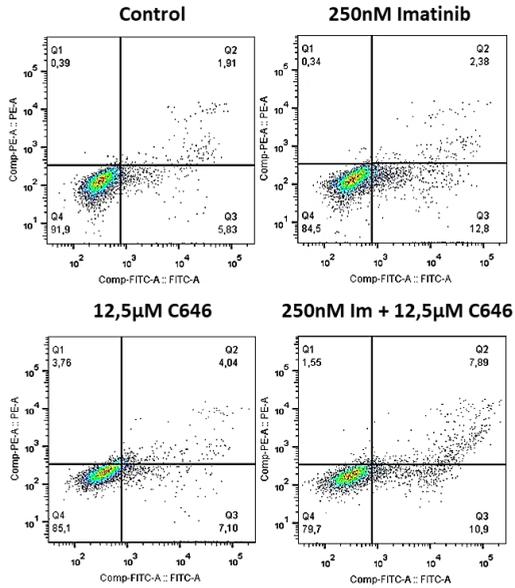
ANEXO II

Tabla 3.1. Oligonucleótidos utilizados

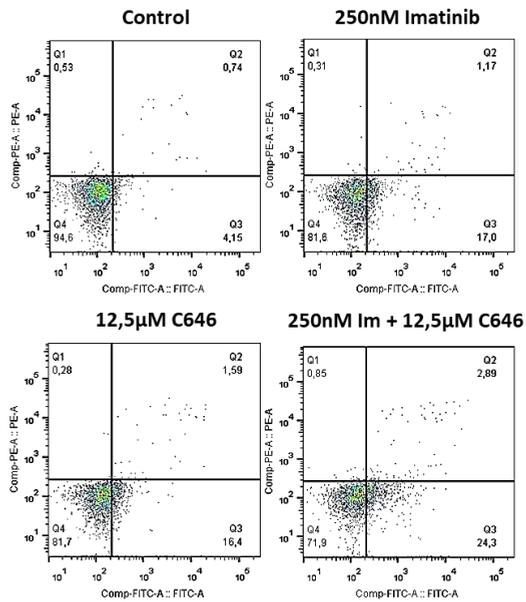
Nombre	Gen	Secuencia 5'-3'
GAPDH foward	GAPDH	CCACATCGCTCAGACACCAT
GAPDH reverse		CCAGGCGCCAATACG
HIPK2 foward 1	HIPK2	GTGGAGACTGAAGACACCAGATGAC
HIPK2 reverse 1		CCTGGGCCATATCATCTAAACAGTTG
HIPK2 foward 2	HIPK2	GTTGAGCACGGAGAGTGCCGATG
HIPK2 reverse 2		CATAGAGGTTCTGCTCCAACATCTCG
TP53 foward 1	TP53	GAGGTTGGCTCTGACTGTACCAC
TP53 reverse 1		CCAGTAGATTACCACTGGAGTCTTCC
EP300 foward 1	EP300	CCTCGCTGTACCTAGTCGTACC
EP300 reverse 1		GATGTAGAGCCTGGGACTGTGG
RUNX1 foward 1	RUNX1	GATGGCACTCTGGTCACTGTGATG
RUNX1 reverse 1		GAAGACAGTGATGGTCAGAGTGAAGC
TP53 foward 2	TP53	GGTCCAGATGAAGCTCCCAGAATGC
TP53 reverse 2		CTGGGAAGGGACAGAAGATGACAGG
CBFB foward 1	CBFB	GTAGCATAGAGCTGTCTGCCACAG
CBFB reverse 1		GGCAACTGCGAGACCCTGTC
EP300 foward 2	EP300	GTGGACAGTGGAGAGATGGCAGAAT
EP300 reverse 2		CAGTCAGAGCCATACTTGAACATG
CBFB foward 2	CBFB	CCGCGAGTGTGAGATTAAGTACACG
CBFB reverse 2		GACAGATTGGTTCCTGTGGCCAC
EP300 foward 3	EP300	CGATCTGATGGATGGTCGGGATG
EP300 reverse 3		GCAGCTCCACCAGCATGCACAT

ANEXO III

Línea celular KU-812

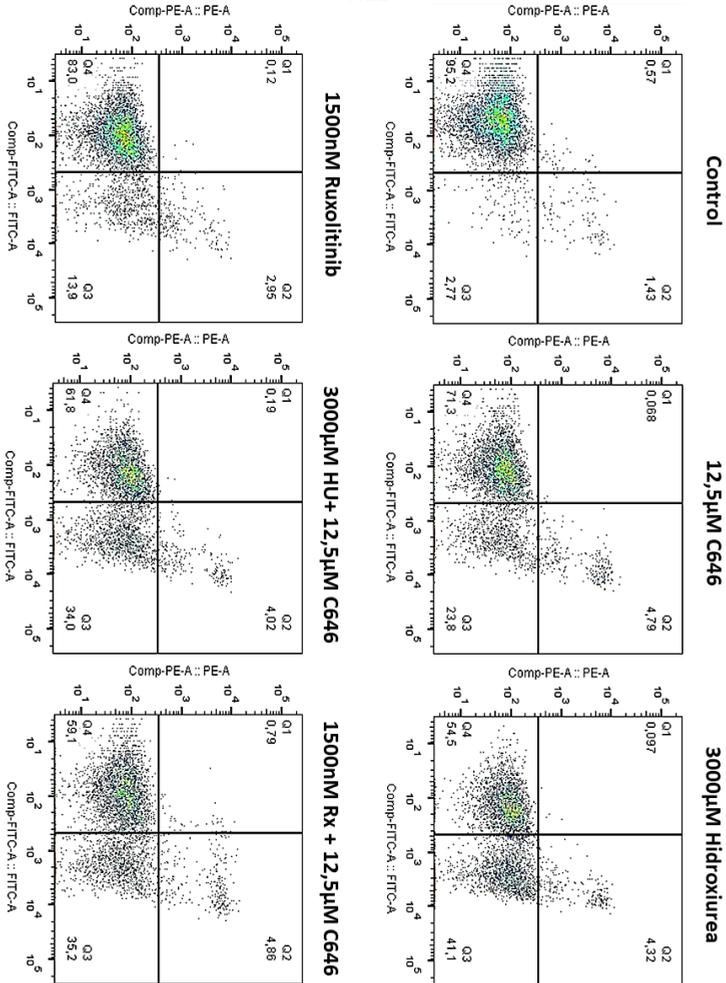


Línea celular K-562

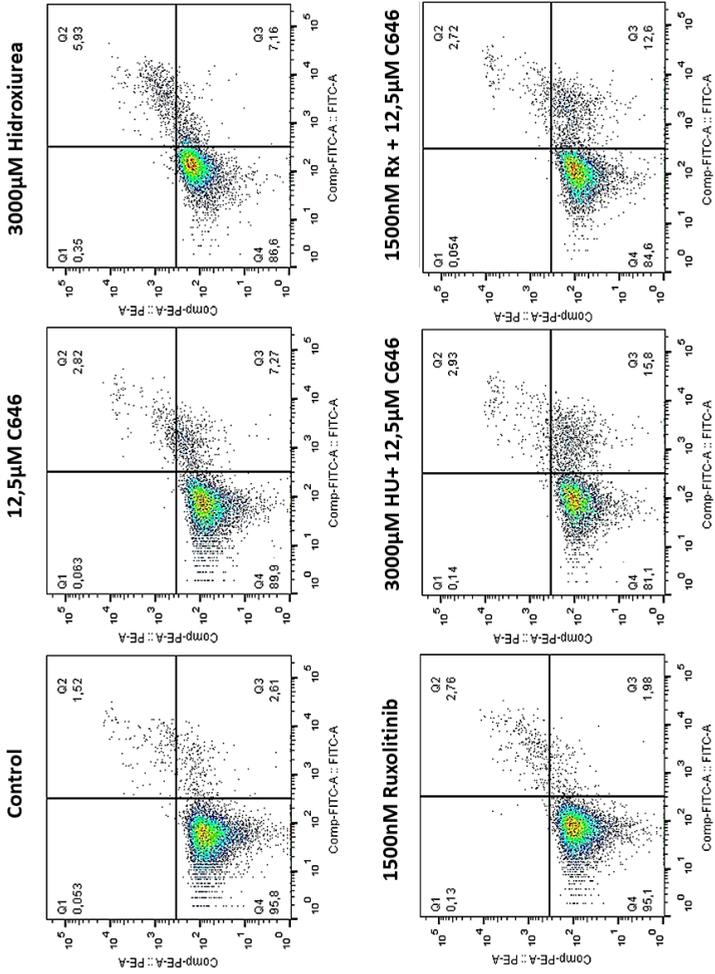


ANEXO IV

HEL

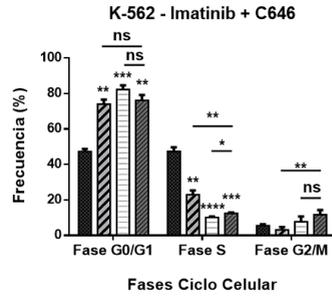
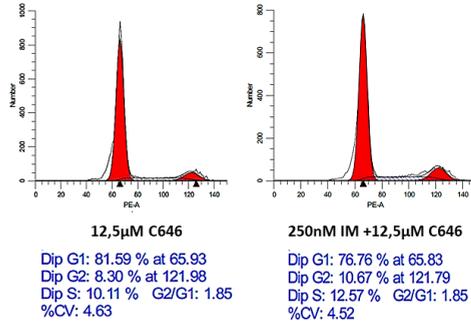
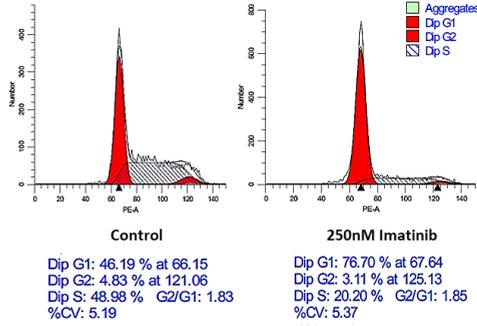


SET-2



ANEXO V

K-562



- Control
- ▨ 250nM Imatinib
- 12,5µM C646
- ▩ 250nM Imatinib + 12,5µM C646