



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Programa de doctorado en Bioquímica y Biomedicina

TESIS DOCTORAL

**Estudio de la expresión de *MYBL2* y de miRNAs en la leucemia
mieloblástica aguda. Papel del miR-30a en la regulación de
MYBL2 y en la proliferación celular.**

Trabajo original presentado para optar al grado ara optar al grado de
Doctora por la Universitat de València.

Presentada por:

Marta Llop García

Dirigida por:

Dra. Eva Barragán

Dr. Óscar Fuster

EVA BARRAGÁN GONZÁLEZ, doctora en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedina; facultativo especialista en Bioquímica clínica en el Hospital Universitario y Politécnico la Fe,

ÓSCAR FUSTER LLUCH, doctor en Farmacia; facultativo especialista en Análisis Clínicos en el Hospital Universitario y Politécnico la Fe,

INFORMAN

que la presente memoria titulada **“Estudio de la expresión de MYBL2 y de miRNAs en la leucemia mieloblástica aguda. Papel del miR-30a en la regulación de MYBL2 y en la proliferación celular”** realizada por **Marta Llop García**, licenciada en CC Biológicas y licenciada en Bioquímica por la Universitat de València y realizada bajo nuestra supervisión, en el laboratorio de Biología Molecular servicios de Análisis Clínicos y de Hematología del Hospital Universitario y Politécnico La Fe, en el marco Instituto de Investigación Sanitaria la Fe, reúne los requisitos para su presentación y defensa en forma de Tesis Doctoral ante un tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos firman la presente en Valencia, marzo del 2015.

Fdo: Eva Barragán

Fdo: Óscar Fuster

Este trabajo ha sido realizado con el apoyo económico de los proyectos de investigación FIS 09/01828, GV/2013/024 y GE004/10.

Marta Llop García ha disfrutado de las becas ACIF del programa VALI+d para investigadores en formación (RH-2010-31) y BEFPI/2013 de la Generalitat Valenciana, así como de la beca de formación y movilidad RTICC (RD06/0020/0031).

Este estudio se ha realizado en los servicios de Análisis Clínicos y de Hematología del Hospital Universitario y Politécnico La Fe, en el marco Instituto de Investigación Sanitaria la Fe, bajo la dirección de la Dra. Eva Barragán y del Dr. Óscar Fuster, y se ha completado con estancias en el Centro de Investigación Médica Aplicada (Universidad de Navarra) (estancia supervisada por la Dra. María D. Odero) y en el Institute of Biomedical Research (University of Birmingham) (estancia supervisada por la Dra. Paloma García).

*No es la especie más fuerte la que sobrevive,
tampoco es la más inteligente la que sobrevive.
Es la que más fácilmente se adapta al cambio.*

Charles Darwin

“Adaptarse o morir”

Agradecimientos

En primer lugar me gustaría agradecer a mis directores de tesis su esfuerzo, dedicación y ayuda. Sin ellos no hubiese podido llegar hasta aquí.

A la Dra. Eva Barragán quiero darle las gracias por haberme dado la oportunidad de participar en este proyecto de investigación. La confianza que ha depositado en mí ha sido siempre uno de los motores principales para querer mejorar y aprender cada día.

Al Dr. Óscar Fuster por haber estado en el laboratorio “codo con codo” conmigo cuando empecé y por los ánimos que siempre me ha dado.

También quiero darle las gracias al Dr. Miguel Ángel Sanz, porque es un ejemplo para todos con su pasión por la investigación en oncohematología. Y por supuesto, al Dr. Pascual Bolufer por su inspiradora trayectoria y tenacidad.

Quiero darle las gracias a la Dra. María D. Odero por acogerme durante una corta pero intensa estancia en su laboratorio. Allí tuve a suerte de conocer a la Dra. Isabel Moreno, quien me prestó una gran ayuda.

A la Dra. Paloma García quiero agradecerle la maravillosa acogida que me dio en su laboratorio. Todavía hoy me cuesta creer que se pueda aprender tanto en tan poco tiempo. Además está rodeada de personas que, como ella, son brillantes científicos y mejores personas. Laila, Lozan, Carl, Giacomo, Emily, Steph, Mary, Jon...all of them made me feel I belonged to the group and helped me and taught me even when they had so many experiments to do for their own research projects.

Gracias a todo el personal de Biología Molecular; a Sarai, Inma, Gema, Rosa, Carmen, Blanca y Sandra porque han sido un gran apoyo en

todos los sentidos durante estos 4 años y por hacer que los almuerzos y comidas sean una recarga energética a nivel celular y mental. Y también gracias a Virgínia, Núria, Amparo, Esperanza y Jorge por los buenos ratos y las risas (y enfados) en el laboratorio.

A todo el personal de Citogenética: a José, Esperanza, Irene, María, Inés, M^a Ángeles, porque gracias a ellos tuve mi primer contacto con la investigación en onco-hematología, especialmente a Mariam porque siempre recordaré la frase “ven conmigo que te voy a poner a hacer PCRs”. Y por supuesto también a todos los hematólogos del servicio.

Muchas gracias a Lourdes y al resto de personal de citometría por su participación en el proyecto, y al personal del servicio de genómica (Dolors, Laia, Jorge e Iván) por su ayuda. Gracias también al resto de personal del Hospital la Fe y de la Fundación que me ha prestado sus instalaciones o equipos para poder llevar a cabo el proyecto.

A los científicos que me han marcado tanto que todavía hoy, después de mucho tiempo, me vienen a la mente: a Emilia Matallana porque ha sido una de las mejores profesoras que he tenido nunca; a Rocío Gómez porque para mí siempre será un ejemplo a seguir tanto en lo profesional como en lo personal; y al Dr. Marc Coles, por enseñarme sin querer que “lo que no te mata te hace más fuerte”.

Quiero darles las gracias también a mis amigos los “bio”, todos doctores o “doctores-to-be”, porque pueden entender los altibajos asociados a una tesis. A Ari por nuestras charlas sobre mil y un temas hasta (literalmente) perder la voz. A María y a Pablo por su apoyo incondicional y porque aprecian el arte del buen comer. A Juanma porque a pesar del tiempo y de la distancia nuestra amistad permanece

igual que en la época de la uni. I a Quelo perquè va estar present el “dia D” i és un bon amic des d’aleshores.

I would also like to thank some special people who in the last year have encouraged me many ways: my dear Wesleyans, who were around while I was performing the last experiments of this thesis and my American family, especially Marissa Daniels, who I will always be thankful to for her assistance in the writing process.

Per descomptat, vull donar les gràcies als meus amics disbàuxics. Perquè són uns amics incondicionals, perquè sense ells no seria qui sóc, per recolzar-me sempre, pels bons moments, pels ànims i per ser els millors amics que es pot tindre.

Als meus pares, perquè sempre han les posat necessitats del meu germà i les meues per davant de les seues. M’han donat tot el seu suport i les ferramentes per a assolir els objectius que m’he anat fixant: la carrera, l’Erasmus, la investigació i ara el doctorat. Sense ells mai haguera pogut arribar fins ací. Gràcies també a la meua família (tios i cosins de Vila-real i del Grau) i la Loli, Rafa, Pablo i Paula pels seus ànims; i als meus avis, que, encara que la majoria ja no estan, sé que estarien molt orgullosos de mi. I sobre tot, gràcies a Miguel, perquè no només és el meu germà sino el meu amic, perquè sempre ens ho contem tot, perquè ens entenem, perquè sempre em fa riure més que ningú i perquè l’admire per tot el que ha aconseguit.

Per últim però no menys important, gràcies a Víctor per fer-me feliç.

Índice general

Abreviaturas.....	XIII
INTRODUCCIÓN.....	1
1. Leucemia mieloblástica aguda	3
1.1 Clasificación diagnóstica de la LMA.....	4
1.2 Factores pronóstico en la LMA.....	6
1.3 Biología molecular subyacente a la patogénesis de la LMA.....	11
2. MYBL2	13
2.1 Familia de genes <i>MYB</i>	13
2.1 Evolución y estructura.....	14
2.3. <i>MYBL2</i>	16
3. miRNAs.....	21
3.1 Síntesis	22
3.2 Regulación de la expresión génica	24
3.3 Carcinogénesis	26
3.4 miRNAs y <i>MYBL2</i>	29
HIPÓTESIS.....	31
OBJETIVOS.....	35
MATERIAL Y MÉTODOS.....	39
1. Pacientes y aspectos éticos	41
1.1 Tratamiento.....	42
1.2 Separación leucocitaria de médula ósea.....	42
2. Controles	42
2.1 Separación de las células mononucleadas	43
2.2 Aislamiento de células CD34+	44
3. Cultivos celulares.....	45

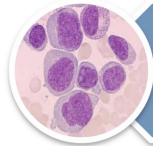
4. Extracción de RNA	45
4.1 Extracción de RNA total con TRIzol	45
4.2 Extracción de RNA con el miRNA micro kit (Qiagen).....	46
4.3 Cuantificación y valoración de la calidad del RNA.....	47
5. Selección de miRNAs desregulados	49
5.1 Análisis miRNAs mediante <i>arrays</i> de expresión	49
5.2 Análisis bioinformático.....	49
6. Análisis de expresión por PCR cuantitativa a tiempo real	50
6.1 Transcripción reversa	50
6.2 Análisis de expresión de <i>MYBL2</i> y los miRNAs	51
6.3 Método de cuantificación relativa	52
6.4 Protocolo de PCR para <i>MYBL2</i>	52
6.5 Protocolo de PCR para los miRNAs.....	53
7. Análisis de los niveles de proteínas: Western Blot.....	55
7.1 Lisis celular y cuantificación de proteínas	55
7.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida y transferencia	56
8. Mimics y plásmidos de expresión.....	57
8.1 mimics	57
8.2 Plásmidos	58
9. Estudios Funcionales.....	63
9.1 Sincronización del ciclo celular.....	63
9.2 Transfección celular	65
9.3 Ensayos de luciferasa	65
9.4 Ensayo de viabilidad celular	66
9.5 Ensayo de proliferación celular y ciclo celular: BrdU	67
9.6 Ensayos de apoptosis	69
9.7 Ensayo de senescencia	72
10. Tratamiento estadístico	73

RESULTADOS	75
1. Expresión de <i>MYBL2</i> en células CD34+ y en LMAs	77
2. Perfil de miRNAs en células CD34+ y en LMAs	77
3. Validación de los resultados de los arrays	83
3.1 Selección de miRNAs para su validación	83
3.2 Validación de los resultados de los <i>arrays</i> por qRT-PCR	83
4. Expresión de los miR-29a y 30 en células CD34+ y en LMAs	85
5. Asociación entre la expresión de <i>MYBL2</i> y miRNAs	86
5.1 Asociación en la LMA	86
5.2 Asociación en un modelo celular mieloide	89
6. Regulación de <i>MYBL2</i> por los miR-30a/c	92
6.1. Mecanismo de regulación de la expresión de <i>MYBL2</i> por el miR-30a: unión a la región 3'UTR	93
7. Papel funcional del miR-30a en la LMA	94
7.1 Proliferación celular	94
7.2 Ciclo celular	95
7.3 Apoptosis.....	96
7.4 Senescencia	97
8. Asociación de la expresión de <i>MYBL2</i> y miR-30a con las características clínico-biológicas de los pacientes de LMA	98
9. Valor pronóstico de <i>MYBL2</i> y el miR-30a en la LMA	102
9.1 Resultado de la inducción según la expresión de <i>MYBL2</i>	102
9.2 Seguimiento evolutivo según la expresión de <i>MYBL2</i>	102
9.3 Resultado de la inducción según la expresión del miR-30a	106
9.4 Seguimiento evolutivo según la expresión del miR-30a.....	107

DISCUSIÓN.....	109
1. Expresión de <i>MYBL2</i> en LMA y en CD34+	112
2. Perfil de miRNAs en LMAs y en CD34+. Expresión de los miR-29a y miR-30 en la LMA	114
3. Asociación en expresión de <i>MYBL2</i> y los miRNAs	117
4. Regulación de <i>MYBL2</i> por el miR-30a	119
5. Efectos del miR-30a en la supervivencia celular	120
6. Asociación de <i>MYBL2</i> con las características clínico-biológicas de la LMA y valor pronóstico	122
7. Asociación del miR-30a con las características clínicobiológicas de la LMA y valor pronóstico	124
CONCLUSIONES.....	127
BIBLIOGRAFÍA.....	131
ANEXOS.....	i
Tabla anexa I.....	iii
Relación de Tablas.....	ix
Relación de Figuras.....	xi

Abreviaturas

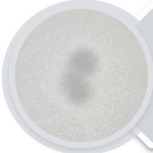
7-AAD	7-Aminoactinomicina	MTS	(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio
BCA	Ácido bicinchonínico		
BrdU	5-bromo-2'-desoxiuridina		
CDK	Ciclina dependiente de kinasa	OMS	Org. mundial de la salud
cDNA	DNA-copia	PA	Poliacrilamida
CME	Célula madre embrionaria	PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
CMV	Citomegalovirus	PCA	<i>Principal component analysis</i>
Ct	<i>Cycle threshold</i>	PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido	PrI	Bromuro de Propidio
DNA	<i>Desoxyrribonucleic acid</i>	PES	Etosulfato fenacínico
EDTA	Ácido etil diaminotetraacético	PVDF	Polifluoruro de vinilideno
etOH	Etanol	RNA	<i>Rybonucleic acid</i>
FC	<i>Fold-change</i>	qRT-PCR	PCR a tiempo real
FISH	<i>Fluorescent in situ hybridization</i>	SBF	Suero Bovino Fetal
FITC	Isotiocianato de fluoresceína	SDS	Dimetil sulfóxido
PS	Fosfatidilserina	SG	Sup. Global
FT	Factor de transcripción	SLE	Sup. libre de enfermedad
IGEPAL	Octil fenoxipolietoxi	SLR	Sup. libre de recaída
KO	<i>Knocked out</i>	SMD	Síndrome mielodisplásico
LLA	Leucemia linfoblástica aguda	SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
LMA	Leucemia mieloblástica aguda	SP	Sangre periférica
miRISC	<i>miRNA-containing RNA-induced silencing complex</i>	TdT	Desoxinucleotidil transferasa terminal
MNC	<i>Mononucleated cell</i>	TRBP	<i>Transactivating response RNA binding protein</i>
MO	Médula ósea	TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick end labelling</i>
		UTR	<i>Untraslated Region</i>



Introducción



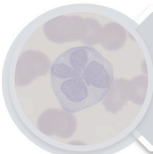
Hipótesis



Objetivos



Material y Métodos



Resultados



Discusión



Conclusiones



Bibliografía

1. Leucemia mieloblástica aguda

La leucemia mieloblástica aguda (LMA) es una enfermedad heterogénea producida por el desorden clonal de las células progenitoras hematopoyéticas de la línea mieloide.

La LMA comprende el 80% de las leucemias agudas del adulto y entre el 15-20% en niños. Afecta a 3,8 personas por cada 100.000 menores de 65 años y a 17,9 por cada 100.000 mayores de 65, siendo el desorden mieloide maligno más común en adultos. La mediana de aparición de la enfermedad es de 70 años y afecta en mayor proporción a los varones (60%). En los países occidentales la LMA tiene una incidencia de 2-3 nuevos casos por 100.000 habitantes al año, incrementando progresivamente con la edad y con un pico de 12,6 casos por 100.000 habitantes/año en pacientes mayores de 65 años (Deschler y Lubbert 2006; Maynadié *et al.*, 2011). En España se diagnostican entre 900 y 1000 casos nuevos anuales (Sanz, 2001).

La LMA es una enfermedad de progreso rápido que cuando no es tratada adecuadamente el paciente acaba sucumbiendo al proceso neoplásico en poco espacio de tiempo (semanas o meses). La proliferación descontrolada de los blastos y la pérdida de su capacidad de diferenciación terminal conllevan a la acumulación de células malignas no funcionantes en la médula ósea (MO) y sangre periférica (SP). La insuficiencia medular, consecuencia de la invasión de células leucémicas en la MO, promueve la aparición de diversas manifestaciones clínicas asociadas a anemia, desórdenes de la coagulación y/o infecciones causadas por el descenso de glóbulos rojos, plaquetas y leucocitos en sangre.

1.1 Clasificación diagnóstica de la LMA

La heterogeneidad de las LMAs hace necesaria su clasificación en diferentes subtipos. Por ello, clásicamente las LMAs se han clasificado en base a criterios citomorfológicos utilizando la clasificación Franco-Americano-Británica (FAB), y más recientemente en base a la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS), que incluye criterios clínico-biológicos y genéticos.

Clasificación FAB

La clasificación FAB atiende principalmente a criterios morfológicos para definir los diferentes subtipos de LMA (Bennett *et al.*, 1976). Durante décadas esta clasificación ha constituido el sistema de referencia más extensamente empleado en hematología para establecer el diagnóstico de diversos subtipos morfológicos y citoquímicos de LMA (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación FAB de la LMA

Subtipo	Nombre
M0	LMA mínimamente diferenciada
M1	LMA sin maduración
M2	LMA con maduración
M3	Leucemia promielocítica aguda
M4	Leucemia aguda mielomonocítica
M4Eo	Leucemia mielomonocítica aguda con eosinofilia
M5	Leucemia aguda monoblástica (M5a) o monocítica (M5b)
M6	Leucemia eritroide aguda
M7	Leucemia megacarioblástica aguda

Clasificación OMS

La clasificación de la OMS, además de los criterios citomorfológicos, incluye criterios con relevancia clínica y biológica para definir entidades específicas dentro de la LMA. La OMS actualiza su clasificación periódicamente para incluir los nuevos hallazgos científicos que demuestran tener relevancia clínica. En el año 2008 se establecieron nuevos criterios para el diagnóstico y clasificación de las LMAs (Swerdlow *et al.*, 2008). En esta revisión, además de las alteraciones genéticas recurrentes asociadas a subtipos de LMA con características morfológicas y clínicas específicas, se incluyeron como entidades provisionales las LMAs con mutaciones en los genes *Nucleofosmina (NPM1)* y *CCAAT/enhancer-binding protein alpha (CEBPA)* (Revisado por Vardiman *et al.*, 2009), (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación de la OMS para LMA (2008)

LMA y neoplasias relacionadas
1. LMA con alteraciones genéticas recurrentes
LMA con t(8;21)(q22,q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
LMA con inv(16) (p13.1;q22) / t(16;16) (p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>
LPA con t(15;17) (q22;q12); <i>PML-RARA</i>
LMA con t(9;11) (q22;p23); <i>MLLT3-MLL</i>
LMA con t(6;9) p23;q34); <i>DEK-NUP214</i>
LMA con inv(3) (q21q26.2) / t(3;3) (q21;q26.2); <i>RPN1-EVI1</i>
LMA (megacarioblástica) con t (1;22) (p13;q13); <i>RBM15-MKL1</i>
Entidad provisional: LMA con <i>NPM1</i> mutado
Entidad provisional: LMA con <i>CEBPA</i> mutado
2. LMA con cambios asociados a mielodisplasia
3. Neoplasias relacionadas con el tratamiento
4. LMA no categorizadas
5. Sarcoma Mieloide
6. Proliferación mieloide relacionada con el síndrome de Down.
7. Neoplasia blástica de células dendríticas plasmocitoides

1.2 Factores pronóstico en la LMA

Los factores pronóstico más relevantes en la LMA están asociados a las características del paciente (suelen predecir la mortalidad relacionada con el tratamiento e incluyen características como la edad o el recuento leucocitario al diagnóstico) o asociados a las características particulares de la LMA (estos marcadores pueden predecir, entre otros, la resistencia al tratamiento e incluyen la citogenética y las alteraciones moleculares presentes en los blastos leucémicos al diagnóstico) (Döner *et al.*, 2010).

Citogenética

El cariotipo en el momento del diagnóstico constituye uno de los principales factores pronóstico independiente en cuanto a la predicción de la respuesta a la terapia de inducción y a la supervivencia. El 55% de los adultos diagnosticados de LMA presenta algún tipo de alteración citogenética, de las que el 21-28% son alteraciones recurrentes. Estas alteraciones no suelen encontrarse en los tumores sólidos y, por tanto, se cree que son anomalías primarias relacionadas con el desarrollo leucémico inicial (Tenen, 2003).

En 1998, el *Medical Research Council* (MRC) estableció el impacto relativo de la citogenética y su implicación en el pronóstico de la LMA en una gran serie de pacientes (1460 LMAs *de novo* en adultos) (Grimwade *et al.*, 1998). Actualmente se sigue esta misma clasificación para categorizar la LMA en grupos de riesgo citogenético de pronóstico favorable, intermedio o desfavorable (Tabla 3), (Revisado por Grimwade *et al.*, 2010).

Tabla 3. Grupos de riesgo citogenético establecido por el MRC

Grupo	Alteración Cromosómica
Favorable	t(8;21) ; inv(16)/t(16;16) ; t(15;17)
Intermedio	Cariotipos no clasificados como favorables o desfavorables
Desfavorable	abn(3q) [excluyendo t(3;5)(q21~25;q31~35)] inv(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26) add(5q), del(5q), -5 ; -7, add(7q)/del(7q) t(6;11)(q27;q23) ; t(10;11)(p11~13;q23) t(11q23) [excluyendo t(9;11)(p21~22;q23) y t(11;19)(q23;p13)] t(9;22)(q34;q11); -17/abn(17p) Cariotipo complejo (≥ 4 alteraciones no relacionadas)

Los pacientes con cariotipo de riesgo intermedio representan el 45-55% de las LMAs, incluye las LMAs de cariotipo normal y tienen el pronóstico más variable o menos predecible con terapia convencional (Rockova *et al.*, 2011). En los últimos años los esfuerzos se han centrado en la búsqueda e identificación de nuevas alteraciones o marcadores moleculares capaces de refinar los grupos de riesgo, especialmente el de riesgo intermedio (Estey y Döhner, 2006).

Alteraciones Moleculares

Actualmente está aceptado que las alteraciones moleculares con mayor impacto pronóstico en el grupo de LMAs de riesgo intermedio, son las encontradas en el gen *NPM1*, las duplicaciones internas en tándem en *fms-related tyrosine kinase 3 (FLT3-ITD)* y las mutaciones bialélicas en *CEBPA* (Schlenk *et al.*, 2008).

Las mutaciones de *NPM1* están presentes en el 50-60% de los pacientes con cariotipo normal y constituyen un factor pronóstico

favorable cuando no se asocian con *FLT3*. La supervivencia en estos pacientes es del 50% a los 4 años. *FLT3-ITD* se detectan en un 30-40% de las LMAs de cariotipo normal y se consideran un factor pronóstico desfavorable, con un 20-25% de supervivencia a los 4 años. Cuando se considera el estado mutacional de *NPM1* y *FLT3* conjuntamente, los pacientes con *NPM1* positivo que son *FLT3-ITD* negativos tienen una supervivencia del 60% a los 4 años. En cuanto a *CEBPA*, en el 10-15% de los casos de LMA de cariotipo normal se encuentra mutado y confiere un pronóstico favorable, siendo la supervivencia del 60% a los 4 años (Vardiman *et al.*, 2009).

Por todo ello, la *European Leukemia Net* (ELN) (Döner *et al.*, 2010; Mrózek *et al.*, 2012) y la *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) (<http://www.nccn.org/>) consideran que, además del cariotipo, la determinación de alteraciones en *NPM1*, *FLT3* y *CEBPA* es necesaria en el momento del diagnóstico de la LMA, al menos en pacientes con cariotipo normal, para poder establecer una estrategia de tratamiento adaptada al riesgo. A continuación se muestra la clasificación pronóstica de la ELN (Tabla 4) y de la NCCN (Tabla 5).

Tabla 4. Clasificación pronóstica de la ELN

Grupo	Alteración citogenética o molecular
Favorable	t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
	inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>
	<i>NPM1</i> mutado sin <i>FLT3-ITD</i> (cariotipo normal) <i>CEBPA</i> mutado (cariotipo normal)
Intermedio I	<i>NPM1</i> mutado y <i>FLT3-ITD</i> (cariotipo normal)
	<i>NPM1</i> no mutado y <i>FLT3-ITD</i> (cariotipo normal)
	<i>NPM1</i> no mutado sin <i>FLT3-ITD</i> (cariotipo normal)
Intermedio II	t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3-MLL</i>
	Otras alteraciones citogenéticas no reportadas como favorables o adversas
Desfavorable	inv(3)(q21q26.2) o t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPN1-EVI1</i>
	t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i>
	t(v;11)(v;q23); reordenamientos de <i>MLL</i>
	-5/del(5q); -7; abn(17p); cariotipo complejo*

* Excluyendo las translocaciones o inversiones recurrentes

Tabla 5. Clasificación pronóstica de la NCCN

Grupo	Alteración Citogenética	Alteración Molecular
Favorable	t(8;21); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16) / t(16;16); <i>CBFB-MYH11</i> t(15;17); <i>PML-RARA</i>	Cariotipo normal con mutaciones en <i>NPM1</i> sin <i>FLT3-ITD</i> o aisladas bialélicas en <i>CEBPA</i>
Intermedio	Cariotipo normal +8 t(9;11); <i>MLL3-MLL</i> ; Alteraciones no favorables ni adversas	t(8;21); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> o inv(16)/t(16;16); <i>CBFB-MYH11</i> con mutaciones en <i>KIT</i>
Desfavorable	Cariotipo complejo (≥3 alteraciones cromosómicas) inv(3) / t(3;3); <i>RPN1-EVI1</i> t(6;9); <i>DEK-NUP214</i> t(9;22); <i>BCR-ABL1</i> t(v;11)(v;q23); <i>MLL</i> -5 o del(5q); -7 o del(7q)	Cariotipo normal con <i>FLT3-ITD</i>

Adicionalmente, el análisis molecular de la LMA mediante secuenciación masiva (NGS; *Next Generation Sequencing*) ha permitido identificar otros marcadores moleculares que podrían ayudar a establecer una mejor clasificación de los pacientes en función del riesgo. Estos marcadores permitirían no solo reclasificar a los pacientes anteriormente considerados como de riesgo intermedio sino también generar nuevas categorías dentro de los grupos ya establecidos, como podría ser el caso de las mutaciones en *DNMT3A*, *IDH1/2*, *TET2*, *ASXL1* o *PHF6* entre otras (Patel *et al.*, 2012; Estey, 2013).

1.3 Biología molecular subyacente a la patogénesis de la LMA

La causa de la aparición de la LMA se ha visto asociada a diversas alteraciones en el DNA que cooperan entre sí y que son adquiridas por células de la estirpe mieloide; como consecuencia modifican sus mecanismos normales de auto-renovación, proliferación y diferenciación celular (Fröhling *et al.*, 2005). Estas alteraciones son las que promueven la acumulación en la MO de precursores mieloides inmaduros con capacidad de replicación, pero sin capacidad de diferenciación hacia células hematopoyéticas maduras (Revisado por Sell, 2005).

Las anomalías citogenéticas, los reordenamientos moleculares, las mutaciones, la desregulación de la expresión génica y la alteración de los mecanismos epigenéticos afectan a factores de transcripción (FT) que regulan puntos clave de la hematopoyesis y el comportamiento celular. Así, las mutaciones de tipo I producen alteraciones en genes que promueven la proliferación celular y/o supervivencia, y las mutaciones de tipo II reducen o bloquean la capacidad de diferenciación y apoptosis (Orkin y Zon, 2008). Estudios funcionales realizados en modelos animales han demostrado que estos dos tipos de mutaciones cooperan dando lugar al desarrollo de la LMA, requiriéndose de al menos una alteración en un gen de cada clase o de la asociación entre mutaciones de una misma clase (Renneville *et al.*, 2008).

Las duplicaciones internas en tándem *FLT3-ITD* (Gilliland y Griffin, 2002) o las mutaciones del gen *RAS* constituyen claros ejemplos de mutaciones de clase I, que estimulan la proliferación

celular de manera autónoma escapando de los procesos de regulación del ciclo celular. Por el contrario, las mutaciones de clase II afectan mayoritariamente a factores de transcripción como *NPM1* o *CEBPA* (Gupta *et al.*, 2008). *NPM1* regula la estabilidad y la actividad transcripcional de p53 y actúa como gen supresor de tumores; de hecho, juega un papel crítico en la transformación celular maligna durante la leucemogénesis (Falini *et al.*, 2005). Por su parte, la pérdida de función de *CEBPA* bloquea la diferenciación granulocítica, ya que este gen regula los niveles de expresión de *c-Myc*, controlando que los mieloblastos entren o no en esta ruta (Johansen *et al.* 2001).

Nuevos avances en el estudio molecular de las LMAs

En los últimos años ha habido un importante avance en el conocimiento de las bases moleculares de la LMA, derivado fundamentalmente de la identificación de nuevas alteraciones moleculares que comprenden desde mutaciones en genes anteriormente desconocidos hasta alteraciones epigenéticas (Ley *et al.*, 2013). Además, se ha demostrado que la mayoría de los genes involucrados en el proceso leucemogénico no son capaces por sí solos de transformar una célula progenitora sino que es necesaria la cooperación con otros eventos oncogénicos (Schneider *et al.*, 2007).

Estos nuevos hallazgos ponen de manifiesto la necesidad de encontrar nuevos marcadores moleculares presentes en los progenitores leucémicos al diagnóstico. Las células leucémicas mantienen características de las células madre hematopoyéticas normales (como la maduración jerárquica, ciclo celular quiescente o

el inmunofenotipo). Por tanto, son las alteraciones moleculares las que definen el comportamiento oncogénico de los blastos (Bonnet *et al.*, 1997, Wichmann *et al.*, 2014). Estas particularidades son las que podrían permitir el uso de dianas terapéuticas específicas, ya que son de gran importancia porque aportan información indispensable para el diagnóstico, pronóstico e incluso para tratamiento de la leucemia debido a la búsqueda de terapias dirigidas contra algunas dianas moleculares (Jordan *et al.* 2004).

2. MYBL2

2.1 Familia de genes MYB

La familia de genes *MYB* en humanos está formada por tres miembros: *MYB* (*c-MYB*), *MYBL1* (*A-MYB*) y *MYBL2* (*B-MYB*). Son factores de transcripción que actúan como transactivadores, uniéndose directamente al DNA para regular la transcripción de genes que controlan el ciclo celular, la diferenciación y la apoptosis. La mayoría de trabajos sugieren que estos genes necesitan cofactores para poder desarrollar su función. Por ejemplo, en el caso de *MYB* se sabe que los miembros de la familia CEBP suelen actuar como cofactores para que éste pueda actuar (Oelgeschläger *et al.* 1996; Tahirov *et al.* 2002).

La estructura y evolución de los genes *MYB* ha sido estudiada con detalle. Los tres miembros de la familia tienen un alto grado de homología entre ellos y están conservados entre especies (Revisado por Oh y Reddy, 1999). En mamíferos adultos están distribuidos de forma diferencial aunque en algunos tejidos puedan expresarse

varios miembros de la familia a la vez, sugiriendo que la regulación de la expresión de cada uno es diferente, siendo particularmente compleja la regulación de *MYB* (Tavner, 2004).

2.1 Evolución y estructura

Los genes *MYB* han sido identificados en seres vivos representantes de los tres reinos. Mantienen un alto grado de identidad en su secuencia y se ha sugerido que en vertebrados su origen se debe a eventos de duplicación de grandes regiones cromosómicas o incluso del genoma entero. Esta hipótesis se basó inicialmente en su diferente localización cromosómica (en humanos: *MYBL1* en 8q22, *MYBL2* en 20q13 y *MYB* en 6q22) y se ha demostrado que, de los tres miembros, *MYBL2* sería el ortólogo o progenitor ancestral y A- y c- *MYB* se originaron a partir de dicha duplicación (Davidson *et al.*, 2005).

Los genes *MYB* codifican proteínas que tienen tres dominios. El extremo N-terminal es característico de la familia, está muy conservado y forma un dominio de unión al DNA, conocido como “dominio *MYB*”. Este dominio reconoce la secuencia consenso PyAACG/TG y está formado por tres repeticiones en tándem no idénticas (de 50 aminoácidos aproximadamente). Cada repetición contiene un aminoácido triptófano que es recurrente periódicamente en el dominio y genera un núcleo hidrofóbico. Este triptófano está flanqueado por arginina y lisina; el triplete constituido por estos tres aminoácidos (Arg-Trp-Lys) resulta esencial para la integridad estructural del dominio de unión al DNA (Ko *et al.*, 2008). De las tres

repeticiones, las dos últimas generan un estructura de hélice-vuelta-hélice que es necesaria para la unión al DNA, y la primera repetición actúa estabilizando dicha unión. El dominio de transactivación es el menos conservado y el que más difiere entre los tres miembros. Además, MYBL2 es un transactivador menos potente que MYB. Los genes *MYB* también pueden activar la transcripción independientemente de la unión directa al DNA a través de su asociación con otras proteínas, formando complejos multiproteicos. La región C-terminal de estas proteínas es rica en aminoácidos acídicos, está altamente conservada y constituye el dominio regulatorio, inhibiendo la capacidad de transactivación de los genes *MYB* (Sakura *et al.*, 1989) (Figura 1).

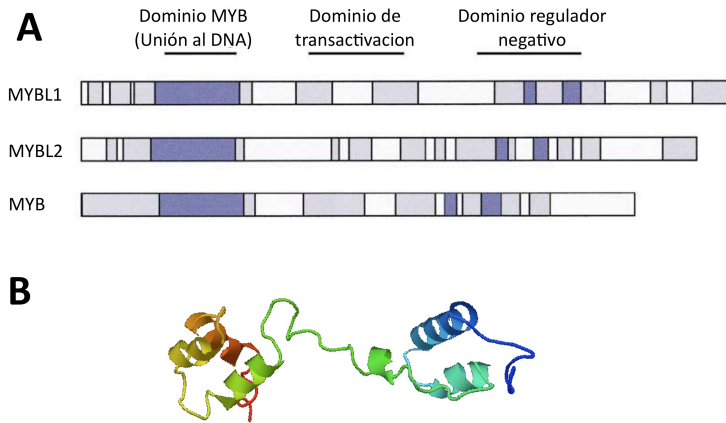


Figura 1. Evolución y estructura de los genes *MYB*. A) Homología de secuencia de los genes *MYB*. El sombreado en gris indica las regiones conservadas entre pollo, ratón y humano. Las regiones sombreadas en azul marcan las regiones más conservadas entre los tres miembros de la familia *MYB* (Figura adaptada de Rushton *et al.*, 2003). B) Estructura tridimensional de MYBL2, en la que se puede ver las α -hélices que componen los dominios de unión al DNA y el dominio regulador. Figura obtenida del *Protein Data Bank* (Rutgers University; <http://www.rcsb.org/>).

2.3. *MYBL2*

La expresión de *MYBL2* es ubicua, se correlaciona con la proliferación y es variable durante el ciclo celular. Sus niveles son especialmente altos en células madre embrionarias (CMEs), tejidos en desarrollo (mamíferos) y en células madre hematopoyéticas adultas (Sitzman *et al.*, 1996; Tanaka *et al.*, 1999; Sala y Watson, 1999; Tarasov *et al.*, 2008a).

Diferenciación

La expresión de *MYBL2* es necesaria para el mantenimiento del estado pluripotente o de *stem cell* (Tarasov *et al.*, 2008b; Muller *et al.*, 2008; Bokheler, 2009) y, por tanto, sus niveles se reducen drásticamente durante la diferenciación de la mayoría de tipos celulares, como en el caso de las células hematopoyéticas (Rascella *et al.*, 1995; Bies *et al.*, 1996; Golay *et al.*, 1997; Engelhard *et al.*, 2000; Papetti y Augenlicht, 2011a). Por el contrario, los niveles de *MYBL2* se mantienen durante el proceso de endorreplicación en la diferenciación de los megacariocitos. Durante este proceso también se promueve el mantenimiento de la estabilidad genómica (García y Frampton, 2006).

Ciclo celular

En células quiescentes los niveles de expresión de *MYBL2* son prácticamente indetectables, pero cuando las células entran en la fase G1 del ciclo celular se activa su expresión. Durante esta fase, las ciclinas D/Cdk4/Cdk6 y E/Cdk2 fosforilan la proteína retinoblastoma (Rb), liberándola de p107 y p130. El complejo Rb/p107/p130 es un represor transcripcional activo, pero cuando Rb es liberado es capaz de activar la transcripción del FT E2F. Este FT activa a su vez la expresión de genes que permiten la entrada y progresión de la fase S del ciclo celular; entre sus dianas se encuentra *MYBL2* (Lam y Watson, 1993; Lam *et al.*, 1994; Lam *et al.*, 1995). Ratones *knock-out* (KO) para *MYBL2* son inviábiles y mueren en etapas muy tempranas del desarrollo embrionario. (Tanaka *et al.*, 1999). Esta letalidad está asociada a un retraso en la entrada en fase S del ciclo celular que

genera defectos en la formación del huso acromático y poliploidía (Tarasov *et al.*, 2008b).

MYBL2 también es esencial para la progresión de la fase S, ya que su bloqueo impide que los cromosomas condensen de forma normal y provoca su fragmentación tanto en líneas celulares como en CME de ratón (García y Frampton, 2006; Lorvellec *et al.*, 2010).

Durante la fase S, además de aumentar de forma significativa los niveles de MYBL2, éste es fosforilado en diversos puntos de su región C-terminal (dominio regulador negativo) por la ciclina A/Cdk2, lo que dificulta la unión de co-represores y por tanto aumenta su capacidad de transactivación. La fosforilación promueve también la acetilación dependiente de CBP, que es necesaria para que MYBL2 alcance su máxima actividad transcripcional (Robinson *et al.*, 1996; Ansieau *et al.*, 1997; Lane *et al.*, 1997; Sala *et al.*, 1997; Ziebold *et al.*, 1997; Bartsch *et al.*, 1999; Johnson *et al.*, 1999; Saville y Watson, 1998). En CME de ratón, activa la transcripción de genes clave para la progresión de la fase S como *c-myc* y *FoxM1* (Lorvellec *et al.*, 2010).

Durante la fase G2 forma complejos con otros FTs como E2F o LIN-9 permitiendo la transcripción de otros *sets* de genes que actúan en ésta y las siguientes fases del ciclo celular (Zhu *et al.*, 2004). En CME de ratón, la reducción de los niveles de *Mybl2*, además de frenar la proliferación celular y reducir la viabilidad y el tamaño de las colonias, retrasa la entrada en mitosis debido a defectos en la formación del huso acromático (Tarasov *et al.*, 2008b). Esto demuestra que *MYBL2* es necesario para la transición G2/M promoviendo la entrada de las células en mitosis.

Estabilidad genómica

MYBL2 es necesario para mantener la estabilidad genómica a lo largo del ciclo celular. En CME de ratón, niveles reducidos de Mybl2 permiten la progresión en los puntos de control de la fase S y G2/M a células con el DNA dañado (García y Frampton, 2006; Tarasov *et al.*, 2008b; Lorvellec *et al.*, 2010).

Apoptosis

La muerte celular programada debe ser evitada por las células cancerígenas para poder adquirir su comportamiento invasivo (Revisado por Wong, 2011). En este sentido, MYBL2 es capaz de regular la apoptosis, reprimiéndola, a través de la activación de la transcripción del gen *BCL2* o *ApoJ/clusterina*, que son genes antiapoptóticos (Lang *et al.*, 2005; Cervellera *et al.*, 2000; Santilli *et al.*, 2005).

Senescencia

Las células senescentes tienen bloqueado el crecimiento de forma irreversible, y este proceso está acompañado de una fuerte represión de la expresión de *MYBL2*. En fibroblastos embrionarios de ratón se ha demostrado que la hiperexpresión del oncogén *ras* induce la senescencia prematura de estas células, pero si se co-expresa con *Mybl2* se elimina esta respuesta (Masselink *et al.*, 2001). En cultivos primarios de fibroblastos humanos y en la línea celular de cáncer cervical HeLa, la inhibición de la expresión de *MYBL2* induce la senescencia (Johung *et al.*, 2007). También se ha demostrado que la hiperexpresión de *MYBL2* aumenta la vida media celular, mientras

que su silenciamiento induce la senescencia prematura. MYBL2 puede ejercer estos efectos mediante la represión de forma directa de la transcripción de *p16INK4a*, un inhibidor de kinasas dependiente de ciclina que induce la senescencia, lo que apoya las observaciones anteriormente descritas (Huang *et al.*, 2011). Por tanto, MYBL2 también juega un importante papel en la regulación de la senescencia, lo que a su vez influye en la transformación oncogénica; las células precancerígenas tratan de evitar la entrada en senescencia para poder activar su comportamiento invasivo (Revisado por Collado *et al.*, 2007 y Martínez y DiMaio, 2011).

Oncogénesis

Una célula normal adquiere comportamiento invasivo u oncogénico cuando es capaz de evitar las señales para entrar en senescencia o activar las vías de señalización apoptóticas y de progresar a lo largo del ciclo celular (Hanahan y Weinberg, 2011). En este sentido, MYBL2 es capaz de modificar las diferentes rutas que afectan al comportamiento celular y, por tanto, es un candidato más que probable para inducir el proceso oncogénico. En este sentido, iversos estudios han demostrado que *MYBL2* está sobreexpresado o amplificado en diferentes neoplasias como cáncer de hígado, mama, ovario, próstata o neuroblastoma (Tanner *et al.*, 2000; Bar-Shira *et al.*, 2002; Sala, 2005; Nakahima *et al.*, 2008; Thorner *et al.*, 2009; Frau *et al.*, 2013). Esta expresión aberrante favorecería el desarrollo tumoral promoviendo la progresión del ciclo celular y/o la resistencia a la apoptosis o la senescencia. Adicionalmente, su hiperexpresión se

ha asociado a comportamientos más agresivos en neuroblastoma y cáncer de mama (Rascellà *et al.*, 1999; Dedic *et al.*, 2013).

Por otra parte, la reducción de los niveles de expresión de *MYBL2* supone una disminución en la progresión a la fase S, parada en mitosis, condensaciones cromosómicas aberrantes y signos de fragmentación cromosómica (García y Frampton, 2006; Lorvellec *et al.*, 2010). Además, se ha demostrado que ratones haploinuficientes para *Mybl2* desarrollan síndromes mieloproliferativos y mielodisplásicos (SMD) (Clarke *et al.*, 2012).

Por tanto, cabe pensar que unos adecuados niveles de *MYBL2* son necesarios para mantener la homeostasis celular, sobre todo de las células hematopoyéticas, que parecen ser especialmente susceptibles a alteraciones en sus niveles de expresión. En conclusión, unos niveles anormales (demasiado bajos o altos) de *MYBL2* podrían conducir al desarrollo neoplásico; su desregulación podría contribuir al desarrollo y/o mantenimiento del fenotipo leucémico.

3. miRNAs

Los miRNA son RNAs no codificantes de unos 21-23 nt que regulan post-transcripcionalmente la expresión génica generalmente reprimiéndola, aunque recientemente se ha descubierto que también pueden activar la traducción (Vasudevan *et al.*, 2007; Mortensen *et al.*, 2011; Saraiya *et al.*, 2013). Se ha descrito que estas pequeñas moléculas controlan un 74-92% de los genes humanos (Miranda *et al.*, 2006).

3.1 Síntesis

Los miRNAs se transcriben mayoritariamente por la RNAPol II e inicialmente tienen una longitud de unos 70 nt (Lee *et al.*, 2004). Estos “pri-miRNAs” son procesados en el núcleo por *Microprocessor*, un complejo Drosha/DGCR8 (*DiGeorge Syndrom Critical Region 8*), que tiene actividad RNAsa III y que, mediante corte, genera los conocidos “pre-miRNAs”. Los pre-miRNAs son transportados al citoplasma por la Exportina 5 en un mecanismo dependiente de Ran-GTP (Yi *et al.*, 2003; Bohnsack *et al.*, 2004). Una vez en el citoplasma, los pre-miRNAs son procesados por otra RNAsa III, DICER, que forma un complejo con TRBP (*Transactivating response RNA binding protein*), para generar un RNA de doble cadena de unos 22 nt (miRNA/miRNA*) (Chendrimada *et al.*, 2005).

El miRNA maduro es incorporado al complejo miRISC (*miRNA-containing RNA-induced silencing complex*) que contiene también las proteínas Argonaute y el TRBP. El complejo RISC es el que media la regulación de los niveles de mRNA o de proteína mediante tres mecanismos posibles: corte específico de posición, inducción de la degradación del mRNA o inhibición de la traducción (Figura 2).

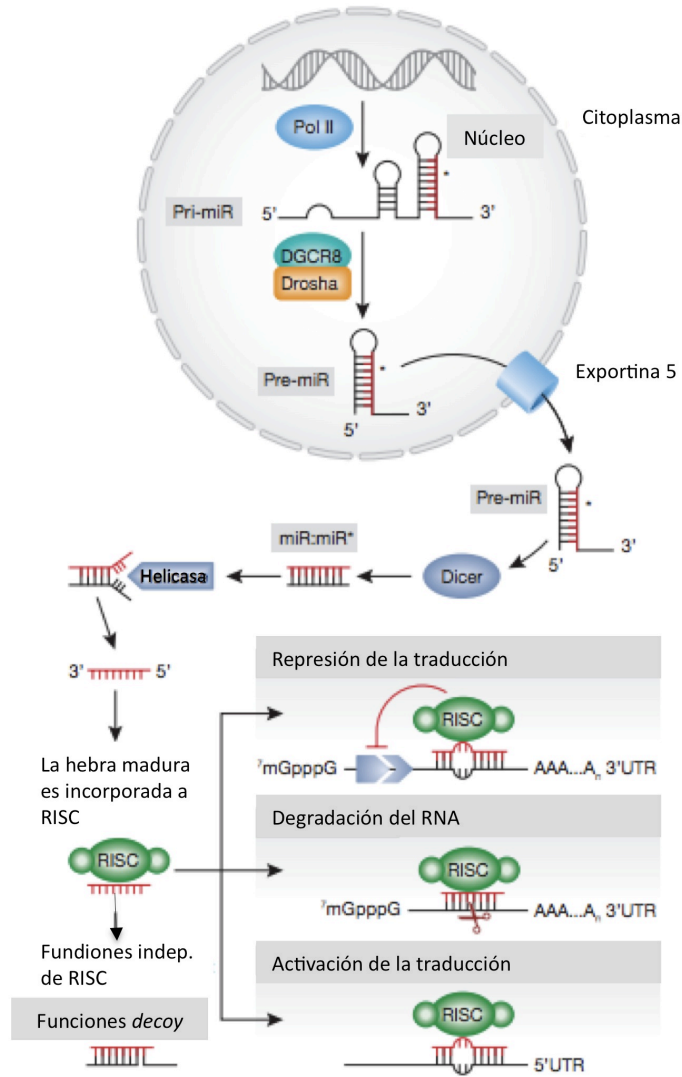


Figura 2. Biogénesis y mecanismo de acción de los miRNAs. Los miRNAs son transcritos mayoritariamente por la RNA pol II y sufren un proceso de maduración en el que participan diversas RNAsas que van realizando cortes en los precursores hasta que el miRNA maduro tiene un tamaño de alrededor de 22 nucleótidos. Los miRNAs maduros son incorporados al complejo RISC (sombreado en verde en la figura), que actúa sobre las regiones UTR de los genes diana del miRNA que contienen. Figura adaptada de Iorio y Croce, 2011 (Revisión).

3.2 Regulación de la expresión génica

Generalmente, los miRNAs controlan los niveles de mRNA o de proteína de sus dianas uniéndose a la región 3' no traducida (3'UTR) del mRNA, aunque se han encontrado algunas excepciones como la unión a la región 5'UTR o a la región codificante (Lytle *et al.*, 2007; Orom *et al.*, 2008; Moretti *et al.*, 2010; Qin *et al.*, 2010).

A nivel de traducción bloquean la iniciación a través del reconocimiento de la 7-metil-Guanosina en 5' del mRNA o impidiendo el ensamblado del complejo 80S del ribosoma (Figura 3A), aunque podrían actuar también en pasos posteriores (post-iniciación) (Figura 3B). La inducción de la degradación del mRNA ocurre cuando miRISC recluta a complejos de desadenilación, que degradan la cola poliA del mRNA diana reduciendo su estabilidad (Figura 3C).

Los miRNAs controlan la actividad de más del 30-60% de todos los genes que codifican proteínas y participan en la regulación de una gran mayoría de procesos celulares estudiados hasta la fecha, incluyendo el desarrollo, la proliferación celular, diferenciación o apoptosis. Por tanto, la desregulación de la expresión de los miRNAs o la acción que éstos ejercen sobre sus dianas pueden contribuir a la aparición de diversas patologías, incluyendo el cáncer (revisado por Fabian *et al.*, 2010 y Jansson y Lund, 2012).

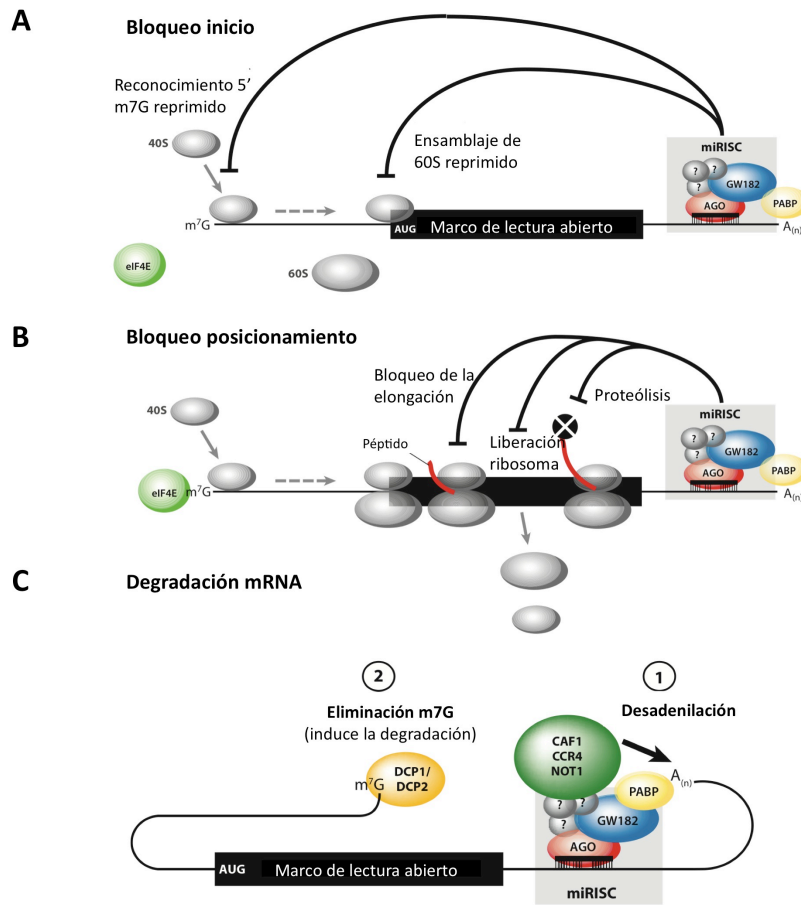


Figura 3. Mecanismos de regulación de la expresión génica por miRNAs. Los miRNAs pueden modificar los niveles de mRNA o de proteína de sus dianas mediante diferentes mecanismos de acción. A) Regulación del inicio de la traducción por bloqueo del ensamblado de las subunidades ribosomales. B) bloqueo de la traducción durante la elongación. C) Efecto del complejo miRISC sobre la degradación del mRNA diana del miRNA (Adaptada de Fabian *et al.*, 2010).

3.3 Carcinogénesis

Dada su participación en la regulación de la expresión génica, las modificaciones de los niveles de miRNAs pueden dar lugar a procesos de tumorigénesis, comportándose de forma similar a proto-oncogenes o genes supresores de tumores (Figura 4).

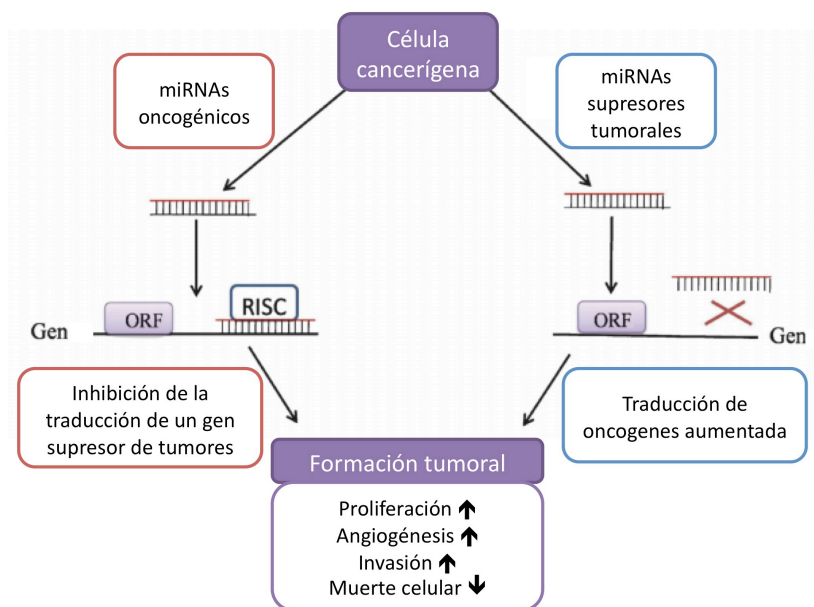


Figura 4. miRNAs como oncogenes o genes supresores de tumores. Modelo de cómo los miRNAs pueden funcionar como oncogenes o como genes supresores de tumores dependiendo de la función que tienen sus dianas en las rutas celulares alteradas en los procesos oncogénicos. Adaptada de Ahmad *et al.*, 2013.

De hecho, se han asociado perfiles alterados de miRNAs con cáncer. Por ejemplo, la desregulación del miR-143 se ha asociado con el cáncer colorrectal, el miR-145 con el cáncer de mama y el miR-29, cuya diana es p53, con la leucemia. También se ha visto que el oncogén *MYC* activa miRNAs protooncogénicos (como miR-17-92) e inhibe transcripcionalmente algunos miRNAs con acción supresora de

tumores (como let-7 o miR15a). Además, se han visto implicados en procesos metastáticos (Varol *et al.*, 2010).

Los mecanismos de desregulación de la función de miRNAs se han atribuido a la presencia de SNPs, que modificarían la capacidad de apareamiento de miRNA a su diana (Mishra y Bertino, 2009), o también a la desregulación de su transcripción. Además, se ha visto que algunos miRNAs pueden modificar la metilación del DNA, al mismo tiempo que los promotores de éstos pueden ser metilados de forma que se modifica su transcripción.

miRNAs y LMA

Los miRNAs están implicados en la regulación de la hematopoyesis (revisado por Bissels *et al.*, 2012). Por tanto, es de esperar que la alteración de los niveles de ciertos miRNAs puedan desencadenar modificaciones en el comportamiento de las células madre hematopoyéticas (Figura 5).

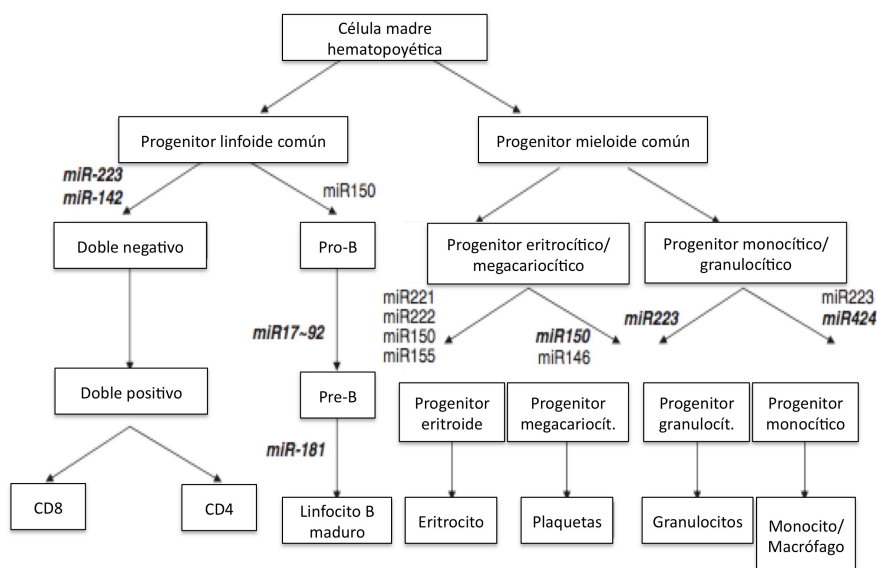


Figura 5. miRNAs que participan en la regulación de la hematopoyesis.

Los miRNAs participan en las diferentes etapas de la diferenciación hematopoyética. Los que aparecen en negrita promueven la diferenciación mientras que los demás la inhiben. Adaptada de Yendamuri y Calin, 2009.

El descubrimiento de los miRNAs y su implicación en la regulación de la hematopoyesis abrió una nueva puerta a la búsqueda de marcadores moleculares válidos para la estratificación de las LMA (Havenlange *et al*, 2010). De hecho, a día de hoy ya se sabe que el perfil de expresión de miRNAs es diferente según los subtipos de riesgo citogenético o mutacional de LMA, y que el estudio de su expresión aporta información sobre el pronóstico del paciente en la LMA (Jongen-Lavrencic *et al*, 2008; Garzon *et al*, 2008; Marcucci *et al.*, 2011; Díaz-Beyá *et al.*, 2014).

También se ha demostrado que la desregulación de miRNAs tiene relevancia funcional en el proceso leucemogénico (Marcucci *et*

al., 2008). Perfiles de miRNAs o miRNAs individuales han sido implicados en la iniciación y/o mantenimiento del fenotipo leucémico, actuando como oncogenes o como genes supresores de tumores (Cammarata *et al.*, 2010).

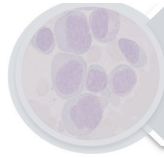
Adicionalmente, se ha descrito la utilidad de uno o varios miRNAs para establecer grupos de riesgo en pacientes con la LMA; por ejemplo, la sobreexpresión del miR-155 se ha asociado a un mal pronóstico en LMAs de cariotipo normal, y aunque se ha asociado a mutaciones en *FLT3*, parece ser un factor pronóstico independiente (Jongen-Lavrencic *et al.*, 2008; Garzon *et al.*, 2008; Whitman *et al.*, 2010). Además, contribuye a una mayor agresividad de las células leucémicas a través de la regulación de la proliferación y la supervivencia (Marcucci *et al.*, 2013). Su papel leucemogénico ha sido demostrado en modelos animales e incluso se ha propuesto como diana terapéutica (O'Connell *et al.* 2008; Alachkar *et al.* 2013).

Por tanto, los miRNAs no sólo juegan un importante papel en la biología de la LMA sino que podrían ayudar a subclasificar a los pacientes y establecer futuras dianas terapéuticas.

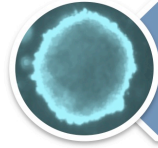
3.4 miRNAs y *MYBL2*

La región 3'UTR de *MYBL2* es susceptible de ser regulada por diversos miRNAs. Así se deduce de la búsqueda en bases de datos que predicen qué miRNAs o familias de miRNAs pueden regular a cada gen (www.microrna.org, www.targetscan.org y <http://diana.cslab.ece.ntua.gr>)

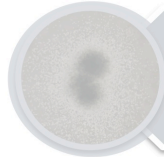
Adicionalmente, trabajos experimentales muestran la implicación de los miRNAs como las familias miR-29 o miR-30 en la regulación de los niveles de mRNA o de proteína de MYBL2 y la consecuente alteración de las rutas que éste regula en líneas celulares (Martínez *et al.*, 2011).



Introducción



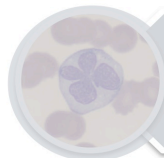
Hipótesis



Objetivos



Material y Métodos



Resultados



Discusión

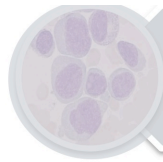


Conclusiones



Bibliografía

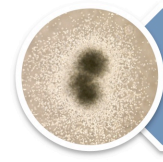
El descubrimiento de nuevos marcadores moleculares es importante tanto para comprender el mecanismo molecular subyacente al proceso leucémico como para poder diagnosticar, estratificar y caracterizar la LMA. A partir de las investigaciones previas descritas en la introducción sobre *MYBL2*, planteamos como hipótesis que la expresión de este gen podría estar desregulada en la LMA. Además, el hecho de que *MYBL2* presente una región 3'UTR susceptible de ser regulada por miRNAs, hace pensar que éstos podrían estar implicados en la alteración de su expresión. Por tanto, todos estos factores podrían influir en el desarrollo o mantenimiento del fenotipo leucémico. Por estas razones planteamos el estudio de miRNAs como posibles marcadores moleculares con valor diagnóstico y pronóstico en la LMA.



Introducción



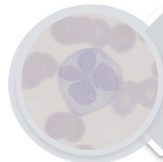
Hipótesis



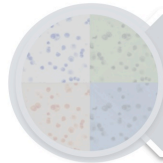
Objetivos



Material y Métodos



Resultados



Discusión

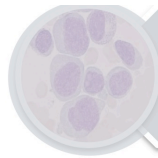


Conclusiones



Bibliografía

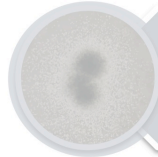
1. Determinar la expresión de *MYBL2* en células CD34+ de donantes sanos y en una serie de pacientes de LMA.
2. Determinar qué miRNAs están desregulados en la LMA respecto de las células CD34+ mediante *arrays* de expresión.
3. Validar los resultados de los *arrays* de miRNAs en una serie de LMAs y comprobar si existe asociación entre la expresión de alguno de los miRNAs desregulados y la de *MYBL2*.
4. Analizar si los miRNAs asociados a *MYBL2* regulan su expresión mediante estudios con mimics y de luciferasa.
5. Realizar estudios funcionales para dilucidar cómo afectan los miRNAs que regulan a *MYBL2* a los procesos biológicos que éste controla (ciclo celular, proliferación, apoptosis y senescencia) en la línea celular mieloide KG1.
6. Buscar asociaciones entre la expresión de *MYBL2* y los miRNAs que lo regulan, con las características clínico-biológicas de los pacientes de LMA.
7. Estudiar el valor pronóstico de *MYBL2* y de los miRNAs que lo regulan.



Introducción



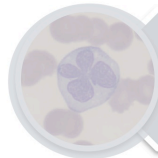
Hipótesis



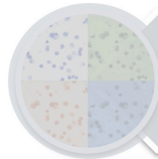
Objetivos



Material y Métodos



Resultados



Discusión



Conclusiones



Bibliografía

1. Pacientes y aspectos éticos

El estudio se llevó a cabo en una serie de 259 pacientes adultos (mayores de 16 años) diagnosticados de LMA no promielocítica entre 1999 y mayo de 2013. El estudio contó con la aprobación del comité ético de investigación clínica del Hospital Universitario y Politécnico La Fe y se obtuvo el consentimiento informado de todos los pacientes incluidos de acuerdo con la declaración de derechos humanos de la conferencia de Helsinki.

El único criterio de selección fue la disponibilidad de muestra para obtener RNA total.

Los subtipos de leucemia se establecieron de acuerdo con la clasificación FAB (Bennet *et al.*, 1976) y el cariotipo y el FISH (*Fluorescent in situ Hybridization*) se realizaron mediante métodos citogenéticos convencionales. El cariotipo permitió establecer la estratificación del riesgo citogenético de acuerdo con el criterio refinado del *Medical Research Council* (Grimwade *et al.*, 2010) o el de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Vardiman *et al.*, 2009).

La mediana de edad en la serie de LMAs al diagnóstico fue de 61 (17-91) años, de los cuales el 57,38% fueron varones y el 41,95% fueron mujeres. Después de la terapia de inducción, el 70,59 % de los pacientes alcanzaron la remisión completa (RC). Tras la inducción se procedió a la terapia de consolidación. Los casos elegibles fueron sometidos a transplante, autólogo o alogénico. El seguimiento de los pacientes fue revisado en marzo de 2014.

1.1 Tratamiento

Los pacientes de LMA fueron tratados con quimioterapia intensiva en la cual la inducción a la remisión de la enfermedad consistió en una combinación de antraciclina + citarabina con o sin etopósido según los protocolos PETHEMA LMA 99, 2007 y 2010 (www.pethema.org).

1.2 Separación leucocitaria de médula ósea

La médula ósea (MO) se recogió en tubos con EDTA-K3. Para lisar los hematíes se diluyeron 5 mililitros (mL) de sangre en 7 mL de tampón de lisis (NH_4Cl 0,155 M, KHCO_3 10 mM, Na.EDTA 0,1 mM, pH 7,4) y se incubó la mezcla en hielo durante 15 minutos (min). Se centrifugó a 1500 g durante 5 min y el pellet celular se resuspendió de nuevo en 7 mL de tampón de lisis. Se incubó en hielo durante 7 min y se volvió a centrifugar. El pellet se lavó dos veces con 5 mL de Tris-salino (Tris 50 mM, 150 mM NaCl, pH 7,4). Tras centrifugar y eliminar el sobrenadante, el pellet leucocitario se resuspendió en TRizol (Invitrogen) para la extracción de RNA.

2. Controles

Como controles sanos se utilizaron progenitores hematopoyéticos CD34+. Se trata de células albergadas sobre todo en la MO con capacidad de autorrenovación y que, al diferenciarse, dan lugar a las distintas estirpes mieloides y linfoides. Estas células expresan el antígeno de superficie CD34 mientras se mantienen indiferenciadas.

Las células CD34+ se obtuvieron a partir de muestras de sangre de cordón umbilical de donantes sanos anticoagulada con EDTA-K3 y que fueron procesadas en menos de 48 horas tras la donación. La obtención de estas células se realizó en varios pasos; primero se obtuvieron células mononucleadas (MNCs) y posteriormente se realizó la selección específica de las células CD34+.

2.1 Separación de las células mononucleadas

Se mezclaron 2/3 de sangre con 1/3 de HES 6% (20 mM Hepes, 1 mM EDTA, 250 mM sacarosa e inhibidor de proteasas; pH 7,4; Grifols) y se centrifugó la muestra a 40 g durante 15 min. El sobrenadante se recogió y se lavó con PBS-EDTA EDTA (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄·H₂O 8,1 mM, KH₂PO₄ 1,76 mM, EDTA 2mM; pH 7,4).

Las MNCs se aislaron de la fracción obtenida en el paso anterior mediante separación por gradiente de densidad utilizando Lymphoprep (Axis-Shield), una solución isoosmótica de densidad 1,077g/mL que retiene las MNCs. Para ello, 35 mL de sangre diluída se depositaron sobre 15 mL de Lymphoprep (con la precaución de no mezclar las dos fases) y se centrifugó a 400 g durante 35 min. Las MNCs se recogieron de anillo formado en la interfase del plasma y el Lymphoprep y se lavaron con PBS-EDTA.

2.2 Aislamiento de células CD34+

La separación de las células CD34+ se realizó mediante anticuerpos que reconocen específicamente el marcador de superficie CD34+ y están conjugados con partículas magnéticas que permiten su separación del resto de la muestra. Las MNCs lavadas se ajustaron a una concentración final de 10^8 células por cada 300 μL en PBS-EDTA para su marcaje con anticuerpos. El marcaje magnético se llevó a cabo añadiendo 100 μL de FcR blocking y 100 μL de anticuerpo CD34 MicroBead (Miltenyi Biotec) por cada 10^8 células e incubando la muestra durante 30 min a 4°C. Tras la incubación con el anticuerpo, las células se lavaron y se ajustaron a 10^8 células/500 μL en PBS-EDTA.

Las células CD34+ marcadas magnéticamente se cargaron en un Auto Macs (Miltenyi Biotec). Se seleccionó el programa de separación *Posseid2* y el de lavado *Rinse*. En el Auto Macs se unen las células marcadas a una columna MACS que está sometida a un campo magnético, de forma que quedan retenidas en ella y posteriormente se eluye la fracción positiva eliminando el campo magnético.

Tras la separación se cuantificó la fracción celular positiva y se analizó mediante citometría de flujo para obtener el porcentaje de células CD34+ obtenidas. Para ello se llevó la muestra al servicio de marcadores del hospital la Fe.

Finalmente se centrifugó la muestra de células CD34+ durante 5 min a 1600g. El pellet se resuspendió en 1 mL de TRIzol para la extracción de RNA.

3. Cultivos celulares

Se utilizó la línea celular KG1, inmortalizada a partir de la MO de un paciente varón con eritroleucemia que evolucionó a LMA. Esta línea celular tiene morfología de mieloblasto y expresa el marcador de superficie CD34+ (Koeffler, 1978).

Las células se cultivaron en RPMI-1640 con L-Glutamina, (GIBCO Laboratories), 10% de Suero Bovino Fetal (HyClone Laboratories) y 1% penicilina/streptomycina, a 37 °C en presencia de 5% de CO₂. Cada dos días las células se diluyeron a una concentración de 50x 10⁴ células/mL para su mantenimiento.

4. Extracción de RNA

4.1 Extracción de RNA total con TRIzol

El pellet celular se resuspendió en TRIzol (Invitrogen) y se homogeneizó utilizando una jeringuilla de insulina para romper eficientemente la integridad celular. Se añadió 200 µL de cloroformo, se agitó vigorosamente con un vórtex y se centrifugó a 12.000 g durante 10 min a 4 °C para favorecer la separación de dos fases. La fase superior (acuosa) fue transferida a un tubo nuevo y se le añadió el mismo volumen de isopropanol. Se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min para permitir la precipitación del RNA. Se centrifugó de nuevo durante 10 min a 12.000 g a 4 °C. Tras decantar el sobrenadante el pellet de RNA se lavó dos veces con 1 mL de etanol al 70% (diluido en agua libre de RNasas) y centrifugando a 7.500 g 5 min. El pellet se secó en una

bomba de vacío durante 10 min y se resuspendió en agua libre de RNAsas.

4.2 Extracción de RNA con el miRNA micro kit (Qiagen)

Este *kit* se utilizó para extraer el RNA de las células CD34+ que fueron hibridadas en los *arrays* de miRNAs. El paso final de purificación por columna también se aplicó a las muestras de LMA que se analizaron de la misma forma.

Las células CD34+ fueron resuspendidas en 700 μ l de Qiazol para ser lisadas. Se añadió 140 μ l de cloroformo y se homogeneizó la muestra. Después de incubarla durante 3 min se centrifugó a 12.000g 15 min, 4 °C. La fase acuosa generada tras la centrifugación se transfirió a un nuevo tubo, al que posteriormente se añadió 525 μ l de etOH al 100%. La muestra (o el RNA ya extraído que se quería purificar llevado a un volumen de 700 μ l con etOH) se pasó a una columna RNeasy MinElute, y se centrifugó a 8000 g durante 15 s a temperatura ambiente. Se descartó el eluido y se añadió a la columna 700 μ l de *buffer* RTW. Se centrifugó a 8000 g durante 15 s y tras eliminar el eluido se lavó con 500 μ l de *buffer* RPE. Se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones y se añadió a la columna 500 μ l de etOH al 80%. Se centrifugó durante 2 min a 8000 g y se colocó la columna en un tubo de recolección nuevo, para secar la membrana de la columna con la tapa abierta por centrifugación a máxima velocidad. El RNA purificado rico en miRNAs se obtuvo al añadir a la columna 14 μ l de H₂O libre de RNAsas.

4.3 Cuantificación y valoración de la calidad del RNA

Para los análisis de expresión mediante qRT-PCR el RNA se cuantificó y se valoró la presencia de interferentes con el espectrofotómetro NanoDrop ND 1000 (Thermo Scientific) y mediante electroforesis en gel de agarosa. Para la hibridación del RNA en *arrays* de expresión de miRNAs también se valoró su integridad en un bioanalizador 2100 (Agilent Technologies).

Nanodrop y electroforesis en gel de agarosa

El NanoDrop mide la absorbancia a 260 nm y aplica la ley de Lambert-Beer, considerando como coeficiente de extinción molar del RNA un valor de 40 ng·cm/μl. Para analizar la pureza y la presencia de interferentes, mide el ratio entre la absorbancia a 260 y 280 nm, que valora la pureza en RNA. Se considera que una muestra de RNA es pura cuando éste ratio tiene un valor entre 1,8-2,0. Valores menores de 1,8 indican la presencia de contaminantes que absorben a longitudes de onda cercanas a 280 nm, como proteínas o fenol. También mide el ratio entre la absorbancia a 260 y 230 nm, un valor secundario para la medida de la pureza en ácidos nucleicos de la muestra. Valores bajos de este ratio indican la presencia de contaminantes como EDTA o fenol.

La integridad del RNA se valoró mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1%. La visualización de bandas correspondientes a la subunidad 18 y 28 ribosomales constituyó un criterio de calidad del RNA.

Bioanalizador

La calidad del RNA para su uso en *arrays* de expresión de miRNAs se valoró mediante electroforesis en un Bioanalizador *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies) con el *Agilent RNA 6000 Nano Kit* para RNA total.

La integridad del RNA se mide mediante el *RNA Integrity Number* (RIN), que estima la integridad del RNA total independientemente de su concentración en una escala de 0 al 10. El RIN tiene en cuenta el trazo electroforético total, no únicamente subunidades ribosomales (como ocurre en el caso de la electroforesis en gel de agarosa) y también la presencia o ausencia de productos de degradación. Sólo se utilizaron muestras de RNA con un RIN superior a 8 para hibridar los *arrays* de miRNAs.

5. Selección de miRNAs desregulados

Para determinar qué miRNAs están desregulados en la LMA se realizaron *arrays* de expresión. De los miRNAs desregulados, se consultó en las bases de datos bioinformáticas cuáles de ellos podrían regular a *MYBL2* por homología de secuencia.

5.1 Análisis de la expresión de miRNAs mediante *arrays* de expresión

Para el estudio de los perfiles de expresión de miRNAs se partió de 250 ng de RNA total de 7 pacientes de LMA de novo con un alto porcentaje de blastos (>70%) y positivos para el marcador CD34, y de 5 muestras de células CD34+ con una pureza mayor al 80%. El RNA se marcó con el *FlashTag™ Biotin HSR RNA Labeling Kit* (Genisphere). Tras el marcaje se hibridó con el *array miRNA 3.0* en una plataforma Affimetrix. Este *array* contiene 19.913 sondas de las cuales 5818 corresponden a miRNAs maduros y e inmaduros humanos. Después de la hibridación se utilizó el *GeneChip® Scanner 3000 7G System* para obtener los valores de expresión de los miRNAs. Los resultados fueron analizados con el programa *Expression Console* y con el *PARTEK* (Affimetrix).

5.2 Análisis bioinformático

Los perfiles de expresión de miRNAs obtenidos de los *arrays* de expresión generaron listas de miRNAs diferencialmente expresados entre las células CD34+ de donantes sanos y las muestras de LMA.

De entre los miRNAs alterados, se analizó mediante programas bioinformáticos cuáles tenían capacidad potencial de unirse a la región 3'UTR *MYBL2*. Para ellos se utilizaron las bases de www.mirbase.org, www.microrna.org y www.targetscan.org.

6. Análisis de expresión por PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)

Los estudios de expresión se realizaron utilizando cDNA transcrito a partir del RNA de MO en el caso de los pacientes, de células CD34+ de sangre de cordón en el caso de los controles y de las células KG1.

6.1 Transcripción reversa

Para obtener el cDNA a partir del RNA se utilizó el *kit* de transcripción reversa miScript (Qiagen), que permite la retrotranscripción tanto del mRNA como de los miRNAs. El mRNA se retrotranscribe mediante el uso combinado de oligómeros al azar y oligo-dTs. La retrotranscripción de los miRNAs se lleva a cabo paralelamente a la poliadenilación de los mismos, lo que permite la síntesis del cDNA a partir de un cebador oligo dT.

El protocolo de retrotranscripción consistió en la incubación de *mix* de reacción (Tabla 6) a 37 °C durante 1 h y posteriormente a 95 °C durante 5 min. El cDNA obtenido se diluyó hasta un volumen total de 200 µl para tener suficiente muestra para el análisis de la expresión de *MYBL2* y todos los miRNAs, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Tabla 6. Protocolo de reacción de la transcripción reversa llevada a cabo con el kit de Qiagen miScript.

Reactivo	Volumen (μ l)	Conc. final
5x HiFlex Buffer	4	1X
10X miScript Reverse Transcriptase Mix	1	1X
Inhibidor de RNAasas (20 U/ μ L)	0,4 (8 U)	0,4 U/ μ l
H ₂ O	10,6	
RNA (500 ng/ μ L)	1 (500 ng)	25 ng/ μ l

6.2 Análisis de expresión de *MYBL2* y los miRNAs

La cuantificación por qRT-PCR se basa en la detección del Umbral de ciclos (*Ct*, *Cycle Threshold*) o ciclo a partir del cual empieza a detectarse un producto de PCR mediante fluorescencia de manera significativa. El *Ct* es inversamente proporcional al número de copias de cDNA que tiene una muestra. Para la detección del *Ct* se pueden utilizar sondas específicas (sondas Taqman o de hibridación) o agentes intercalantes (Sybr Green) que emiten fluorescencia a medida que se va amplificando el producto de PCR (Heid *et al.*, 1996).

Los resultados obtenidos se normalizan utilizando un gen de referencia para minimizar la variabilidad entre las muestras debida a diferentes factores (cantidad de RNA de partida, degradación, variaciones en el procesamiento de las muestras, etc.). El gen de referencia debe presentar una expresión constante en las muestras de estudio y debe tener una eficiencia del a PCR similar a la del gen estudiado.

Mediante dicho procedimiento se cuantificó de la expresión tanto de *MYBL2* como de los miRNAs, utilizando como control interno el gen de la β -glucuronidasa (*GUS*) o el miR-U6b en un equipo ABI 7500 Fast (Applied Biosystem).

6.3 Método de cuantificación relativa

Para expresar los niveles de expresión tanto de los genes como de los miRNAs se utilizó el método del Delta-Delta Ct (Pfaffl, 2001) considerando como calibrador las células CD34+. Para ello se determinó el Ct de *MYBL2* o del miRNA de interés tanto en el control endógeno como en el calibrador. Posteriormente se calculó el ΔCt , siendo éste la diferencia entre el Ct de la diana estudiada y el control interno. Finalmente, se calculó el $\Delta\Delta\text{Ct}$ para obtener la expresión normalizada del gen diana mediante la fórmula: $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}(\text{LMA}) - \Delta\text{Ct}(\text{CD34+})$. La expresión normalizada de la diana de estudio se calcula como $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$.

6.4 Protocolo de PCR para *MYBL2*

La expresión de *MYBL2* se determinó utilizando el *Assay on demand* el Hs00231158-m1 (Applied Biosystems), que utiliza sondas Taqman. La expresión de gen *GUS* se determinó usando los cebadores ENF1102 (5'GAAAATATGTGGTTGGAGAGCTCATT-3') y ENR1162 (5'CCGAGTGAAGATCCCCTTTTA-3') y la sonda Taqman ENP1142 (Fam-CCAGCACTCTCGTCCGGTACTGTTCA-Tamra) descritos por Beillard *et al.*, 2003. Los protocolos de PCR se muestran en la Tabla 7 y el programa de PCR en la Tabla 8.

Tabla 7. Protocolo de PCR para el análisis de expresión de *MYBL2* y *GUS*

Reactivo	Volumen (μL)	Conc. final
Mix reacción para el estudio de la expresión de <i>MYBL2</i>		
Assay <i>MYBL2</i> HS00231158_m1 (20X)	1,25	1X
Taqman Universal Master Mix 2x	12,5	1X
H ₂ O	9,5	
cDNA	2	
Mix reacción para el estudio de la expresión de <i>GUS</i>		
ENF1105 (5 μM)	2,5	0,5 μM
ENF 1162 (5 μM)	2,5	0,5 μM
ENP1142 (2 μM)	1,9	0,152 μM
TaqMan Universal Master Mix 2x	12,5	1x
cDNA	2,0	
H ₂ O	3,6	

Tabla 8. Programa de PCR para el análisis de expresión de *MYBL2* y *GUS*

Paso	Tiempo	T ^a ($^{\circ}\text{C}$)
<i>Holding stage</i>	2 min	50
Activación de la DNA Taq Hot-start	10 min	95
	15 s	95
45 ciclos PCR	1 min	60

6.5 Protocolo de PCR para los miRNAs

La cuantificación de la expresión de los miRNAs se realizó mediante Sybr Green con el el *kit* de PCR miScript (Qiagen) utilizando cebadores específicos para cada uno de ellos (Tabla 9). Como gen de referencia para normalizar los niveles de expresión de los miRNAs se utilizó el miR-U6b.

Tabla 9. miScript *primer Assays* para cada uno de los miRNAs cuya expresión ha sido analizada

miRNA	miScript Primer Assay	Secuencia miRNA maduro
hsa-miR-4668-5p	MS00040264	5'-AGGGAAAAAAAAAAGGAUUUGUC-3'
hsa-miR-4507-3p	MS00040894	5'-CUGGGUUGGGCUGGGCUGGG-3'
hsa-miR-126-3p	MS00005999	5'-UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG-3'
hsa-miR-146-5p	MS00003542	5'-UGAGAACUGAAUUCCAUAGGCU-3'
hsa-miR-29a-3p	MS00003262	5'-UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA-3'
hsa-miR-30a-5p	MS00007350	5'-UGUAAACAUCCUCGACUGGAAG-3'
hsa-miR-30b-5p	MS00003276	5'-UGUAAACAUCCUACACUCAGCU-3'
hsa-miR-30c-5p	MS00009366	5'-UGUAAACAUCCUACACUCAGC-3'
hsa-miR-30e-5p	MS00009401	5'-UGUAAACAUCCUUGACUGGAAG-3'
hsa-miR-494-3p	MS00033754	5'UGAAACAUACACGGGAAACCUC-3'
hsa-miR-99a-5p	MS00032158	5'AACCCGUAGAUCCGAUCUUGUG-3'
hsa-miR-151b-3p	MS00037513	5'UCGAGGAGCUCACAGUCU-3'
RNU6B_13	MS00014000	5'-GTGCTCGCTTCGGCAGCACATATACTA AAATTGGAACGATACAGAGAAGATTAG CATGGCCCTGCGCAAGGATGACACG CAAATTCGTGAAGCGTCCATATTTTT-3'

Los protocolos de PCR para los miRNAs se muestran en la Tabla 10 y el programa de PCR en la Tabla 11.

Tabla 10. Protocolo de PCR para la expresión de miRNAs

Reactivo	Volumen (μ L)	Concentración final
H ₂ O	4	
10X Universal Primer	2	1X
10X miScript Primer Assay	2	1x
2X Sybr Green	10	1X
RNA (500 ng/ μ L)	2 (1000 ng)	50 ng/ μ L

Tabla 11. Programa de PCR para el análisis de expresión de miRNAs

Paso	Tiempo	T ^a (°C)
<i>Holding stage</i>	2 min	50
Activación de la DNA Taq Hot-Start	10 min	95
40 ciclos PCR	15 s	95
	1 min	60

6.6 Criterio de hiperexpresión e infraexpresión

El criterio de hiperexpresión o infraexpresión de *MYBL2* y los miRNAs que se utilizó fue el valor de la mediana de expresión: los pacientes que hiperexpresaban *MYBL2* o los miRNAs fueron los que mostraron una expresión mayor a la mediana para cada uno de ellos. Del mismo modo, los pacientes que infraexpresaban *MYBL2* o los miRNAs fueron aquellos que mostraron una expresión menor a la mediana.

7. Análisis de los niveles de proteínas: Western Blot

7.1 Lisis celular y cuantificación de proteínas

Las células de interés se obtuvieron por centrifugación (1100 g, 5 min) y el pellet celular se lisó de forma pasiva durante 30 min en RIPA frío (Invitrogen) suplementado con inhibidor de proteasas (Complete, Roche) y fosfatasa (Thermo Scientific). La concentración de proteínas se determinó mediante el método de *Protein Assay* (Biorad) o Ácido Bicinchonínico (BCA) (Pierce). Ambos métodos utilizan medidas colorimétricas para inferir la concentración proteica de una muestra a partir de una recta patrón.

El *Protein Assay* se basa en el método de Bradford (1976). El Azul Brillante Coomassie G-250 reacciona con los grupos básicos (especialmente con la cadena lateral de la arginina) y con los aminoácidos aromáticos. Esta reacción provoca un cambio de longitud de onda en la absorbancia de este reactivo de 465 a 595 nm.

El *BCA protein assay* combina la reducción del Cu^{2+} a Cu^{1+} por las proteínas en medio alcalino con la alta sensibilidad y selectividad

de la detección colorimétrica catión Cu^{1+} por el ácido bicinchonínico. El producto resultante es hidrofílico y tiene una alta absorbancia a 562 nm que se mantiene lineal a concentraciones crecientes de proteína. La reacción colorimétrica del BCA se debe principalmente a la cisteína, tirosina y triptófano, aunque el esqueleto peptídico también contribuye a esta reacción, lo que minimiza la variabilidad debida a la composición proteica de cada muestra.

7.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida y transferencia

Se mezclaron cantidades iguales de proteína con tampón de Laemli (concentración final 2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 10% glicerol, 0,002% azul de bromofenol, 62,5 mM Tris HCl), se hirvieron durante 5 min y se cargaron en un gel de poliacrilamida (PA). La composición del gel de concentración y el de resolución pueden verse en la Tabla 12.

Tabla 12. Composición del gel de concentración y de resolución para preparar un gel de poliacrilamida al 10%

Reactivo	Volumen	Concentración final
Gel de concentración (2mL)		
H ₂ O	1,5 mL	
1,5 M Tris (pH 6,8)	250 μL	$1,88 \times 10^{-3}$ M
40% <i>Acryl Mix</i>	200 μL	4%
SDS 10%	20 μL	0,1%
APS 10%	20 μL	0,1%
Temed	2	
Gel de resolución (10 mL)		
H ₂ O	4,8 mL	
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5 mL	$3,75 \times 10^{-1}$ M
40% <i>Acryl Mix</i>	2,5 mL	10%
SDS 10%	0,1 mL	$10^{-4}\%$
APS 10%	0,1 mL	$10^{-4}\%$
Temed	0,004 mL	

Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa o de PVDF previamente activada con metanol aplicando una corriente de 50V durante 60 min.

Los anticuerpos primarios utilizados para detectar las proteínas fueron los siguientes:

- Rabbit anti-MYBL2 (N19) (1:800; sc-724; Santa Cruz Biotechnology, Inc)
- Rabbit anti-pMYBL2 (phospho T487) (1:1000; ab76009; Abcam)
- Mouse anti-actina (1/5000; AC-15; Sigma) (control de carga)

Los anticuerpos secundarios fueron IgG conjugados con peroxidada de rábano:

- Sheep anti-rabbit (1:15.000; ab6721-1; Abcam)
- Sheep anti-mouse (1:15.000; ab6808; Abcam)

El revelado para visualizar las bandas de proteína con la peroxidasa se realizó con *ECL Western Blotting Detection Reagents* (Amersham Biosciences).

8. Mimics y plásmidos de expresión

8.1 mimics

Los *mimics* son oligonucleótidos de RNA de doble cadena que “imitan” la función de sus miRNAs homólogos y consecuentemente producen una reducción en la expresión o traducción sus genes dianas. Los *mimics* utilizados fueron los mirVana (Life Technologies), que están modificados químicamente para que la hebra madura sea

utilizada por la proteína Argonauta (Ago), como ocurre durante el proceso de maduración normal de los miRNAs, mientras que la hebra *star*, la no funcional, es degradada y eliminada del complejo. Este proceso asegura que sólo la hebra de interés, que es complementaria a la diana, produzca el efecto deseado. Como control negativo se utilizó el mimic *Negative control #1*, que no es complementario a ningún gen humano, de ratón o de rata, por lo que no tiene efectos en la expresión génica.

Para ver el efecto de los miRNAs miR-30a y miR-30c se nucleofectaron células KG1 con mimics (mimic-30a o mimic-30c) o *Negative control #1*. Las células nucleofectadas se recogieron por centrifugación tras 24, 48 y/o 72 horas. Después se lavaron con PBS y se midieron los niveles de mRNA de *MYBL2* (qRT-PCR) y de proteína (western blot) o se llevaron a cabo estudios funcionales.

8.2 Plásmidos

pMir-*MYBL2*

Para analizar la unión del miR-30a a la región 3'UTR de *MYBL2* se utilizó el vector pMirTarget, que tiene clonada la región 3'UTR de dicho gen tras el de la luciferasa de *firefly*. Este vector se transcribe bajo el promotor SV40, pero se traduce con un *internal ribosome entering sequence* (IRES). El IRES tiene un diseño que no afecta a la interacción del miRNA con su diana pero reduce significativamente los niveles de expresión de la luciferasa si hay unión, por lo que pequeños cambios de expresión pueden ser detectados. El plásmido también expresa la proteína roja

fluorescente (RFP) bajo el promotor del CMV (lo que permite monitorizar la transfección) y la neomicina bajo el promotor SV40.

pCMV-miR30a/vector vacío

Para aumentar artificialmente la expresión del miR-30a se utilizó el pCMV-MIR (Origene Technologies), que estructuralmente es similar al anterior pero en este caso expresa la proteína verde fluorescente (GFP) y tiene clonada la región genómica correspondiente al miR-30a y las secuencias colindantes.

pRL-TK (Luciferasa de *Renilla*)

Para monitorizar la transfección y normalizar los valores de expresión de la luciferasa de *Firefly* se utilizó el plásmido pRL-TK (Promega) que expresa la luciferasa de *Renilla*. Las unidades relativas de luminiscencias (RLUs) se calcularon como el ratio entre la señal producida por [*Firefly/Renilla*] x 100.

Amplificación en *E.coli* DH5a de los plásmidos

Se transformaron las bacterias competentes *Library Efficiency DH5a Competent Cells* (Invitrogene) para amplificar los plásmidos. Para ello se descongelaron las bacterias en hielo, se trasvasaron 100 μ L de células a un eppendorf estéril (100 μ L por cada plásmido), se añadió 1-10 ng de plásmido a las bacterias y se incubó en hielo durante 30 min. Trascurrido este tiempo se transformaron mediante choque térmico en un baño a 42 °C durante 45 s. Seguidamente se incubaron las células durante 2 min en hielo, se diluyeron en 0,9 mL de medio SOC (2% triptona, 0,4% extracto de levadura, 0,4% glucosa,

10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄) y se incubaron durante una hora en agitación (225 rpm) a 37 °C.

Para pasar las bacterias a un medio selectivo y permitir únicamente el crecimiento de las bacterias transformadas con los vectores, las células se centrifugaron durante 10 min a 12.000 rpm. Se decantó el sobrenadante y se sembró 20 µL del líquido residual en placas de Petri con LB-Agar-Amp (medio LB (10 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura, 10 g/L NaCl) con 1,5% Bacto-agar y 50 µg/mL ampicilina) para el plásmido pRL-TK o LB-Agar-Kan (LB-Agar con 50 µg/mL de kanamicina) para pMir y pCMV-Mir.

Las placas se mantuvieron a 37 °C durante 24-48 h y las colonias y se cultivaron en 3 mL de LB-Amp o LB-Kan durante 16 h a 37°C (precultivo). Tras ese tiempo se diluyeron en 50 o 100 mL de medio y se dejaron crecer durante 24 h.

Purificación de los plásmidos (mini y maxi preps)

Para comprobar que las colonias se habían transformado correctamente se hizo una primera extracción con una miniprep *Wizard Pus SV Minipreps DNA purifications System* (Promega).

Miniprep

Se centrifugaron 5 mL de cultivo bacteriano a 12.000 g durante 5 min (4°C). Al pellet se le añadió 250 µL del buffer de resuspensión y 250 µL de buffer de lisis. Se mezcló por inversión y se añadió 10 µL de proteasa alcalina, se invirtió la mezcla y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Posteriormente se añadió 350

μL de solución de neutralización, se mezcló por inversión y se centrifugó a 13.000 g durante 5 min. El sobrenadante se decantó dentro de una columna de purificación y se centrifugó a velocidad máxima durante un min. Se lavó la columna con 750 μL de solución de lavado y se volvió a centrifugar durante un minuto. Se repitió el proceso de lavado con 250 μL y centrifugando dos min.

El plásmido se eluyó tras un min de centrifugación en 100 μL de agua libre de nucleasas. El eluido se cuantificó con el Nano-Drop. En caso de contener DNA plasmídico, se consideró que la colonia de origen contenía el plásmido. En ese caso se procedió a obtener una gran cantidad del mismo libre de endotoxinas con una maxiprep.

Maxiprep

Se recogieron 50-100 mL de bacterias por centrifugación (6000g, 15 min, 4°C) y se aislaron los plásmidos con el *Endo Free Plasmid Maxi Kit* (Qiagen). Para lisar las bacterias, el pellet se resuspendió en 10 mL de buffer P1, se añadió 10 mL de P2 y tras mezclar por inversión se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. El lisado se purificó con el QIAfilter, vertiéndolo en el cartucho y dejándolo filtrar durante 10 min. Transcurrido este tiempo se finalizó este paso con un émbolo para forzar la salida de todo el filtrado.

Al lisado celular filtrado se añadió 2,5 mL de ER, se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente 30 min. Durante ese tiempo se equilibró la columna QIAGEN-500 con 10 mL de buffer QBT y posteriormente el lisado se vertió en la columna. Ésta se lavó dos veces con 30 mL de QC y el plásmido se eluyó con 15 mL de QN, con la precaución de recogerlo en un tubo nuevo.

Los plásmidos se precipitaron con 0,7 volúmenes de isopropanol y centrifugación a 15.000 g durante 30 min a 4°C. El sobrenadante se decantó y el pellet, tras secarlo, se resuspendió en 50 µL de H₂O. La cantidad de plásmido se cuantificó con un nanodrop y se comprobó que el plásmido era el esperado por digestión.

Digestión

Para la digestión de los plásmidos pMir-Target (tanto el que tiene la región 3'UTR como el plásmido vacío) se utilizaron las enzimas HindIII y XbaI. Para digerir el plásmido pCMV-Mir se escogieron las enzimas EcoRV y HindIII. El plásmido pRL-TK fue digerido con BamHI y HindIII.

9. Estudios Funcionales

9.1 Sincronización del ciclo celular

Las células se sincronizaron mediante diferentes métodos para lograr el arresto en las diferentes fases del ciclo celular. Para ello se sembraron a una densidad de $0,5 \times 10^6$ células/mL y se llevaron a cabo los distintos tratamientos:

- Para bloquear las células en G0/G1 se modificó la composición del medio de cultivo, preparándolo con diferentes concentraciones de suero bovino fetal (SBF): 10% (control), 2%, 1%, 0,5%. La reducción de SBF en la composición de medio de cultivo hace que las células crezcan en condiciones subóptimas, de forma que tienen una actividad basal en la que quedan bloqueadas en fase G0/G1 del ciclo celular.
- Para arrestar las células en G2/M se preparó medio de cultivo con 0,01 $\mu\text{g/mL}$ de colzemida (Karyomax, Gibco). La colzemida impide la formación del huso acromático e impide que las células entren en mitosis.
- El bloqueo en fase S se realizó incubando las células en medio de cultivo con 2 mM de hidroximetilurea (Sigma). La hidroximetilurea inhibe la ribonucleótido reductasa, y bloquea la síntesis de DNA y la división celular.

Para el estudio del ciclo celular se marcaron las células con yorduro de propidio (PrI). El PrI es un agente intercalante que emite fluorescencia cuando está asociado al DNA. El análisis de células marcadas con PrI mediante citometría de flujo permite detectar las diferentes fases del ciclo celular ya que el contenido de DNA antes y

después de entrar en la fase S del ciclo celular es diferente. Antes de la fase S las células son diploides y la señal emitida por el Pr1 es menos intensa que después de la fase de síntesis, en la que las células son doblemente diploides y por tanto la señal de éstas células es más fuerte. El Pr1 no puede atravesar la membrana plasmática libremente, por lo que se necesita añadir algún tipo de detergente como el IGEPAL para permitir su entrada y la célula (Figura 6).

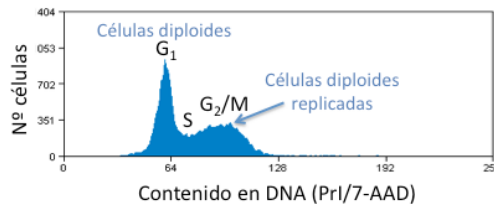


Figura 6. Análisis de ciclo celular por citometría de flujo de células KG1. El eje de ordenadas indica el número de células y el eje de abscisas la intensidad de fluorescencia, en este caso detectada en el canal azul, ya que las células se marcaron con Pr1.

Los cultivos con los diferentes tratamientos para bloquear el ciclo celular se incubaron durante 19-24 horas. Posteriormente se analizaron por citometría de flujo con el objetivo de comprobar el arresto del ciclo celular. Para ello, las células se centrifugaron y lavaron con PBS. Se resuspendieron en 400 μ L de PBS y se añadió 400 μ L de Pr1 (concentración final 5 μ g/ml en PBS) y 40 μ L de IGEPAL (Sigma) al 10%. Tras comprobar el bloqueo del ciclo celular se retiró el tratamiento. Las células se lavaron en PBS y se incubaron durante 4-24 horas con medio de cultivo normal. Durante este tiempo se cogieron alícuotas y se analizaron por citometría de flujo como se ha descrito anteriormente para comprobar la re-entrada en el ciclo celular.

9.2 Transfección celular

La transfección celular se realizó con un Amaxa Nucleofector 4D (Lonza). Este método se basa en la combinación de parámetros eléctricos y reactivos de nucleofección específicos para cada tipo celular que permiten la entrada directa del DNA o RNA al núcleo.

Para la transfección de la línea celular KG1 se recogieron 5×10^6 células del cultivo, se añadió 5 μg de plásmido(s) o 100 pg de mimics y se resuspendió todo en 100 μL de solución SF. Se depositó todo en la cubeta de nucleofección y se seleccionó el programa FF-100. Se añadió 500 μL de medio RPMI completo a las células nucleofectadas y se incubó a 37 $^{\circ}\text{C}$ en presencia del 5% de CO_2 durante 10 min. Finalmente se transfirió todo a un pocillo de una placa de 6 pocillos, con 3,4 mL de medio de cultivo atemperado a 37 $^{\circ}\text{C}$. Las células transfectadas se incubaron durante 24, 48 o 72 horas antes de proceder a su análisis.

9.3 Ensayos de luciferasa

Para testar la unión del miR-30a a la region 3'UTR de *MYBL2* se utilizó el *Dual-Glo Luciferase Assay System* (Promega). Para ello se nucleofectaron 5×10^6 células KG1a con 5 μg totales de pCMV-miR30a/control:pMir-*MYBL2*:pRL-TK (30:10:1) (por triplicado). Tras 24 horas de incubación a 37 $^{\circ}\text{C}$ y 5% de CO_2 , las células se lisaron pasivamente durante 10 min y se midió por duplicado la actividad de la luciferasa de *firefly* con el *Dual-Glo Reagent*. Con el *Dual-Glo Stop & Glo reagent* se paró la actividad de *firefly* y se activó la actividad luciferasa de *Renilla*. Para detectar la emisión de luz se utilizó un

luminómetro para microplacas GLOMAX. La emisión de fotones de la *Renilla* sirvió para normalizar las transfecciones (En el apartado 8 de Material y Métodos puede verse el fundamento del uso de estos plásmidos).

9.4 Ensayo de viabilidad celular

Para estudiar la viabilidad celular se utilizó el *Cell Titer 96 Aqueous one solution cell proliferation assay* (Promega). Este kit contiene dos reactivos: MTS (reactivo de Owen o 4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio) y PES (etosulfato fenacínico). El MTS no puede entrar en las células y por tanto es indirectamente reducido por el NADH o NADPH generado por las deshidrogenasas de las células con metabolismo activo. Al ser reducido, el MTS genera un producto (formazán) con absorbancia a 490 nm, que es proporcional al número de células metabólicamente activas. El PES es permeable y actúa como lanzadera de protones al ser directamente reducido por las deshidrogenasa celulares y es el compuesto químico que reduce al MTS extracelularmente (Figura 7).

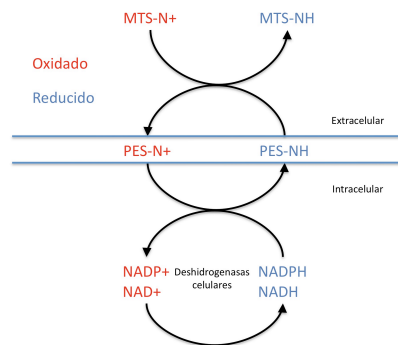


Figura 7. Reacciones químicas del ensayo de MTS. Reacciones redox que permiten cuantificar el número de células metabólicamente activas colorimétricamente a través de la absorbancia del MTS reducido.

Para este ensayo, en una placa de 96 pocillos se añadieron 10^4 células/100 μL de medio de cultivo en triplicado y se añadió 20 μL de reactivo a cada pocillo. Se incubó a 37 $^{\circ}\text{C}$ en presencia del 5% de CO_2 durante 4 horas. Posteriormente se obtuvo la absorbancia a 490 nm en un colorímetro Sunrise (Magellan Biosciences).

9.5 Ensayo de proliferación celular y ciclo celular: BrdU

Para estudiar la proliferación celular se analizó la incorporación de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) en el DNA. El BrdU es un análogo pirimidínico que se incorpora en el DNA en lugar de las timidinas durante la replicación. El BrdU puede ser detectado posteriormente con el uso de anticuerpos anti-BrdU conjugados a diferentes marcadores. En este caso se utilizaron anticuerpos marcados con fluoróforos (FITC) y se analizaron los resultados por citometría de flujo.

Se llevaron a cabo dos tipos de marcaje: de "pulso único" y de "pulso y caza". Aunque con los dos métodos se analizan diferencias en la proliferación y ciclo celular, el experimento de pulso y caza permite seguir a lo largo del tiempo el comportamiento de las células que han entrado en fase S durante el marcaje, de forma que el análisis es más detallado. En ambos casos el BrdU se añadió a las células a una concentración final de 20 μM en medio de cultivo.

Pulso único

Para el análisis de pulso único las células se incubaron con BrdU durante 3 h a 37 $^{\circ}\text{C}$ en presencia del 5% de CO_2 . Tras la

incubación, las células se recogieron por centrifugación (1200 g, 5 min) y se lavaron con PBS.

Pulso y caza

En el caso del estudio de pulso y caza, las células se incubaron en BrdU durante una h, posteriormente se lavaron y se dejaron en cultivo sin BrdU durante 1, 4 y 6 h y tras la incubación se recogieron las células por centrifugación (1200 g, 5 min).

Fijación de las células

Tras el marcaje las células se fijaron con etOH frío al 70% durante 30 min. Para la fijación se resuspendió el pellet en 250 μ L de PBS y se añadió 750 μ L de etOH al 100% gota a gota en agitación ligera (vórtex). Tras la fijación se re-hidrataron las células en 1 mL de PBS durante 20 min a T^a ambiente. Seguidamente se centrifugaron para ser resuspendidas en 200 μ L de HCl 1,2 N. Las células se incubaron durante 20 min a T^a ambiente y posteriormente se lavaron 4 veces con PBS-Tween20 0,1%. Finalmente se dejaron en PBS durante 20 min a T^a ambiente.

Marcaje con anticuerpos

La muestra se separó en dos mitades para su marcaje con los anticuerpo conjugados con FITC. La mitad se incubó con el isotipo control y la otra mitad con el anticuerpo anti-BrdU durante una hora a temperatura ambiente. Tras la incubación con el anticuerpo las células se lavaron dos veces con PBS-Tween 20 0,1% y el DNA se marcó con 200 μ L de 7-Aminoactinomicina (7-AAD) (Sigma) a 20

ng/mL. Los cambios en la proliferación y ciclo celular se visualizaron mediante citometría de flujo en un citómetro Cyan-ADP (Bekman Coulter).

9.6 Ensayos de apoptosis

La apoptosis es un tipo de muerte celular, programada genéticamente, que degrada las estructuras celulares rápidamente de forma controlada a través de la activación de proteasas e hidrolasas sin afectar a las células vecinas. Algunos procesos que tienen lugar durante la apoptosis pueden utilizarse para monitorizarla y detectarla.

Anexina V

La fosfatidilserina (PS) es un fosfolípido que se localiza en la cara citosólica de la membrana plasmática. En etapas tempranas de la apoptosis, la PS invierte su posición, translocándose a la cara extracelular. La anexina V es una proteína que tiene afinidad por la PS y se une a ésta de manera calcio-dependiente. En células no apoptóticas, la anexina V no se une a la superficie celular puesto que no contiene PS en esa cara. Sin embargo, en células apoptóticas la anexina V se une a la superficie celular. Los ensayos de anexina V utilizan esta proteína conjugada a fluoróforos que permiten monitorizar su unión a las células (Figura 8).

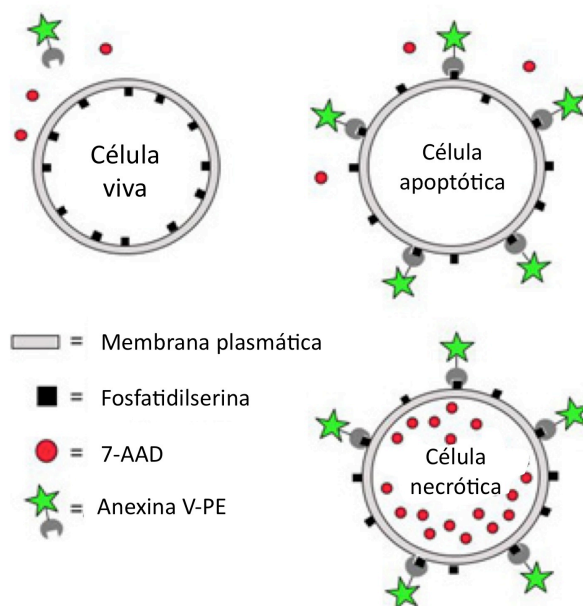


Figura 8. Ensayo de apoptosis con detección de Anexina V. La anexina V tiene afinidad por la FS, molécula ubicada en la cara intracelular en las células vivas. Durante el proceso de apoptosis, la integridad de la membrana plasmática se pierde y la FS queda expuesta en la cara extracelular. Las células apoptóticas quedan marcadas gracias a la anexina V conjugada a un fluoróforo, que puede ser detectado por citometría de flujo. Si la célula está en fases tardías de la apoptosis o en estado necrótico, el 7-AAD puede pasar al interior celular.

Para la detección de células apoptóticas con la anexina V se utilizó el *kit* de BD Biosciences. Para ello, 5×10^5 células se resuspendieron en 100 μL de 1X *Binding Buffer* (BB) tras 48 y 72 h de la nucleofección. Se añadió 5 μL de Anexina V conjugada con ficoeritrina (PE) y 5 μL de 7-AAD. Se incubó a temperatura ambiente en oscuridad durante 15 min y finalmente se añadió 400 μL de 1xBB antes del análisis por citometría de flujo.

TUNEL

La fragmentación del DNA ocurre durante el proceso de endonucleosis, que se produce como consecuencia de la cascada de señalización apoptótica. Este fenómeno puede detectarse con la desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT). Este enzima añade dUTPs marcados al DNA fragmentado en las mellas del DNA, a partir de los extremos 3'OH libres. Esta técnica, en inglés, es conocida como *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick end Labelling* (TUNEL).

La técnica de TUNEL se realizó a las 48 horas de la nucleofeción y se analizó mediante microscopía confocal. Se hizo un *citospín* de las células centrifugando a 8000 g durante 10 min para depositarlas en un porta objetos. Para el marcaje de las células se utilizó el *In Situ cell death detection kit* (Roche). En un primer paso se fijaron las células con PBS con paraformaldehído al 4%. Se lavaron con PBS y se permeabilizaron con 0,1% Triton X-100. Para el marcaje, las células se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con 50 µl de solución de marcaje (compuesta por solución enzimática y de marcaje 1:10). Se cubrió la zona con un cubreobjetos y se incubó a 37 °C en oscuridad durante 60 min. Tras la incubación se eliminó el exceso solución de marcaje lavando tres veces con PBS y se preparó el porta para su análisis por microscopía confocal con medio de montaje *Vectashield* con DAPI (Vector Laboratories). Las imágenes se adquirieron en un microscopio confocal Zeiss LSM 510 Meta y se analizaron con el programa Zeiss *LSM Image Browser v4.2* (Carl Zeiss Ltd).

En el experimento se incluyó un control positivo y uno negativo de apoptosis. Para el control negativo se marcaron células no transfectadas en crecimiento exponencial. Para el control positivo se marcaron células previamente tratadas con 2 µg/mL camptotecina en medio de cultivo (Sigma) durante 4 horas. La camptotecina es un agente citotóxico que inhibe la DNA topoisomerasa I y como consecuencia se activa la cascada de señalización apoptótica en las células.

9.7 Ensayo de senescencia

La senescencia es un proceso por el que las células quedan bloqueadas la fase G1 del ciclo celular. La senescencia se desencadena con el envejecimiento, tras acumularse daño en el DNA, por el acortamiento de los telómeros o estrés oxidativo en las células y también como un mecanismo de defensa que previene la progresión tumoral (Rodier y Campisi, 2011).

Durante el proceso de senescencia la β-galactosidasa está activa a pH 6, pero no en células pre-senescentes, quiescentes o inmortalizadas. Por tanto, la actividad de este enzima se estudió para analizar el proceso de senescencia 48 y 72 horas tras la transfección celular.

Para ello, se utilizó el *senescence β-galactosidase staining kit* (Cell Signaling). Las células se depositaron en un portaobjetos realizando un citospín. Se fijaron con 50 µl de 1X *Fixative solution* durante 15 min a temperatura ambiente. Se lavaron dos veces con

PBS y posteriormente se incubaron a 37°C durante toda la noche con *β-Galactosidase Staining Solution* (Tabla 13).

Tabla 13. Composición de la solución de marcaje de la β -galactosidasa

Reactivo	Volumen (μ L)
1X <i>Staining solution</i>	930
<i>Staining Supplement A</i>	10
<i>Staining Supplement B</i>	10
20 mg/mL X-gal en DMF*	50

* DMF= N-N-dimetilformamida

Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio invertido EVOS XL Core Imaging System (Life Technologies) y analizadas con el programa ImageJ.

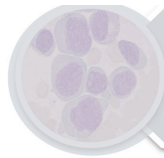
10. Tratamiento estadístico

Se aplicó el test del χ^2 con la corrección de Yates (en caso de ser necesaria) para analizar las diferencias de distribución entre variables categóricas. Las variables continuas se analizaron con el test de Kolmogorov-Smirnov para conocer si presentaban distribuciones paramétricas o normales. El estudio de asociación entre variables cuantitativas que no presentaron distribuciones normales se realizó mediante correlación de Spearman y entre cuantitativas y categóricas mediante el test U de Mann-Whitney o Kruskal-Wallis. Las que presentaron distribuciones normales se analizaron con el test T de Student o ANOVA.

La supervivencia global (SG), supervivencia libre de enfermedad (SLE) y supervivencia libre de recaída (SLR) se calcularon mediante el método de Kaplan-Meier y las diferencias entre la

distribución de supervivencia se evaluaron con el test log-rank. El tiempo utilizado para la SG fue el comprendido entre la fecha del diagnóstico y la fecha de la muerte. Para la SLE fue el tiempo comprendido entre el alcance de la RC y la recaída o la muerte (teniendo en cuenta el evento que ocurrió primero) o sólo la recaída en el caso de la SLR. El análisis multivariante se realizó mediante la regresión de Cox y se incluyeron aquellas variables que mostraron algún indicio de tener una significación asociada en el análisis univariante ($p \leq 0,05$) y, en caso de estar disponibles, aquellas para las que estudios anteriores habían mostrado una posible relación.

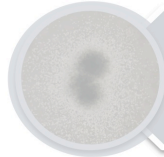
La significación estadísticas se consideró cuando $p \leq 0,05$. Los cálculos fueron realizados con los paquetes estadísticos SPSS v22,0 y con el GraphPad-Prism (GraphPad Software).



Introducción



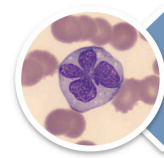
Hipótesis



Objetivos



Material y Métodos



Resultados



Discusión



Conclusiones



Bibliografía

1. Expresión de *MYBL2* en células CD34+ y en LMAs

El análisis cuantitativo mostró que la mediana de expresión de *MYBL2* fue significativamente superior en la LMA (n=259) que en las células CD34+ aisladas donantes sanos (n=11): 0,21 (0,01-5,56) vs. 0,14 (0,03-0,19), respectivamente ($p<0,001$). Al relativizar la expresión de las LMAs respecto de las CD34+, la expresión de *MYBL2* fue 1,99 veces mayor en las LMAs (Figura 9).

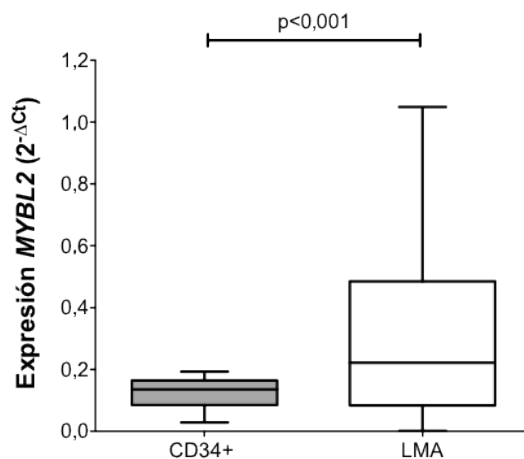


Figura 9. Expresión de *MYBL2* en células CD34+ y en LMA. La mediana expresión de *MYBL2* fue mayor en las LMAs que en las CD34+ de donantes sanos.

2. Perfil de miRNAs en células CD34+ y en LMAs

Los *arrays* de expresión de miRNAs se realizaron en 5 muestras de células CD34+ separadas a partir de sangre de cordón de donantes sanos (sólo se consideraron muestras con una pureza de CD34+ mayor al 80%) y en 7 muestras de LMA *de novo* de cariotipo normal sin mutaciones en los genes *FLT3*, *NPM1* o *CEBPA*.

El análisis de componentes principales de los *arrays* mostró una clara diferencia entre el perfil de expresión de miRNAs en células CD34+ y en LMAs. También mostró que, en general, la expresión de miRNAs es mucho más homogénea en las células CD34+ que en las LMAs (Figura 10).

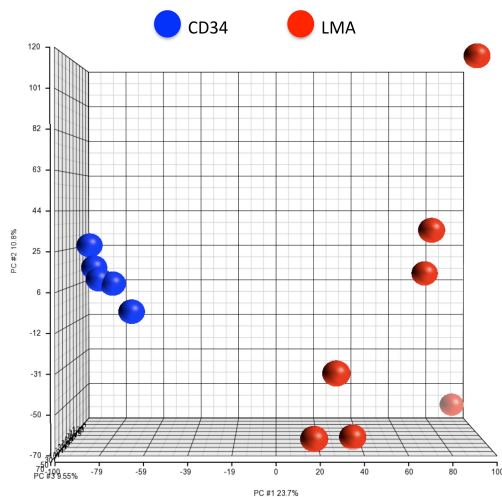


Figura 10. Análisis de componentes principales de los *arrays* de expresión de miRNAs. La figura distribuye cada muestra en un espacio tridimensional en función de la expresión de los miRNAs del *array*. Las muestras con perfiles de miRNAs similares se ubican cerca las unas de las otras. Las muestras correspondientes a las células CD34+ están coloreadas en azul, y las correspondientes a las LMAs en color rojo.

Para determinar los miRNAs más diferencialmente expresados en la LMA se llevó a cabo un análisis *cluster* con un *fold-change* (FC, veces de cambio) de 10 y un p-valor <0,001 (Figura 11A). De esta manera, el *array* identificó una firma de 6 miRNA maduros hiperexpresados y 60 miRNAs maduros infraexpresados en la LMA respecto de las células CD34+ (Tabla 14).

Tabla 14: Resultado del análisis *cluster* que identificó los miRNAs maduros diferencialmente expresados en las LMAs respecto de las células CD34+, con un *fold-change* de 10 y un p-valor <0,001

miRNA	p-valor	FC	Expresión respecto a CD34+
hsa-miR-4668-5p_st	2,56E-06	16,8127	Alto en LMA
hsa-miR-4507_st	7,34E-05	12,645	Alto en LMA
hsa-miR-1281_st	2,90E-05	12,0507	Alto en LMA
hsa-miR-494_st	1,47E-05	11,075	Alto en LMA
hsa-miR-4463_st	4,03E-06	10,3968	Alto en LMA
hsa-miR-3613-3p_st	9,17E-06	10,2576	Alto en LMA
hsa-miR-378d_st	3,63E-08	-10,3257	Bajo en LMA
hsa-miR-378i_st	1,23E-04	-10,5999	Bajo en LMA
hsa-miR-194_st	1,95E-08	-10,8073	Bajo en LMA
hsa-miR-339-3p_st	2,31E-05	-10,9963	Bajo en LMA
hsa-miR-432_st	7,89E-09	-11,2173	Bajo en LMA
hsa-miR-339-5p_st	9,91E-05	-11,2479	Bajo en LMA
hsa-miR-185_st	5,32E-04	-11,2989	Bajo en LMA
hsa-miR-151b_st	1,39E-09	-11,5148	Bajo en LMA
hsa-miR-128_st	3,66E-08	-11,5475	Bajo en LMA
hsa-miR-378f_st	1,52E-04	-12,5762	Bajo en LMA
hsa-miR-532-5p_st	3,21E-08	-12,7058	Bajo en LMA
hsa-miR-422a_st	8,40E-09	-13,0492	Bajo en LMA
hsa-miR-100_st	1,29E-08	-13,1634	Bajo en LMA
hsa-miR-629_st	6,00E-09	-13,1901	Bajo en LMA
hsa-miR-28-3p_st	4,34E-07	-13,3555	Bajo en LMA
hsa-miR-19a_st	3,46E-06	-13,5834	Bajo en LMA
hsa-miR-22_st	5,48E-05	-13,9638	Bajo en LMA
hsa-miR-487b_st	3,71E-10	-13,9993	Bajo en LMA
hsa-miR-1271_st	3,50E-10	-14,1047	Bajo en LMA
hsa-miR-199b-3p_st	2,45E-09	-14,347	Bajo en LMA

Tabla 14 (continuación)

miRNA	p-valor	FC	Expresión respecto a CD34+
hsa-miR-874_st	1,86E-06	-15,4106	Bajo en LMA
hsa-miR-181c-star_st	1,11E-09	-15,4345	Bajo en LMA
hsa-miR-151-3p_st	2,79E-11	-16,1933	Bajo en LMA
hsa-miR-28-5p_st	1,31E-09	-17,5364	Bajo en LMA
hsa-miR-181a-2-star_st	3,42E-10	-18,2086	Bajo en LMA
hsa-miR-199a-3p_st	1,92E-09	-18,6297	Bajo en LMA
hsa-miR-625_st	1,20E-06	-18,7145	Bajo en LMA
hsa-miR-378c_st	6,07E-04	-19,3224	Bajo en LMA
hsa-miR-17_st	1,69E-04	-19,3868	Bajo en LMA
hsa-miR-93-star_st	2,02E-08	-20,5604	Bajo en LMA
hsa-miR-30e_st	1,25E-08	-21,8014	Bajo en LMA
hsa-miR-18b_st	7,72E-09	-22,53	Bajo en LMA
hsa-miR-181a-star_st	2,26E-09	-22,7656	Bajo en LMA
hsa-miR-551b_st	7,33E-11	-23,2702	Bajo en LMA
hsa-miR-196b_st	1,99E-11	-24,5999	Bajo en LMA
hsa-miR-10a_st	4,31E-09	-26,025	Bajo en LMA
hsa-miR-30b_st	5,40E-07	-26,8208	Bajo en LMA
hsa-miR-342-3p_st	1,39E-04	-27,673	Bajo en LMA
hsa-miR-99b_st	5,56E-04	-29,944	Bajo en LMA
hsa-miR-29a_st	7,36E-08	-30,8633	Bajo en LMA
hsa-miR-181d_st	1,34E-04	-31,4504	Bajo en LMA
hsa-miR-17-star_st	2,51E-07	-33,6947	Bajo en LMA
hsa-miR-27b_st	8,61E-10	-35,0056	Bajo en LMA
hsa-miR-127-3p_st	1,77E-10	-35,7395	Bajo en LMA
hsa-miR-106b_st	3,57E-04	-41,7123	Bajo en LMA
hsa-miR-25_st	8,86E-06	-45,3124	Bajo en LMA
hsa-miR-15a_st	2,29E-05	-47,1907	Bajo en LMA
hsa-miR-27a_st	1,93E-04	-49,2553	Bajo en LMA
hsa-miR-130b_st	5,06E-07	-53,0393	Bajo en LMA

Tabla 14 (continuación)

miRNA	p-valor	FC	Expresión respecto a CD34+
hsa-miR-146a_st	2,15E-04	-54,1258	Bajo en LMA
hsa-miR-30c_st	3,08E-07	-54,818	Bajo en LMA
hsa-miR-19b_st	1,25E-04	-57,5749	Bajo en LMA
hsa-miR-363_st	8,41E-13	-59,9374	Bajo en LMA
hsa-miR-125b_st	1,49E-05	-63,0276	Bajo en LMA
hsa-miR-18a_st	1,58E-07	-66,2861	Bajo en LMA
hsa-miR-151-5p_st	8,76E-06	-68,0113	Bajo en LMA
hsa-miR-130a_st	1,88E-05	-77,2201	Bajo en LMA
hsa-miR-99a_st	6,87E-12	-87,8477	Bajo en LMA
hsa-miR-146b-5p_st	3,99E-07	-92,4426	Bajo en LMA
hsa-miR-126_st	5,04E-05	-93,3224	Bajo en LMA

Para determinar los miRNAs desregulados en la LMA que a su vez pudiesen regular la expresión de *MYBL2*, se realizó un segundo análisis *cluster* con condiciones estadísticas menos restrictivas, con un *FC* de 2 y p-valor <0,005. Este segundo listado incluyó un mayor número de miRNAs, (Tabla Anexa I y Figura 11 B) en el que los posibles miRNAs reguladores de *MYBL2* fueron los de las familias miR-29 y miR-30, por ser complementarios a su región 3'UTR.

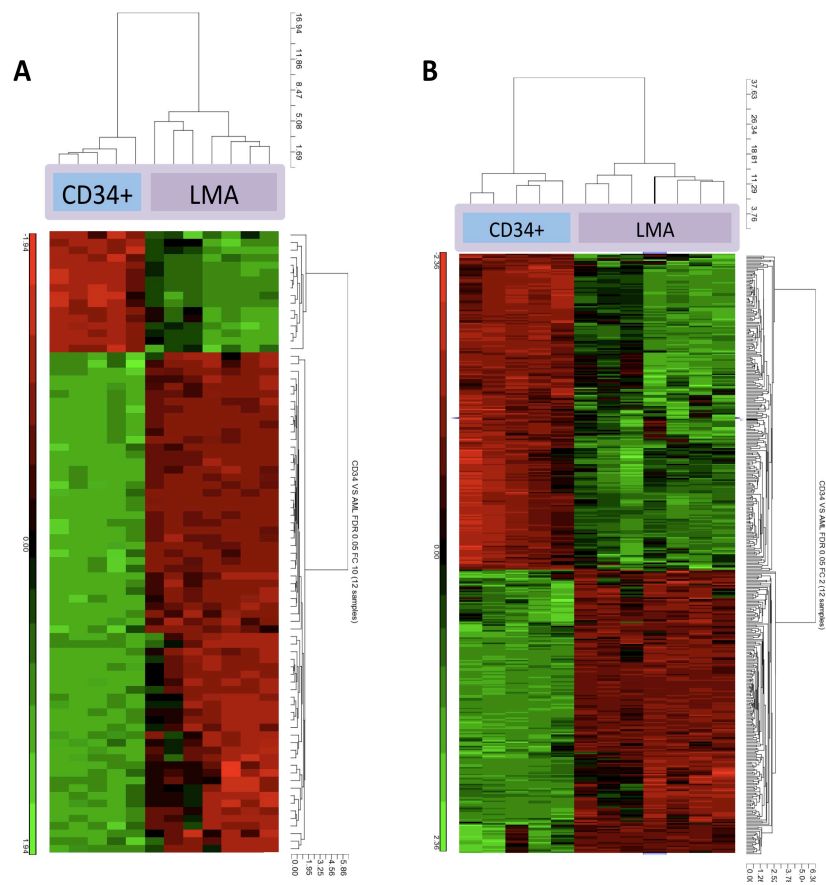


Figura 11. Análisis cluster obtenido a partir de los datos de expresión de los *arrays* de miRNAs. El análisis *cluster* permitió obtener la lista de miRNAs con mayores diferencias de expresión entre células CD34+ y LMAs A) con una diferencia de 10 veces de cambio ($p < 0,001$). B) con una diferencia de 2 veces de cambio ($p < 0,05$).

3. Validación de los resultados de los *arrays*

3.1 Selección de miRNAs para su validación

Para la validación de los *arrays* por qRT-PCR se escogieron los miRNAs más significativamente alterados (p -valor $<0,0001$) y con mayores *FCs*. Siguiendo este criterio, se seleccionaron los 3 miRNAs más hiperexpresados (miR-4668, miR-4507 y miR-494) y los 3 miRNAs más infraexpresados (miR-126, miR-146b, miR-99a). Se excluyó del análisis el miR-1281 por carecer de información sobre posibles dianas y rutas celulares en la bases de datos de miRNAs.

Adicionalmente se incluyeron los miR-29a, miR-30a, miR-30b, miR-30c y miR-30d como posibles reguladores de *MYBL2*.

3.2 Validación de los resultados de los *arrays* por qRT-PCR

La validación de los resultados de los *arrays* por qRT-PCR se llevó a cabo en 5 muestras de células CD34+ de donantes sanos y en 52 muestras de LMA *de novo* de cariotipo normal. El miR-4668 mostró una expresión muy baja (en los límites de detección de la PCR cuantitativa) tanto en células CD34+ como LMAs, por lo que fue excluido. La mediana de expresión de los miR-126, miR-99a, miR-29a y miR-30a/b/c/e fue significativamente inferior en las LMAs que en las CD34+ ($p=0,001$, $p=0,001$, $p=0,001$, $p=0,026$, $p=0,032$, $p=0,005$, y $p=0,009$, respectivamente) confirmando los resultados de los *arrays*. La expresión de los miR-4507, miR-494 y miR-146b presentó una tendencia en el mismo sentido que en el observado en los *arrays* ($p=0,055$, $0,059$, $0,059$, respectivamente) (Tabla 15).

Tabla 15. Expresión de los miRNAs escogidos para la validación de los *arrays* de expresión en células CD34+ y en 52 muestras de LMA. Los datos están expresados en unidades de $2^{-\Delta Ct}$ multiplicadas por 1000

miRNA	Expresión en CD34+ Mediana (rango)	Expresión en LMA Mediana (rango)	FC*	p-valor
miR-4507	0,36 (0,22-0,73)	0,75 (0,01-2,86)	2,08	0,055
miR-494	1,89 (1,78-2,99)	4,50 (0,12-30,19)	2,38	0,059
miR-126	23,13 (6,94-83,12)	2,27 (0,11-152,00)	-10,18	0,001
miR-146b	9,46 (3,28-65,30)	2,88 (0,13- 32,86)	-3,28	0,059
miR-99a	0,11 (0,09-1,30)	0,03 (0,0001-0,18)	-3,67	0,001
miR-29a	17,26 (12,56-25,63)	6,25 (0,13-72,86)	-2,78	0,001
miR-30a	21,82 (7,35-26,48)	6,24 (0,53-92,05)	-3,49	0,026
miR-30b	8,42 (5,38-23,64)	2,91 (0,11-388,43)	-2,89	0,032
miR-30c	49,81 (25,88-75,54)	10,78 (0,78-320,81)	-4,62	0,005
miR-30e	1,50 (1,33-7,79)	0,51 (0,03-7,79)	-2,9	0,009

*LMA vs. CD34+ obtenido por qRT-PCR

Finalmente se compararon los datos de *FC* obtenidos en los *arrays* y por qRT-PCR. La correlación de Spearman entre los dos métodos fue significativa ($p=0,015$) con una $r=0,758$ (Figura 12).

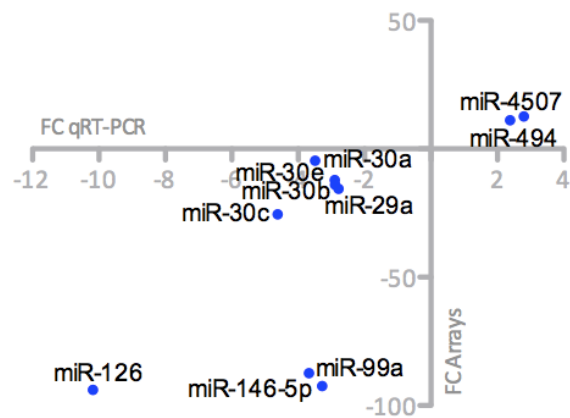


Figura 12. Correlación entre el *FC* obtenido en los *arrays* y en la validación por qRT-PCR. El *FC* se refiere a las veces de cambio en las LMAs respecto de las células CD34+.

4. Expresión de los miR-29a y 30a/b/c/e en células CD34+ y en LMAs

La expresión de los miR-29a y miR-30a/b/c/e analizada por qRT-PCR en la serie de validación confirmó los resultados de los *arrays*. Dado que los estudios bioinformáticos predijeron que estos miRNA se podían unir a la secuencia 5'UTR de *MYBL2* se amplió la serie de LMAs y se incluyeron muestras de todos los grupos de riesgo citogenético.

El análisis en 200 pacientes con LMA confirmó que la mediana de expresión de los miR-29a y miR-30a/b/c/e era significativamente inferior en pacientes con LMA que en células CD34+ de donantes sanos (Figura 13).

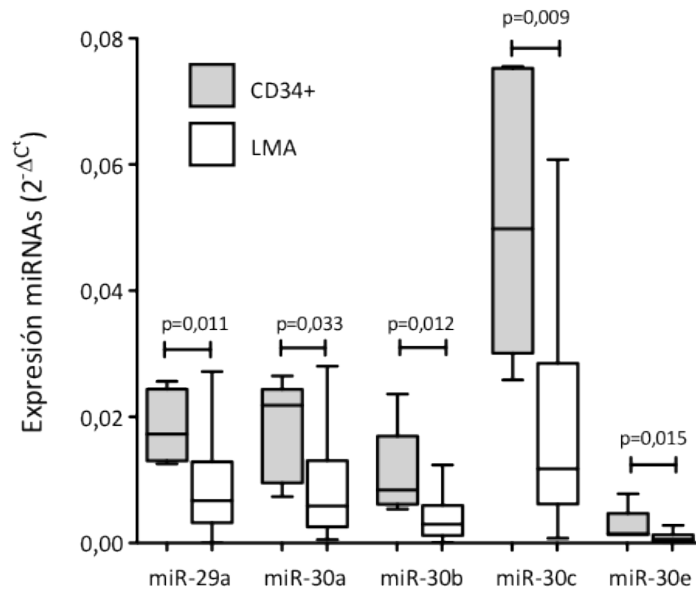


Figura 13. Expresión de los miR-29a y miR-30 en células CD34+ y en LMA. Todos los miRNAs mostraron una mediana de expresión significativamente menor en las LMAs que en las células CD34+.

Los valores de expresión de los miRNAs en CD34+ y LMA se detallan en la Tabla 16.

Tabla 16. Expresión de los miR-29a y miR-30 en células CD34+ y LMA. Los datos están expresados en unidades de $2^{-\Delta Ct}$ multiplicados por 1000

miRNA	Expresión en CD34+	Expresión en LMA	p-valor
	Mediana (rango)	Mediana (rango)	
miR-29a	17,26 (12,56-25,63)	6,88 (0,13-151,85)	0,011
miR-30a	21,82 (7,35-26,48)	6,20 (0,53-343,98)	0,033
miR-30b	8,42 (5,38-23,64)	3,01 (0,06-388,43)	0,012
miR-30c	49,81 (25,88-75,54)	11,77 (0,78-656,18)	0,009
miR-30e	1,50 (1,33-7,79)	0,56 (0,03-8,30)	0,015

5. Asociación entre la expresión de *MYBL2* y miRNAs

5.1 Asociación en la LMA

Se estudió si la expresión de los miR-29a y miR-30a/b/c/e, además de estar desregulada en la LMA, se asociaba a la de *MYBL2*. El análisis de correlación no paramétrica de Spearman mostró que la expresión de los miR-30a/b/c se asociaba de manera inversa con la expresión de *MYBL2* ($p=0,001$; $p=0,004$; $p<0,001$, respectivamente). Para el resto de miRNAs no se encontró asociación.

También se analizó la expresión de *MYBL2* en función de la expresión categorizada de los miRNAs. Se encontró que los pacientes que infraexpresaban los miR-30a/b/c presentaban una expresión significativamente mayor de *MYBL2* ($p=0,025$, $p=0,030$ y $p=0,022$, respectivamente) y *viceversa* (Figura 14).

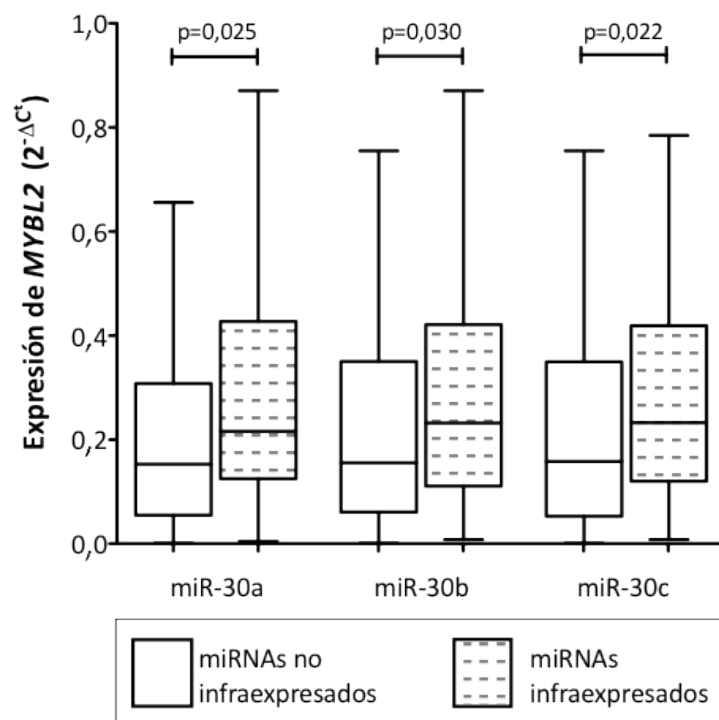


Figura 14. Expresión de *MYBL2* según la expresión de los miR-30a/b/c (alta o baja). La mediana de expresión de *MYBL2* fue significativamente mayor en los pacientes con bajos niveles de los miR-30a/b/c.

Quando se consideró el % de blastos en MO de los pacientes se observó que a mayor % de blastos, la expresión de *MYBL2* presentaba una tendencia a aumentar y la de los miR-30a/b/c a disminuir (Figura 15).

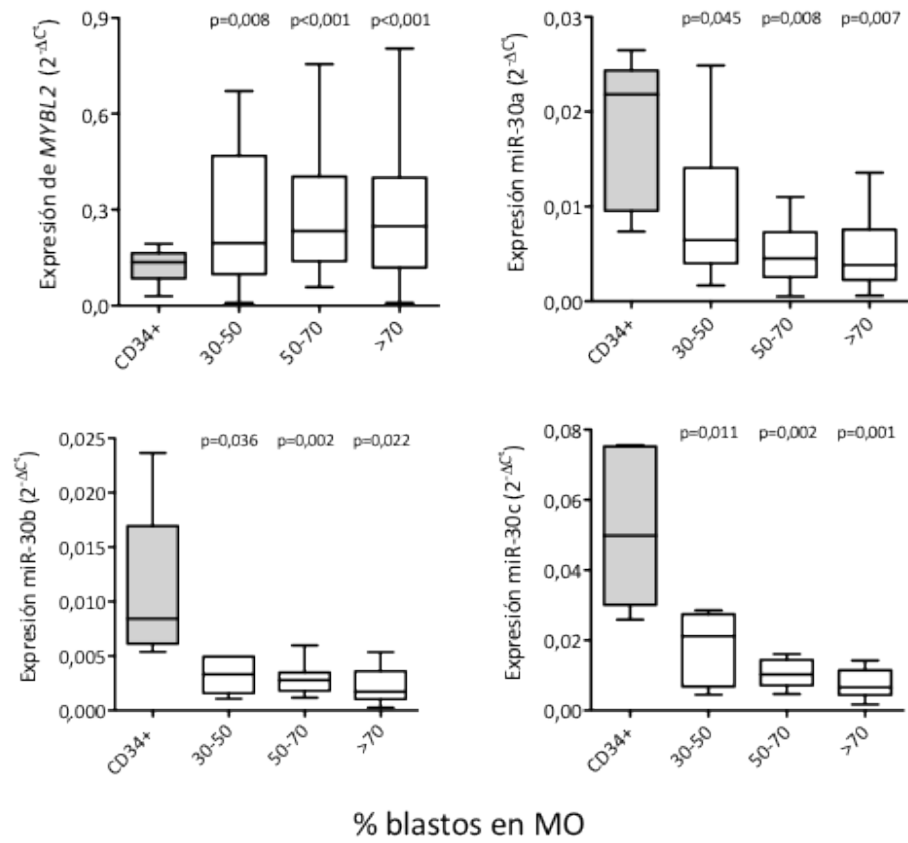


Figura 15. Expresión de MYBL2 y miR-30a/b/c en CD34+ y LMA según el % de blastos en MO. El p-valor sobre cada caja se refiere a la comparación de la expresión de ese % de blastos con la expresión en células CD34+. Se vio una tendencia a que la mediana de expresión de MYBL2 aumentaba con el % de blastos y la de los miRNAs disminuía.

5.2 Asociación en un modelo celular mieloide

Para profundizar en la naturaleza de la asociación entre la expresión de *MYBL2* y los miR-30a/b/c, se estudió su expresión en la línea celular mieloide KG1.

Se inició un cultivo celular y se mantuvo sin cambiar el medio hasta la saturación y muerte de las células. En la fase de crecimiento exponencial, cuando la tasa de proliferación era máxima, los niveles de *MYBL2* se elevaron notablemente, y los de los miRNAs disminuyeron. En las fases del cultivo en las que la proliferación fue mínima (fase de latencia y fase de saturación del cultivo) la expresión de *MYBL2* fue baja y, por el contrario, los niveles de los miR-30a/b/c aumentaron. También se estudió los niveles de proteína de *MYBL2* y de su forma fosforilada (activa). Los resultados mostraron que además de aumentar los niveles de mRNA de *MYBL2* durante la fase exponencial, aumentó también su forma activada (Figura 16).

Finalmente se midió la expresión de *MYBL2* y de los miR-30a/b/c en las distintas fases del ciclo celular. Los niveles de *MYBL2* (mRNA y proteína) alcanzaron un máximo en la fase S del ciclo. El patrón de expresión que mostraron los miR-30a/b/c en las fases G1 y G2/M fue contrario al de *MYBL2* en estas fases (Figura 17).

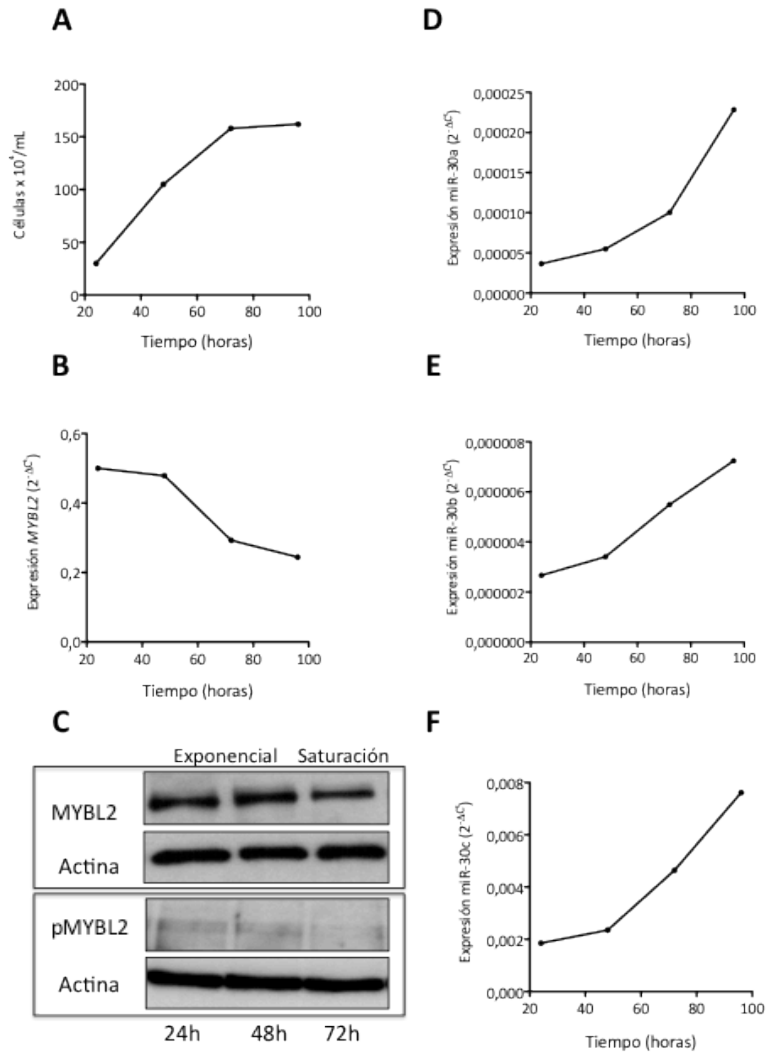


Figura 16. Estudio de la expresión de MYBL2 y los miR-30a/b/c en cultivo celular KG1 sin cambio de medio para alcanzar la saturación y muerte con el tiempo. A) muestra el recuento celular del cultivo. B) Expresión de MYBL2, medida a los distintos tiempos por qRT-PCR. C) Western blot que muestra los niveles de proteína MYBL2 total y proteína activada (fosforilada, pMYBL2) en los distintos tiempos del cultivo celular. D, E, F) Expresión de los miR-30a/b/c.

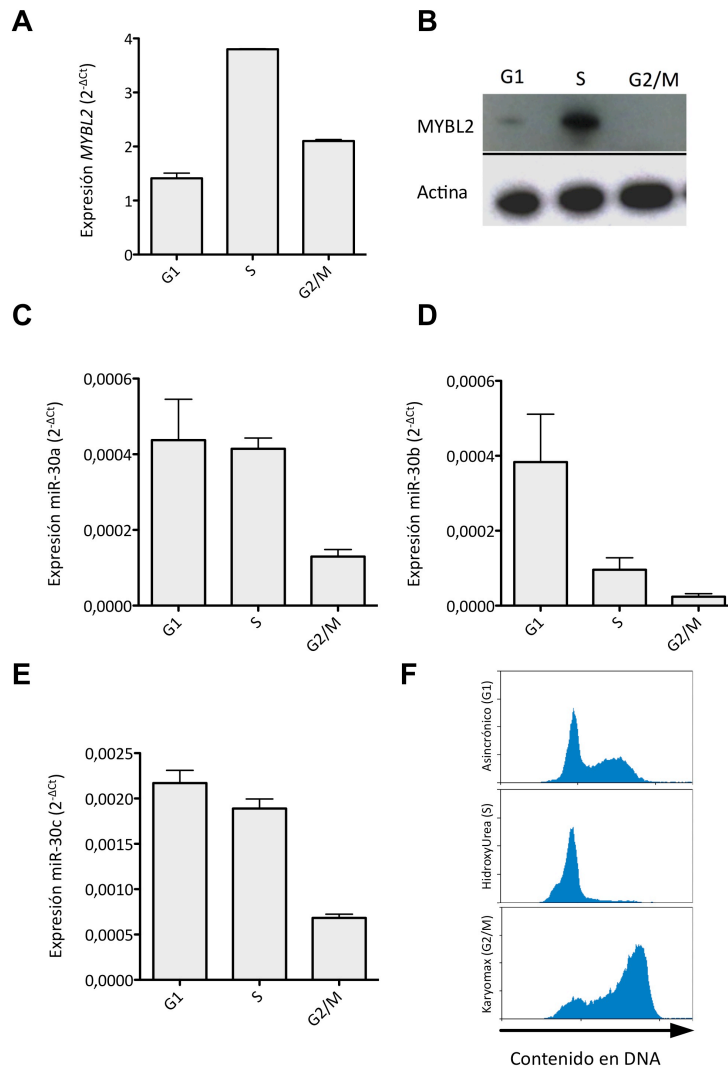


Figura 17. Expresión de MYBL2 y el miR-30a en las fases del ciclo celular. A) expresión de MYBL2 en G1, S y G2/M. Los niveles de mRNA fueron máximos en la fase S del ciclo celular. B) Niveles de proteína de MYBL2 y control de carga de proteína (actina). Los niveles más altos de proteína también se dieron en la fase S, mientras que en la G2/M fueron indetectables. C, D, E) Expresión de los miR-30a/b/c en las diferentes fases del ciclo. En la fase G2/M la expresión se redujo notablemente. F) Contenido en DNA medido por citometría de flujo. El panel superior muestra las células en crecimiento asincrónico (mayoritariamente en fase G1), el panel del medio muestra las células bloqueadas en fase S y el panel inferior muestra células bloqueadas en fase G2/M.

6. Regulación de *MYBL2* por los miR-30a/c

En base a los resultados obtenidos en la serie de pacientes de LMA y en los patrones de expresión del cultivo de KG1, se decidió estudiar la naturaleza de la asociación encontrada entre los miR-30a/c y *MYBL2*. Se escogieron estos dos miRNAs por presentar mayor asociación entre su expresión y la de *MYBL2* y por proceder del mismo transcrito intrónico en el cromosoma 6.

Para determinar si el patrón inverso de expresión entre los miRNAs-30a/c y *MYBL2* se debía a una relación causa-efecto, se realizaron nucleofecciones por triplicado con mimics de éstos miRNAs o con el control negativo *control #1* en la línea celular KG1. Se recogieron las células tras 24, 48 o 72 horas y se evaluaron los niveles de mRNA y proteína de *MYBL2*. Los resultados de qRT-PCR mostraron que los mimics de los miR-30a/c no alteran los niveles de mRNA de *MYBL2*. Sin embargo, se observó que las células transfectadas con el mimic-30a presentaban una reducción en los niveles de proteína de *MYBL2* respecto de las transfectadas con el control negativo, lo cual sugirió que éste miRNA podría estar bloqueando su traducción (Figura 18).

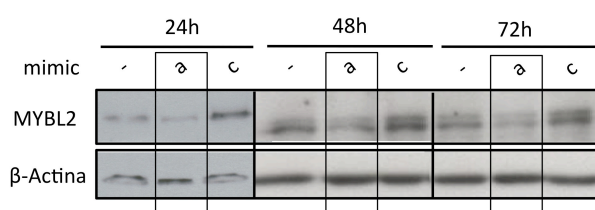


Figura 18. Western blot para la identificación de *MYBL2*. El western blot se realizó 24, 48 y 72 horas tras la nucleofección de la línea celular KG1 con mimics del miR-30a (a), miR-30c (c) o el control negativo #1 (-) en triplicado.

Para corroborar los resultados obtenidos con los mimics se repitió el mismo experimento pero utilizando plásmidos pCMV-miR-30a y pCMV-MIR (vector vacío). En este caso se obtuvieron los mismos resultados que con los mimics; no había modificación en la expresión (mRNA) de *MYBL2* pero sí de los niveles de proteína.

6.1. Mecanismo de regulación de la expresión de *MYBL2* por el miR-30a: unión a la región 3'UTR

Tras ver la posible influencia del miR-30a en la traducción de *MYBL2* se decidió investigar si esta modulación se producía por la unión directa del miRNA a la región 3'UTR del gen. Esta interacción se evaluó con ensayos de luciferasa. A las 24 horas post-transfección se midió la actividad relativa de luciferasa de *Firefly* respecto de la de *Renilla*. La actividad relativa de estos enzimas fue significativamente mayor en las células transfectadas con el plásmido control que en las transfectadas con el plásmido de expresión del miR-30a ($p=0,034$), sugiriendo que el miR-30a se unió a la región 3'UTR de *MYBL2* (Figura 19).

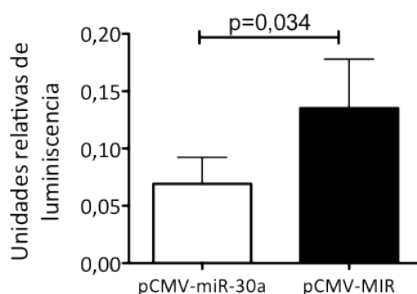


Figura 19. Actividad relativa de luciferasa. La actividad de luciferasa fue significativamente menor en las células transfectadas con el plásmido de expresión del miR-30a (barra blanca) que en las transfectadas con el plásmido control (barra negra).

7. Papel funcional del miR-30a en la LMA

Una vez visto el efecto del miR-30a sobre la regulación de *MYBL2* y debido a que este gen regula diferentes rutas que a su vez están implicadas en la modulación de la supervivencia celular, se evaluó el efecto del miR-30a en la viabilidad celular, así como en los mecanismos que pueden regularla: ciclo celular y proliferación, apoptosis y senescencia celular.

7.1 Proliferación celular

Después de transfectar la línea celular KG1 con el mimic-30a o el control se midió la proliferación celular mediante dos métodos; por una parte se contaron las células 24 y 48 horas tras la nucleofección y por otra parte se llevó a cabo un ensayo colorimétrico MTS 48 horas después de la transfección. Los resultados mostraron que el aumento del miR-30a reducía el número de células en cultivo, tanto por el método de conteo celular ($p=0,036$; Figura 20A) como por el método colorimétrico ($p=0,047$; Figura 20B).

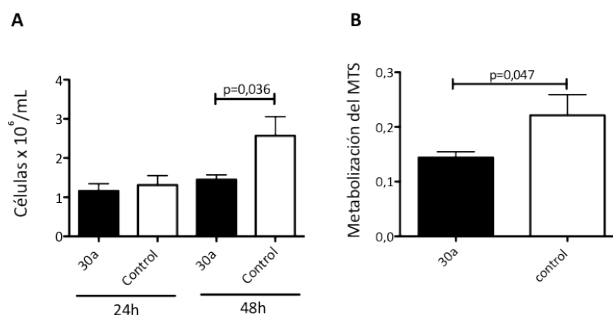


Figura 20. Viabilidad celular. A) conteo celular 24 y 48 horas tras la transfección con el mimic-30a o con el control con el método de exclusión azul *trypan*. B) Metabolización del MTS, en unidades de absorbancia, 48 horas tras la transfección.

7.2 Ciclo celular

Los ensayos de incorporación de BrdU mostraron que la transfección con el mimic-30a no producía diferencias en la progresión del ciclo celular (Figura 21).

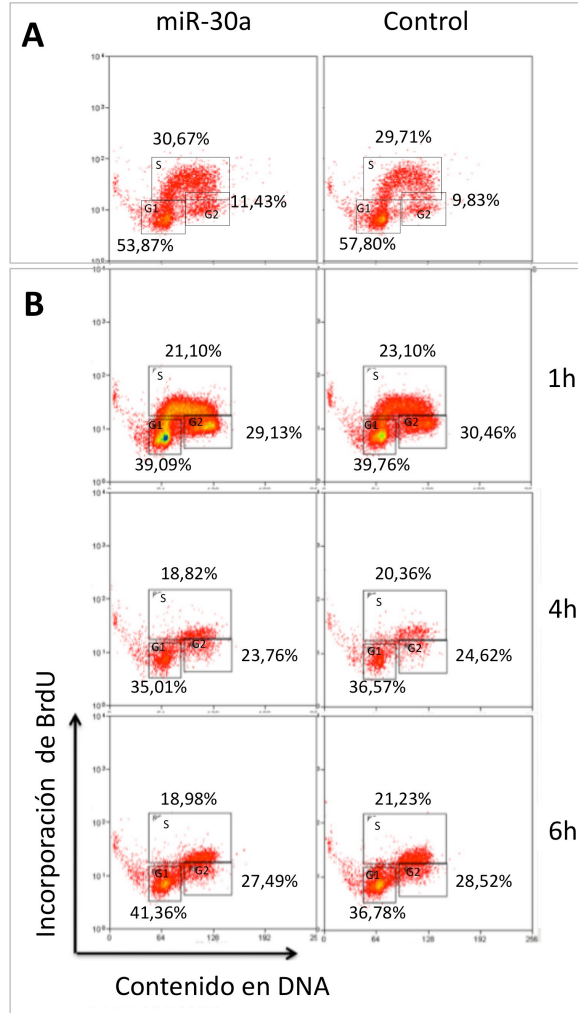


Figura 21. Ensayos de incorporación de BrdU. Con este método se observó que no había diferencias en el ciclo celular tras transfectar las células con el mimic-30a o con el control. A) Pulso único (3 horas de incubación). B) Pulso y caza en, el que la incorporación de un pulso de BrdU (1 hora) se analizó 1, 4 y 6 horas tras la incubación.

7.3 Apoptosis

El estudio de apoptosis se realizó mediante el análisis de la Anexina V (Figura 22A) y mediante TUNEL (Figura 22B). No se encontraron diferencias significativas en cuanto al número de células apoptóticas en aquellas células transfectadas con el mimic-30a respecto de las transfectadas con el mimic control con ninguno de los dos métodos (Figura 22).

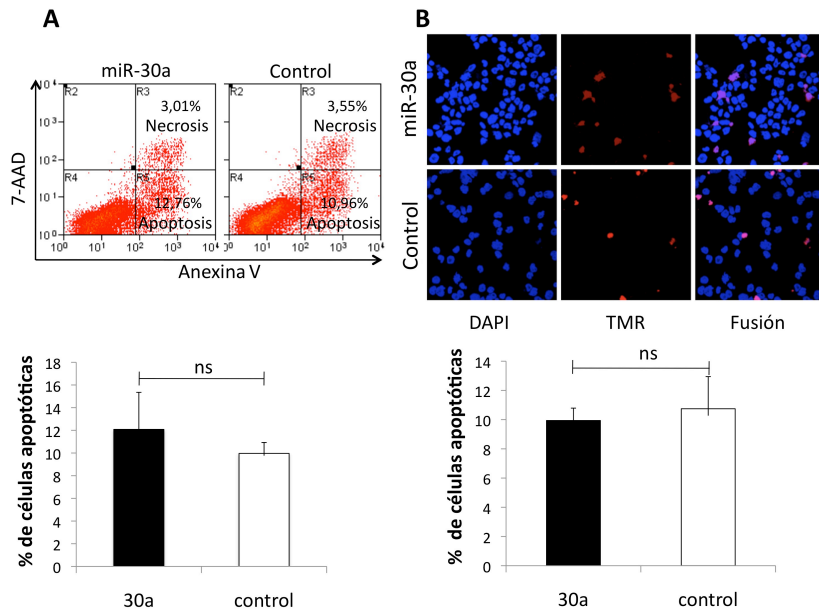


Figura 22. Estudio de la apoptosis. A) Anexina V. El ensayo se realizó 24, 48 y 72 horas tras la nucleofección. El panel superior es un gráfico representativo de los resultados obtenidos tras el análisis por citometría de flujo. El gráfico inferior muestra la media del % de células apoptóticas obtenidas en los triplicados. No se encontraron diferencias significativas. B) TUNEL. El ensayo se realizó 48 horas tras la nucleofección. El panel superior es una imagen representativa obtenida por microscopía confocal. El gráfico inferior muestra que no se encontraron diferencias significativas en el % de células apoptóticas de los triplicados.

7.4 Senescencia

El estudio de senescencia se llevó a cabo con el análisis de la actividad de la β -galactosidasa. Estos estudios mostraron que la transfección con el mimic-30a induce un aumento en el número de células senescentes comparadas con las células transfectadas con el mimic control ($p=0,036$) (Figura 23).

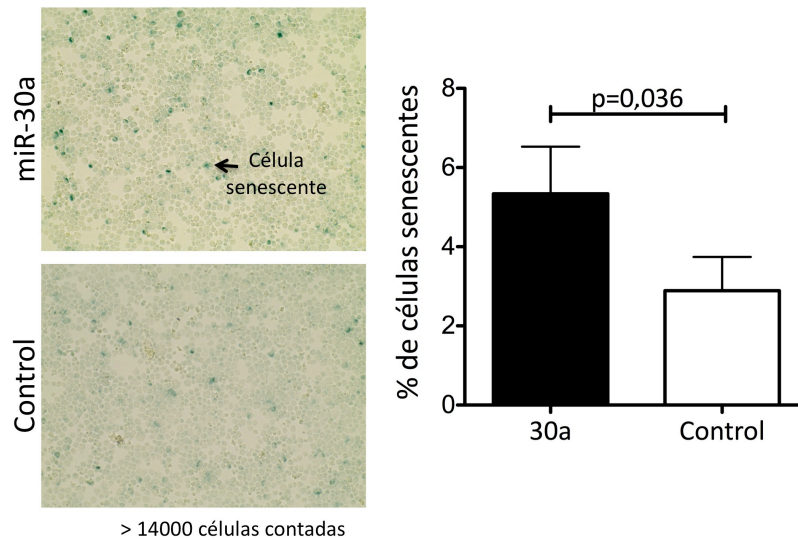


Figura 23. Ensayo de β -galactosidasa. El panel de la izquierda muestra imágenes representativas de las células 72 horas tras la transfección con el mimic del miR-30a (superior) o con el mimic control (inferior). El panel de la derecha muestra el % de células senescentes obtenidas tras la transfección con cada mimic

8. Asociación de la expresión de *MYBL2* y miR-30a con las características clínico-biológicas de los pacientes de LMA

La mediana de expresión de *MYBL2* en los 259 pacientes de LMA no mostró diferencias estadísticamente significativas en función de la edad, sexo o el nivel de leucocitos, pero sí aumentó significativamente en función del riesgo citogenético (Figura 24; Tabla 17).

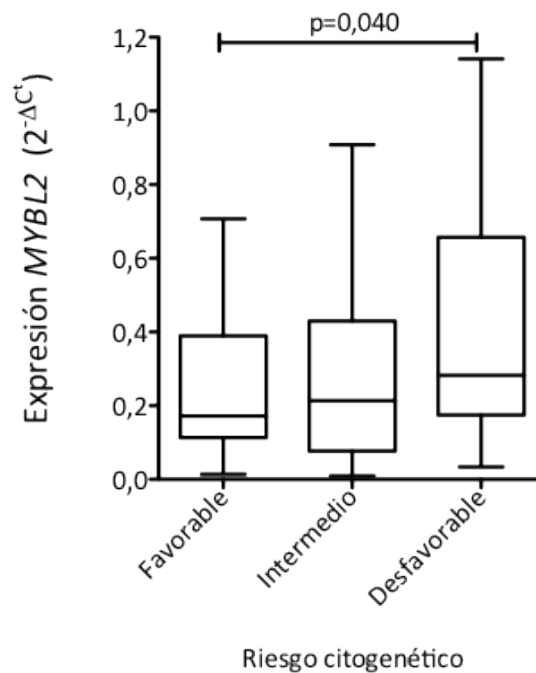


Figura 24. Expresión de *MYBL2* en función del riesgo citogenético. La expresión de *MYBL2* aumentó con el riesgo citogenético; los pacientes de riesgo citogenético desfavorable mostraron una mayor expresión de este gen.

En pacientes de riesgo citogenético intermedio, la expresión de *MYBL2* no se asoció a la presencia de *FLT3-ITD* o mutaciones en *NPM1* (Tabla 17).

Para el miR-30a no se encontraron diferencias significativas en los 200 pacientes analizados en cuanto a la edad, el sexo o el número de leucocitos. En el grupo de riesgo citogenético intermedio (n=105) el miR-30a mostró una menor expresión en los pacientes con mutaciones en *NPM1* (p=0,009; Tabla 18).

Tabla 17. Expresión de *MYBL2* ($2^{-\Delta Ct}$) en función de las características clínico-biológicas de los pacientes

Característica	Expresión de <i>MYBL2</i>		p-valor
	Mediana (rango)	Nº (%)	
Edad (años)			0,51
≤ 60	0,22 (0,01-3,40)	124 (47,88%)	
> 60	0,22 (0,01-5,56)	135 (52,12%)	
Género			0,44
Hombre	0,22 (0,01-3,34)	151 (58,30)	
Mujer	0,22 (0,01-5,56)	108 (41,67)	
Leucocitos × 10⁹/L			0,23
≤ 50	0,23 (0,01-5,56)	183 (70,66)	
> 50	0,17 (0,01-1,83)	60 (23,17)	
No disponible		16 (6,18)	
Riesgo citogenético			0,04
Favorable	0,19 (0,02-1,03)	19 (7,34)	
Intermedio	0,21 (0,01-3,84)	141 (54,44)	
Desfavorable	0,28 (0,03-5,56)	39 (15,06)	
No valorable		60 (23,17)	
Grupo FAB			0,09
M0	0,26 (0,01-3,84)	19 (7,34)	
M1	0,21 (0,01-2,29)	64 (24,71)	
M2	0,23 (0,01-3,40)	60 (23,17)	
M4	0,23 (0,01-1,17)	48 (18,53)	
M5	0,16 (0,00-5,56)	32 (12,36)	
M6	0,48 (0,23-2,04)	10 (3,86)	
No disponible		26 (10,04)	
Marcadores moleculares*			
<i>FLT3-ITD</i>			0,57
Positivo	0,22 (0,03-1,83)	38 (26,95)	
Negativo	0,21 (0,01-3,84)	97 (68,79)	
No valorable		6 (4,26)	
<i>NPM1</i>			0,67
Positivo	0,21 (0,01-1,83)	51 (36,17)	
Negativo	0,21 (0,01-3,84)	79 (56,03)	
No valorable		11 (7,8)	

*Sólo en pacientes de riesgo citogenético intermedio

Tabla 18. Expresión del miR-30a en función de las características clínico-biológicas de los pacientes. Los datos están expresados en unidades de $2^{-\Delta Ct}$ multiplicadas por 1000

Característica	Expresión del miR-30a		p-valor
	Mediana (rango)	N (%)	
Edad (años)			0,291
≤ 60	5,46 (0,59-343,98)	98 (49,0)	
> 60	6,34 (0,53-260,83)	102 (51,0)	
Género			0,076
Hombre	7,04 (0,53-343,98)	117 (58,8)	
Mujer	5,12 (0,59-260,83)	83 (41,5)	
Leucocitos en SP x 10⁹/L			0,433
≤ 50	5,56 (0,53-260,83)	138 (69,0)	
> 50	7,01 (0,59-343,98)	49 (24,5)	
No disponible		13 (6,5)	
Riesgo citogenético			0,911
Favorable	4,72 (2,23-112,6)	15 (7,5)	
Intermedio	6,28 (0,53-344,0)	105 (52,5)	
Desfavorable	7,07 (1,33-68,61)	29 (14,5)	
No valorable		51 (25,5)	
Grupo FAB			0,482
M0	4,46 (2,11-36,75)	15 (7,5)	
M1	6,57 (0,59-162,97)	45 (22,5)	
M2	5,01 (0,53-20,23)	42 (21,0)	
M4	7,04 (0,85-112,62)	42 (14,0)	
M5	7,53 (0,95-343,98)	28 (14,0)	
M6	5,42 (1,33-24,45)	7 (3,5)	
No disponible		21 (10,59)	
Marcadores moleculares*			
<i>FLT3-ITD</i>			0,679
Positivo	6,00 (0,53-103,8)	26 (24,76)	
Negativo	6,55 (0,59-344,0)	73 (69,52)	
No valorable			
<i>NPM1</i>			0,009
Positivo	4,41 (0,53-132,4)	43 (40,95)	
Negativo	8,88 (1,47-343,98)	54 (51,43)	
No valorable		8 (7,62)	

*Sólo en pacientes de riesgo citogenético intermedio

9. Valor pronóstico de *MYBL2* y el miR-30a en la LMA

9.1 Resultado de la inducción según la expresión de *MYBL2*

Se analizó si la expresión de *MYBL2* se asociaba con la respuesta al tratamiento con quimioterapia intensiva tras la inducción en 209 pacientes. En nuestra serie, el 68,9% de los pacientes alcanzó la remisión completa, el 13,9% presentó resistencia al tratamiento y el 17,2% falleció. No se encontraron diferencias en la respuesta a la terapia de inducción en función de la expresión categórica (menor o mayor que la mediana de expresión) de *MYBL2* ($p=0,342$; Tabla 19).

Tabla 19. Resultado tras la terapia de inducción con quimioterapia intensiva según la expresión de *MYBL2* en 209 pacientes de LMA

Resultado de la inducción	Expresión categórica de <i>MYBL2</i>		Total Nº (%)
	< Mediana	≥ Mediana	
Remisión completa	73	71	144 (68,9)
Resistencia	11	18	29 (13,9)
Muerte	15	21	36 (17,2)
Total	99 (47,4)	110 (52,6)	209 (100)

9.2 Seguimiento evolutivo según la expresión de *MYBL2*

La mediana de seguimiento de la serie de pacientes ($n=209$) para la SG fue de 8,6 (rango 1-139) meses. Para el grupo de pacientes que alcanzó la RC ($n=144$), la mediana fue de 9,5 (rango 1-139) meses.

Análisis univariante

El análisis en la serie global mostró que la expresión de *MYBL2* (hiperexpresión vs. no hiperexpresión) no tuvo impacto en la SG a los tres años (24,8% vs. 37,6%, respectivamente; $p=0,315$). Sin embargo, aquellos pacientes que hiperexpresaban *MYBL2* presentaron una menor SLR (38,9% vs. 58,5%; $p=0,044$) y una tendencia a una menor SLE (30,8% vs. 48,2%; $p=0,062$)

Además, al considerar sólo el grupo de pacientes con cariotipo de riesgo intermedio, aquellos que hiperexpresaban *MYBL2* presentaron una menor SLE (31,3% vs. 56,1%; $p=0,020$), y una menor SLR (39,0% vs. 53,2%; $p=0,025$).

También se estudió la influencia de la expresión de *MYBL2* en la supervivencia de los pacientes menores de 60 años. Nuevamente se obtuvieron diferencias significativas en la SLE y la SLR (SLE: 37,2% vs. 62,3%; $p=0,030$. SLR: 45,8% vs. 72,9%; $p=0,013$) (Figura 25).

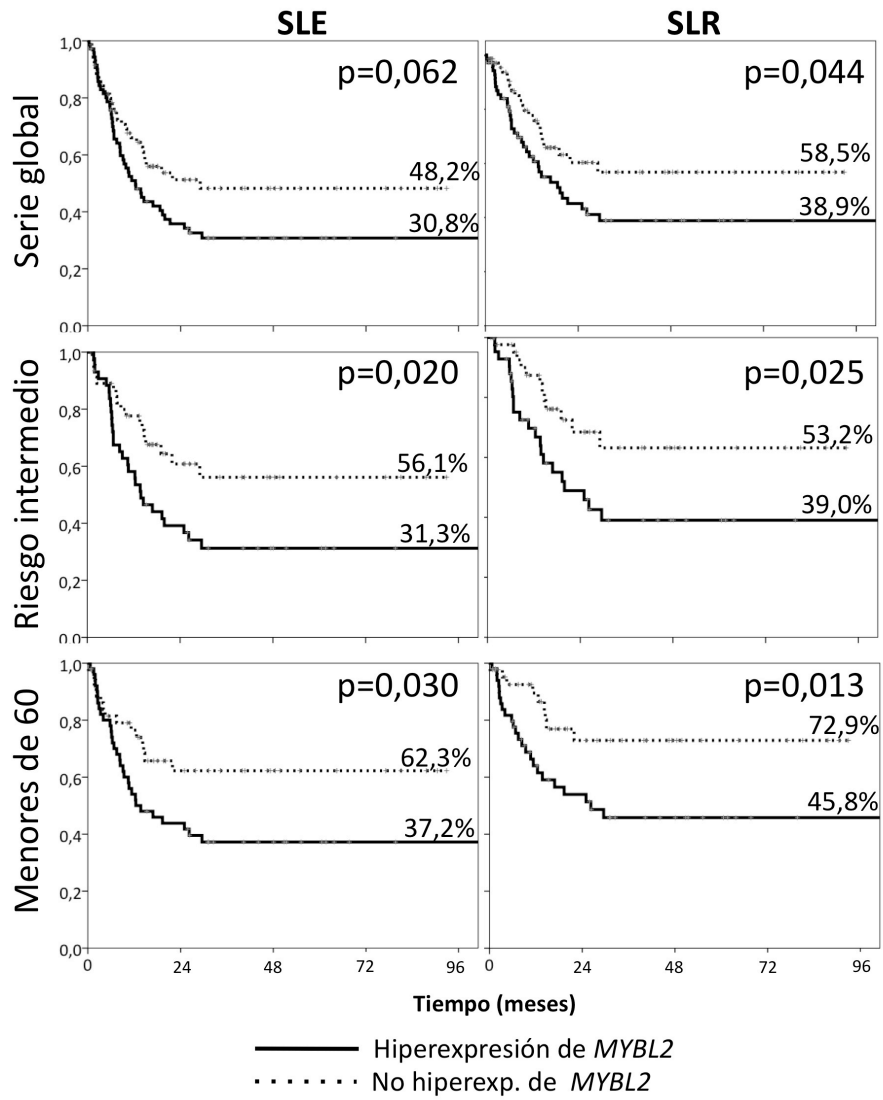


Figura 25. Análisis de Kaplan-Meier para la SLE y SLR según la expresión de MYBL2. Se comparó la SLE y SLR en los pacientes que hiperexpresaron (línea continua) y los que no hiperexpresaron (línea punteada) MYBL2. Se muestran tanto para la serie global de pacientes (paneles superiores) como en pacientes de riesgo citogenético intermedio (paneles centrales), como en pacientes menores de 60 años (paneles inferiores).

Análisis multivariante

En el análisis multivariante de supervivencia se incluyeron las variables edad, sexo, recuento de leucocitos en SP, recuento de blastos en SP, estratificación de riesgo citogenético y expresión categórica de *MYBL2* (hiperexpresión vs. no hiperexpresión). En la serie global de pacientes se mantuvieron como factores pronósticos independientes para SLE la hiperexpresión de *MYBL2* (HR 2,10 (1,12-3,92), $p=0,020$) y ser menor de 60 años (HR 0,42 (0,022-0,80), $p=0,008$). Para la SLR también se mantuvo como factor independiente el riesgo citogenético (HR 3,6 (1,35-9,97), $p=0,010$) además de la hiperexpresión de *MYBL2* (HR 2,46 (1,16-5,22), $p=0,010$) y ser menor de 60 años (HR 0,23 (0,14-0,65), $p=0,002$).

En el análisis restringido a los pacientes de riesgo intermedio además de las variables anteriores, se incluyó el estado mutacional de *FLT3* y *NPM1*. Para estos pacientes la expresión de *MYBL2* (SLE: HR 3,46 (1,53-7,85), $p=0,003$; SLR: HR 5,06 (1,75-14,63), $p=0,003$), la edad (SLE: HR 0,18 (0,08-0,41), $p<0,001$; SLR: HR 0,10 (0,03-0,31), $p<0,001$) y el estado mutacional combinado de *FLT3* y *NPM1* (SLE: HR 8,33 (2,70-250,00), $p<0,001$; SLR: HR 6,67 (1,49-25,00), $p=0,012$) se mantuvieron como factores pronóstico independientes.

Finalmente se realizó el análisis multivariante restringido a los pacientes menores de 60 años. De nuevo, la expresión de *MYBL2* se mantuvo como factor pronóstico independiente para la SLE (HR 2,58 (1,09-6,10), $p=0,032$) y para la SLR (HR 3,31 (1,08-10,13), $p=0,036$). Para la SLR también se mantuvo el riesgo citogenético como factor independiente (HR 4,35 (1,3-14,29), $p=0,014$) (Tabla 20).

Tabla 20. Análisis multivariante para la SLE y la SLR en toda la serie de pacientes, en pacientes de cariotipo de riesgo intermedio y en pacientes menores de 60 años

Factor	HR (IC95%)	p-valor
Serie global		
<u>SLE</u>		
Expresión <i>MYBL2</i> (Hiperexp. vs. No hiperexp.)	2,10 (1,12-3,92)	0,020
Edad (≤60 años vs. > 60)	0,42 (0,22-0,80)	0,008
<u>SLR</u>		
Expresión <i>MYBL2</i> (Hiperexp. vs. No hiperexp.)	2,46 (1,16-5,22)	0,019
Edad (≤60 años vs. > 60)	0,23 (0,14-0,65)	0,002
Riesgo citogenético		
(Desfavorable vs. favorable)	6,40 (1,48-27,03)	0,013
(Desfavorable vs. Intermedio)	3,6 (1,35-9,70)	0,010
Cariotipo de riesgo citogenético intermedio		
<u>SLE</u>		
Expresión de <i>MYBL2</i> (Hiperexp. vs. No hiperexp.)	3,46 (1,53-7,85)	0,003
Edad (≤60 vs. > 60 años)	0,18 (0,08-0,41)	<0,001
Mutaciones en FLT3/NPM1		
(FLT3+/NPM1+ o NPM1- vs. FLT3-/NPM1-)	8,33 (2,7-250)	<0,001
<u>SLR</u>		
Expresión de <i>MYBL2</i> (Hiperexp. vs. No hiperexp.)	5,06 (1,75-14,63)	0,003
Edad (≤60 vs. > 60 años)	0,10 (0,03-0,31)	<0,001
Mutaciones en FLT3/NPM1		
(FLT3+/NPM1+ o NPM1- vs. FLT3-/NPM1-)	6,67 (1,49-25,00)	0,012
Menores de 60		
<u>SLE</u>		
Expresión de <i>MYBL2</i> (Hiperexp. vs. No hiperexp.)	2,58 (1,09-6,10)	0,032
<u>SLR</u>		
Expresión de <i>MYBL2</i> (Hiperexp. vs. No hiperexp.)	3,31 (1,08-10,13)	0,036
Riesgo citogenético (Desfavorable vs. Intermedio)	4,35 (1,3-14,29)	0,014

9.3 Resultado de la inducción según la expresión del miR-30a

Se analizó si la expresión del miR-30a se asociaba con la respuesta al tratamiento con quimioterapia intensiva tras la inducción en 161 pacientes. En nuestra serie, el 68,9% de los pacientes alcanzó la remisión completa, el 14,9% presentó resistencia

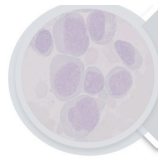
al tratamiento y el 16,1% falleció. No se encontraron diferencias en la respuesta a la terapia de inducción en función de la expresión categórica (menor o mayor que la mediana de expresión) del miR-30a ($p=0,347$; Tabla 21).

Tabla 21. Resultado tras la terapia de inducción con quimioterapia intensiva según la expresión del miR-30a en 161 pacientes de LMA

Resultado de la inducción	Expresión categórica del miR-30a		Total Nº (%)
	< Mediana	≥ Mediana	
Remisión completa	47	64	111 (68,9)
Resistencia	10	14	24 (14,9)
Muerte	15	11	26 (16,2)
Total	72 (44,7)	89 (55,3)	161 (100)

9.4 Seguimiento evolutivo según la expresión del miR-30a

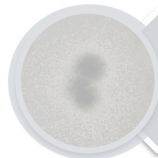
La expresión del miR-30a (infraexpresión vs. no infraexpresión) no presentó valor pronóstico en cuanto a la SG a los tres años (30,55% vs. 32,80%, respectivamente; $p=0,477$), SLE (49,76% vs. 31,79%; $p=0,126$) o SLR (55,67% vs. 37,35%; $p=0,123$) en la serie global. Se observó lo mismo para los pacientes con riesgo citogenético intermedio (SLE: 58,80% vs. 39,71%; $p=0,307$. SLR: 61,36% vs. 47,77%; $p=0,567$) y para los menores de 60 años (SLE: $p=0,018$. SLR: 65,84% vs. 48,12%; $p=0,141$).



Introducción



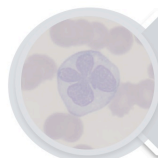
Hipótesis



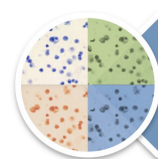
Objetivos



Material y Métodos



Resultados



Discusión



Conclusiones



Bibliografía

En el presente proyecto de Tesis Doctoral se ha caracterizado la expresión de *MYBL2* y del miR-3a en pacientes con LMA y en células CD34+ de cordón umbilical de donantes sanos. Este trabajo es el primero en el que se ha estudiado la expresión de *MYBL2* en una serie relativamente grande de pacientes de LMA y en progenitores hematopoyéticos de donantes sanos así como su asociación con las características clínico-biológicas de los pacientes. Este estudio ha demostrado que *MYBL2* está hiperexpresado en la LMA en comparación con las células control. También ha quedado demostrado que el miR-30a bloquea la traducción de *MYBL2* y que el aumento artificial de este miRNA en la línea celular KG1 reduce el número de células senescentes pero no es capaz de modificar el ciclo celular, la proliferación o la apoptosis. Finalmente se ha analizado el valor pronóstico de *MYBL2* y del miR-30a, encontrándose que la hiperexpresión de *MYBL2* confiere un peor pronóstico a los pacientes con cariotipo de riesgo citogenético intermedio y a los menores de 60 años.

Los resultados obtenidos en este trabajo aportan nuevos datos sobre la desregulación que presentan los blastos leucémicos a nivel transcripcional en cuanto al perfil de miRNAs y a la expresión de *MYBL2* en la LMA. Además, la expresión de *MYBL2* podría ser de utilidad clínica para el pronóstico de esta neoplasia mieloide.

1. Expresión de *MYBL2* en LMA y en CD34+

La expresión de *MYBL2* se ha encontrado aumentada en LMAs en comparación con las células CD34+. De acuerdo con nuestros resultados, otros autores también han descrito niveles elevados de *MYBL2* en diversos tumores, entre los que se incluyen el cáncer de hígado, próstata, mama, ovario y neuroblastoma (Najima *et al.*, 2008; Frau *et al.*, 2011; Bar-Shira *et al.*, 2002; Thorner *et al.*, 2009; Dedic *et al.*, 2013; Tanner *et al.*, 2000). Con respecto a la LMA, el grupo de Zauli *et al.* (2011) ha sido el único que ha reportado previamente esta misma observación pero en una serie muy reducida de pacientes (n=5). Los escasos datos publicados hasta el momento apoyan nuestras observaciones experimentales de que *MYBL2* está hiperexpresado en las LMAs.

La hiperexpresión de *MYBL2* en diversos tipos de neoplasias podría explicarse por su conocido papel en la regulación de la diferenciación, la proliferación y el ciclo celular. Respecto a la diferenciación, se ha reportado que el aumento artificial de la expresión de *MYBL2* es capaz de rescatar el arresto en G1 mediado por p53 en líneas celulares de glioblastoma u osteosarcoma (Lin *et al.*, 1994). En líneas celulares monocíticas expuestas a señales de diferenciación, la hiperexpresión de *MYBL2* es capaz de bloquearla en favor de la proliferación, de frenar la entrada en muerte celular programada e inhibir la diferenciación terminal (Bies *et al.*, 1996). De forma similar, en líneas celulares de neuroblastoma, la hiperexpresión de *MYBL2* bloquea la inducción de la diferenciación neuronal con ácido retinoico (Rascellà *et al.*, 1995).

En cuanto a la proliferación celular, se ha reportado que la hiperexpresión de *MYBL2* en líneas de carcinoma hepatocelular promueve la proliferación y la progresión del ciclo celular (Frau *et al.*, 2011).

Por tanto, los elevados niveles de *MYBL2* en la LMA y en otros tumores sólidos parecen indicar que este gen coopera en la aparición o el mantenimiento de las células neoplásicas mediante el bloqueo de la diferenciación celular y la inducción de la proliferación.

Por otra parte, existen trabajos que han estudiado las consecuencias de la reducción de los niveles de *MYBL2* en el sistema hematopoyético. En los pacientes con SMD se ha reportado la infraexpresión de *MYBL2*, independientemente de la presencia de deleciones en el brazo largo del cromosoma 20 (Bilhou-Nabera, 2001, Clarke *et al.*, 2013). Además, se ha demostrado que ratones haploinsuficientes para este gen desarrollan desórdenes hematopoyéticos (Clarke *et al.*, 2013). Estos hallazgos podrían explicarse porque la depleción de *Mybl2* en células madre hematopoyéticas de ratón produce una maduración defectiva debida a la reducción del *pool* de células madre y a la pérdida de células maduras por fallos en el ciclo celular (Baker *et al.*, 2014).

Por tanto, se puede concluir que los niveles de *MYBL2* en el sistema hematopoyético deben estar adecuadamente regulados para mantener su homeostasis y el balance entre proliferación, muerte y diferenciación.

2. Perfil de miRNAs en LMAs y en CD34+. Expresión de los miR-29a y miR-30 en la LMA

Los *arrays* de miRNAs han mostrado que estas pequeñas moléculas tienen un perfil de expresión en las LMAs muy diferente al de las células CD34+. La firma de miRNAs se ha caracterizado por un mayor número de miRNAs infraexpresados. Además, los valores con mayores diferencias en la expresión han correspondido también a los miRNAs infraexpresados. En consonancia con estos resultados, Lu *et al.* (2005) han descrito que la reducción de los niveles de expresión de miRNAs es un fenómeno generalizado en diferentes tipos de cáncer. No obstante, sería interesante aumentar la serie de validación para confirmar la firma de miRNAs encontrada con los *arrays* para poder definir asociaciones o perfiles de miRNAs con grupos homogéneos dentro de la LMA.

Otra característica a destacar de los resultados de los *arrays* es la dispersión que han mostrado las muestras de LMA en comparación con las de células CD34+ en el PCA, a pesar de ser muestras muy homogéneas en el cuanto al % de blastos, la expresión del antígeno CD34, el cariotipo y la presencia de mutaciones en *FLT3*, *NPM1* y *CEBPA*. Esta dispersión pone de manifiesto la gran heterogeneidad de la LMA. En este sentido, el reciente estudio del *Cancer Genome Atlas Research Network* (Ley *et al.*, 2013) ha demostrado que hay hasta un total de 23 genes recurrentemente mutados en la LMA. El uso de técnicas de alto rendimiento como la *NGS* aportaría información sobre el estado mutacional de los genes estudiados en este trabajo (*FLT3*, *NPM1* o *CEBPA*) y de otros menos

frecuentemente mutados. Por tanto, con estas técnicas se podría esclarecer si la heterogeneidad en el perfil de miRNAs de las LMAs se debe a la presencia de mutaciones en genes que no hemos analizado por métodos convencionales o si, por el contrario, estas diferencias se deben a que verdaderamente los blastos leucémicos de las muestras escogidas tienen patrones de expresión propios, independiente de la presencia de mutaciones.

De entre los miRNAs maduros encontrados por los *arrays* más altamente expresados en la LMA cabe destacar el miR-494, cuyos niveles de expresión también se han descrito aumentados en otros tipos de cáncer. Su hiperexpresión es capaz de activar la proliferación celular y la respuesta inmune. Se ha reportado que inhibe a PTEN, induciendo así la actividad de Akt y por tanto la invasión y metástasis (Liu *et al.*, 2012). También se ha publicado que regula el ciclo celular en el epitelio bronquial de ratones a través de la regulación de CDK6 (Duan *et al.*, 2010) y se ha descrito que promueve la proliferación celular a través de la regulación de BIM, una proteína que participa en la ruta de señalización de MEK-ERK y que está implicada en la resistencia a drogas en cáncer de pulmón no microcítico (Romano *et al.*, 2012). De estos trabajos se deduce que la alta expresión de este miRNA reduce los niveles de genes que actúan como genes supresores tumorales.

Los *arrays* también han mostrado que los miR-126, miR-146b o el miR-99a tienen la expresión reducida en la LMA respecto de las células CD34+. El miR-126 es un microRNA ya conocido por su implicación en cáncer; se ha descrito que su expresión está reducida en cáncer de colon en comparación con el tejido sano adyacente,

simulando la función de gen supresor tumoral (Guo et al., 2008; Li et al., 2013; Zhou et al., 2013). Además, recientemente se ha observado que la alteración de los niveles de expresión de este miRNA en progenitores hematopoyéticos afecta a la proliferación y al mantenimiento de la quiescencia (Lechman et al., 2012).

Aunque estos resultados de expresión alterada de miRNAs no se han contrastado con estudios funcionales, se puede deducir que debido al papel que juegan en otro tipo de tumores, podrían estar implicados en la regulación de rutas de señalización que afectan a la hematopoyesis o la proliferación celular y, por tanto, podrían participar en el proceso de transformación leucemogénica.

Entre los miRNAs alterados encontrados por los *arrays*, se han buscado aquellos con secuencias complementarias a la región 3'UTR de *MYBL2* como candidatos de su regulación. Los miR-29a y miR-30a/b/c/e se han incluido en la validación por cumplir estos dos criterios. Adicionalmente, Martínez et al. (2011) han demostrado que estos miRNAs regulan a *MYBL2* durante la senescencia celular.

En cuanto al papel de estos miRNAs en la LMA, la infraexpresión de la familia miRNA-29 está asociada a las t(11;22)/MLL, a las del(7q) y a LMAs con *NPM1 wild type* (Marcucci et al., 2008). También se ha demostrado que bajos niveles de expresión del miR-29a bloquean la apoptosis e inducen la aceleración del ciclo celular y la proliferación, por lo que podría participar en la aparición y/o mantenimiento del fenotipo leucémico (Garzón et al., 2009). Por el contrario, modelos *in vitro* han revelado que la inducción de la expresión de la familia miR-29 revierte este efecto en el

comportamiento celular, en concreto a través de la regulación de los genes *AKT2* y *CCND2* (Gong *et al.*, 2014). Respecto a la familia miR-30, no hay estudios que analicen su papel en la LMA, aunque sí se han detectado niveles bajos del miR-30a en carcinoma de colon, leucemia mieloide crónica y cáncer de mama (Liu *et al.*, 2013; Cheng *et al.*, 2012). Por tanto, los resultados de los *arrays* respecto a estos miRNAs también parecen ser relevantes funcionalmente en la LMA.

La validación de los miR-29a y miR-30a/b/c/e por qRT-PCR ha confirmado que estos miRNAs están infraexpresados en la LMA respecto de células CD34+, tanto en la serie inicial de validación como en la serie de confirmación.

3. Asociación en expresión de *MYBL2* y los miRNAs

Diversos miRNAs presentan sitios de unión complementarios a la región 3'UTR de *MYBL2*. De hecho, Papetti y Augenlicht (2011b) han demostrado que *MYBL2* puede ser regulado en diferentes contextos por estas moléculas. Por ejemplo, la expresión de *MYBL2* se reduce durante la diferenciación de las criptas del colon por la acción del miR-365. Como se ha mencionado anteriormente, se ha descrito que la familia miR-29/30 reduce los niveles de *MYBL2* durante la senescencia inducida por retinoblastoma (Martinez *et al.*, 2010).

Nuestros resultados han demostrado que la expresión del miR-30a, del miR-30b y del miR-30c, está inversamente correlacionada con la de *MYBL2* en la LMA. Así, las LMAs con altos

niveles de estos miRNAs tienen una expresión significativamente más baja de *MYBL2* y a la inversa.

Para contrastar esta hipótesis se han llevado a cabo diversos experimentos que han demostrado que los niveles de *MYBL2* aumentan y los de los miR-30a/b/c disminuyen con el % de blastos en MO de pacientes con LMA. Estos resultados apoyan la observación de que *MYBL2* está hiperexpresado y los miR-30a/b/c infraexpresados en la LMA, y sugieren que este patrón de expresión es característico de los blastos leucémicos.

Por otra parte, también se ha observado en cultivos celulares (KG1) que los niveles de *MYBL2* aumentan a nivel de mRNA y de proteína mientras que los de los miR-30a/b/c disminuyen en fases de máxima proliferación. Estos resultados sugieren que este patrón de expresión, característico de los blastos, podría tener un significado funcional. Además, esta observación estaría apoyada tanto por el conocido papel de *MYBL2* como potenciador de la proliferación como por el de regulador del ciclo celular (Golay *et al.*, 1997; Baker *et al.*, 2014, Maruyama *et al.*, 2014).

El análisis de expresión de *MYBL2* y los miR-30a/b/c en las distintas fases del ciclo celular, han confirmado que los niveles de mRNA y de proteína de *MYBL2* son máximos en la fase S en la línea celular mielóide KG1, resultados que concuerdan con lo descrito previamente por otros autores (Sala, 2005). Además, nuestros resultados han mostrado que los niveles de *MYBL2* y miR-30a/b/c tienen patrones inversos en las fases G1 y G2/M, tal y como se había hipotetizado. Estudios recientes al respecto muestran que miR-30a es

capaz de regular el ciclo celular en líneas celulares de cáncer de mama (Fu *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2013).

En cuanto a este último experimento, cabe mencionar que las células bloqueadas en en fase G1, S, o G2/M no han sido capaces de sincronizarse y volver a entrar en ciclo celular tras retirar la droga utilizada para el bloqueo en cada fase. Por tanto, los niveles de expresión de los miRNAs podrían no ser exactamente los que se detectan en un estado fisiológico normal.

4. Regulación de *MYBL2* por el miR-30a

La asociación recíproca entre *MYBL2* y los miR-30a/b/c descrita en el apartado anterior, nos condujo a la hipótesis inicial de que estos miRNAs podrían regular los niveles de mRNA de *MYBL2* en la LMA, observación previamente descrita en otras líneas celulares no mieloides (Martínez *et al.*, 2011). Sin embargo, los estudios con mimics han demostrado que esta hipótesis es incorrecta, ya que ni el miR-30a ni el miR-30c han sido capaces de alterar los niveles de mRNA de *MYBL2*. Por tanto, las asociaciones observadas en la LMA no se deben a una relación causa-efecto (niveles bajos de los miRNAs permiten la hiperexpresión de *MYBL2*), sino más bien a mecanismos de regulación inversos (la inducción de la transcripción de *MYBL2* y el silenciamiento de la expresión de estos miRNAs se activan de forma paralela).

Sin embargo, este mismo experimento ha demostrado que el miR-30a es capaz de bloquear la traducción de *MYBL2* al observarse

una reducción en los niveles de proteína al Transfectar las células con el mimic-30a.

Son muchos los miRNAs que regulan a sus dianas bloqueando la traducción sin alterar los niveles de mRNA, como por ejemplo los miR-126 y miR-15a (Grabher *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2009). En el caso del miR-30a, Mellios *et al.* (2008) han demostrado su capacidad de bloquear específicamente la traducción sin alterar los niveles de mRNA de otras dianas en tejido cerebral.

5. Efectos del miR-30a en la supervivencia celular

El aumento artificial del miR-30 (mediante el empleo de mimics) ha mostrado repercusiones sobre la supervivencia celular. Otros trabajos también han demostrado que el miR-30a reduce la tasa de proliferación en diversos tipos celulares y tumores, como el carcinoma de colon o cáncer de mama, a través de la inducción de la apoptosis (Baraniskin *et al.*, 2012; Cheng *et al.*, 2012; Fu *et al.*, 2014) y además, como ya se ha comentado anteriormente, es capaz de regular el ciclo celular promoviendo el arresto en G1 (Fu *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2013).

En el caso de la LMA, el mecanismo que atribuimos a la reducción de la proliferación ha sido la senescencia, de forma que el incremento artificial de este miRNA, aumenta el número de células senescentes. Este efecto lo podría ejercer a través de MYBL2, que como se ha comentado es capaz de regular la senescencia. Sin embargo, no podemos descartar que el 30a también ejerza su efecto sobre la senescencia a través de otras

dianas. En este sentido, el miR-30a podría estar actuando sobre la Beclina 1 o la ciclina E2 (Zhu *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2013).

En nuestros experimentos, los efectos desencadenados por el miR-30a no son tan notables como los descritos por otros grupos que demuestran que el miR-30a es capaz de reducir la supervivencia. Otros trabajos utilizan infecciones con virus en lugar de transfecciones con moléculas sintéticas, y podría ser la causa de los efectos más concluyentes que observan (Baraniskin *et al.*, 2012; Cheng *et al.*, 2012). Las diferencias en el efecto del miR-30a también podría deberse a que nuestro trabajo y los anteriormente descritos se llevan a cabo en diferentes líneas celulares. Apoyando esta hipótesis, el trabajo de Martínez *et al.*, (2011) describe diferentes niveles de reducción de la expresión de *MYBL2* en cada línea celular tras aumentar artificialmente la expresión de los miR-30. Finalmente, otro factor que cabe destacar es que la línea celular KG1 tiene niveles endógenos de *MYBL2* muy elevados. Por ello, aunque el miR-30a es capaz de disminuir los niveles de proteína, la cantidad de *MYBL2* que permanece podría no sobrepasar el umbral necesario por debajo del cual los efectos de la reducción de *MYBL2* son capaces de alterar el comportamiento celular.

6. Asociación de *MYBL2* con las características clínico-biológicas de la LMA y valor pronóstico

En relación con las características citoquímicas de las leucemias, aunque se ha observado que en las M0 y M6 hay un mayor porcentaje de casos con hiperexpresión de *MYBL2*, no se han encontrado diferencias significativas de expresión. El número de subgrupos establecidos por la clasificación FAB limita el poder estadístico del análisis; para poder contrastar estos resultados sería necesario analizar la expresión de este gen en una cohorte de pacientes más amplia.

Atendiendo a la clasificación de riesgo citogenético (MRC), la expresión de *MYBL2* ha sido menor en los pacientes de cariotipo de riesgo favorable, ha incrementado con el riesgo citogenético, de forma que los pacientes de riesgo desfavorable han mostrado una mayor expresión de *MYBL2*. La expresión y activación de *MYBL2* también está aumentada en pacientes con carcinoma hepatocelular de mayor riesgo, en el que se ha visto que niveles elevados están asociados con el aumento de la proliferación, la disminución de la apoptosis y la presencia de mutaciones en p53. Además, si p53 está mutado, el silenciamiento de *MYBL2 in Vitro* aumenta la sensibilidad a la doxorubicina (Calvisi *et al.*, 2011). En cáncer de mama también se ha descrito que las mutaciones en p53 están asociadas a una mayor expresión de *MYBL2* (Mannefeld *et al.*, 2009). Esta asociación podría deberse a que las células con p53 mutado intentarían compensar esta alteración aumentando los niveles de *MYBL2*, que

participa en el mantenimiento de la estabilidad génica tras agresiones al DNA (Lorvellec *et al.*, 2010).

En la LMA las mutaciones en p53 están asociadas a riesgo citogenético adverso, y además confieren un pronóstico extremadamente desfavorable (Bowen *et al.*, 2009). Por tanto, sería muy interesante estudiar si en la LMA las mutaciones de p53 también se asocian con la expresión de *MYBL2*.

Finalmente, se ha demostrado que una mayor expresión de *MYBL2* confiere un peor pronóstico independiente, tanto en términos de SLE como de SLR. En este sentido, nuestros resultados son los primeros en establecer el valor pronóstico de la hiperexpresión de *MYBL2* en la LMA. Aunque sí que existen trabajos que demuestran que la hiperexpresión de *MYBL2* aporta valor pronóstico adverso en cáncer de mama, colon o hígado (Rascellà *et al.*, 1999; Frau *et al.*, 2011; Dedic *et al.*, 2013).

El papel de *MYBL2* como regulador de la supervivencia en células hematopoyéticas (Arsura *et al.*, 1992; Golay *et al.*, 1996; Sala, 2005; Garcia y Frampton, 2006) podría explicar, al menos en parte, la asociación de la hiperexpresión de *MYBL2* con un peor pronóstico de la enfermedad, ya que *MYBL2* promueve la proliferación e inhibe la muerte celular, bloqueando la senescencia (Masselik *et al.*, 2002; Johung *et al.*, 2007). Por tanto, las LMAs que hiperexpresan *MYBL2* podrían tener una ventaja proliferativa, haciendo que estos pacientes muestren un comportamiento más agresivo de la enfermedad, lo que explicaría la mayor probabilidad de recaída y muerte.

En conjunto, estas observaciones parecen apoyar la hipótesis de que *MYBL2* participa en la aparición o mantenimiento del fenotipo leucémico, aportando una ventaja proliferativa o de supervivencia a los blastos leucémicos.

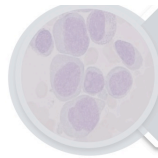
La importancia de la caracterización de la expresión de *MYBL2* en LMAs radica en que el hallazgo de nuevos marcadores moleculares podría permitir una mejor estratificación del riesgo de los pacientes. Este hallazgo es especialmente importante en pacientes con cariotipo de riesgo citogenético intermedio dado que existe una gran variabilidad en cuanto a la evolución clínica de la enfermedad en este grupo. Por tanto, el disponer de un nuevo marcador molecular para predecir el desarrollo que va a tener cada paciente tiene un gran valor de aplicación clínica y *MYBL2* podría desempeñar este papel.

7. Asociación del miR-30a con las características clínicobiológicas de la LMA y valor pronóstico

Nuestros resultados han mostrado que los pacientes de cariotipo intermedio con *NPM1* mutado tienen una menor expresión del miR-30a. En este sentido, está ampliamente descrito que las LMAs con mutaciones en *FLT3* o *NPM1* tienen patrones de expresión de miRNAs claramente diferentes (Garzon *et al.*, 2008; Whiman *et al.* 2010). De hecho, la baja expresión del miR-30a en pacientes con mutaciones en *NPM1* ha sido publicada por el grupo del *Cancer Genome Atlas Research Network*, que ha demostrado que las

mutaciones en *NPM1* concurren con perfiles de expresión de miRNAs específicos en los que la familia miR-30 está implicada (Ley *et al.*, 2013).

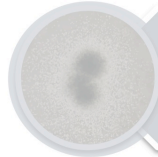
En cuanto a su valor pronóstico, la expresión del miR-30a no ha resultado tener relevancia en la progresión de la LMA pese a estar asociada de forma inversa a la de *MYBL2*. No existen otros trabajos que analicen el impacto pronóstico de la expresión del miR-30a en la LMA; sin embargo podría tenerlo al menos en cáncer de mama (Zhang *et al.*, 2014). De ser así, su valor pronóstico podría explicarse por los efectos como gen supresor de tumores, discutidos en el apartado 5, ya que la baja expresión de este miRNA en cáncer tiene como consecuencia el aumento de la proliferación y la disminución de la muerte celular.



Introducción



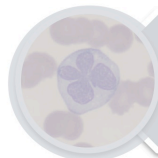
Hipótesis



Objetivos



Material y Métodos



Resultados



Discusión

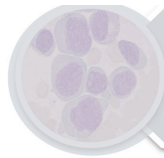


Conclusiones



Bibliografía

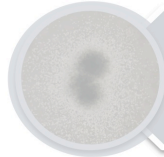
1. *MYBL2* está hiperexpresado en la LMA en comparación con las células CD34+.
2. El perfil de expresión de miRNAs en los blastos leucémicos es diferente al de los progenitores hematopoyéticos CD34+ de donantes sanos.
3. La expresión de los miRNAs miR-30a/b/c está inversamente correlacionada con la de *MYBL2* en la LMA.
4. El miR-30a bloquea la traducción de *MYBL2* a través de la unión directa a su región 3'UTR pero no altera la estabilidad del mRNA.
5. El miR-30a reduce la proliferación celular e induce la senescencia en la línea celular KG1.
6. La expresión de *MYBL2* aumenta con el riesgo citogenético. En el grupo de riesgo intermedio, la expresión del miR-30a disminuye en los pacientes con mutaciones en *NPM1*.
7. La hiperexpresión de *MYBL2* es un factor de mal pronóstico independiente en la LMA en términos de SLE y SLR, sobre todo en pacientes con cariotipo intermedio y en pacientes menores de 60 años.



Introducción



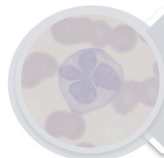
Hipótesis



Objetivos



Material y Métodos



Resultados



Discusión



Conclusiones



Bibliografía

A

- Ahmad J, Hasnain SE, Siddiqui MA *et al.* MicroRNA in carcinogenesis and cancer diagnostics: A new paradigm. *Indian J med Res* 2013; 137: 680-694
- Alachkar H, Santhanam R, Harb JG *et al.* Silvestrol exhibits significant in vivo and in vitro antileukemic activities and inhibits FLT3 and miR-155 expressions in acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol* 2013; 6: 21-32
- Ansieau S, Kowenz-Leutz E, Dechend R *et al.* B-Myb, a repressed trans-activating protein. *J Mol Med* 1997; 75: 815–819
- Arsura M, Introna M *et al.* B-myb antisense oligonucleotides inhibit proliferation of human hematopoietic cell lines. *Blood* 1992; 79(10): 2708-16

B

- Bar-Shira A, Pinthus JH, Rozovsky U *et al.* Multiple genes in human 20q13 chromosomal region are involved in an advanced prostate cancer xenograft. *Cancer Res* 2002; 62: 6803-07
- Baker SJ, Ma'ayan A, Lieu YK, *et al.* B-myb is an essential regulator of hematopoietic stem cell and myeloid progenitor cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014; 111(8): 3122-7
- Baraniskin A, Birkenkamp-Demtroder K, Maghnouj A *et al.* MiR-30a-5p suppresses tumor growth in colon carcinoma by targeting DTL. *Carcinogenesis* 2012; 33(4): 732–39

- Bartsch O, Horstmann S, Toprak K *et al.* Identification of cyclin A/Cdk2 phosphorylation sites in B-Myb. *Eur J Biochem* 1999; 260: 384–91
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT *et al.* Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol.* 1976; 33(4):451-8
- Bies J, Hoffman B, Amanullah A *et al.* B-Myb prevents growth arrest associated with terminal differentiation of monocytic cells. *Oncogene* 1996; 12(2): 355-63
- Bilhou-Nabera C. del(20q) in myeloid malignancies. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol* 2001; 5(1): 33-3
- Bissels U, Bosio A, Wagner W. MicroRNAs are shaping the hematopoietic landscape. *Haematologica* 2012; 97(2): 160-67
- Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* 2004; 10: 185-91
- Bokheler KR. Stem cell pluripotency: a cellular trait that depends on transcription factors, chromatin state and checkpoint deficient cell cycle. *J Cell Physiol* 2009; 21: 10-7
- Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997; 3(7): 730-7
- Bowen D, Groves MJ, Burnett AK *et al.* TP53 gene mutation is frequent in patients with acute myeloid leukemia and complex karyotype, and is associated with very poor prognosis. *Leukemia* 2009; 23(1): 203-6

- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248–54

C

- Calvisi DF, Simile MM, Ladu S, *et al.* Activation of v-Myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog-like2 (MYBL2)-LIN9 complex contributes to human hepatocarcinogenesis and identifies a subset of hepatocellular carcinoma with mutant p53. *Hepatology* 2011; 53(4): 1226-36
- Cammarata G, Augugliaro L, Salemi D *et al.* Differential expression of specific microRNA and their targets in acute myeloid leukemia. *Am J Hematol* 2010; 85(5): 331-9
- Cancer Genome Atlas Research Network: Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2013, 368(22): 2059-74
- Cervellera M, Raschella G, Santilli G *et al.* Direct transactivation of the anti-apoptotic gene apolipoprotein J (clusterin) by B-MYB. *J Biol Chem* 2000; 275: 21055–60
- Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E *et al.* TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 2005; 436: 740-44
- Cheng CW, Wang HW, Chang CW *et al.* MicroRNA-30a inhibits cell migration and invasion by downregulating vimentin expression and is a potential prognostic marker in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 134: 1081–93

- Clarke M, Dumon S, Ward C *et al.* MYBL2 haploinsufficiency increases susceptibility to age-related haematopoietic neoplasia. *Leukemia* 2013; 27(3): 661-70
- Collado M, Blasco MA, Serrano M. Cellular Senescence in Cancer and Aging. *Cell* 2007; 30(2): 223-33

D

- Davidson CJ, Tirouvanziam R, Herzenberg LA *et al.* Functional evolution of the vertebrate myb gene family: B-Myb, but neither A-Myb nor c-Myb, complements *Drosophila* Myb in hemocytes. *Genetics* 2005; 169:215-29
- Dedic N, Jakic-Razumovic J, Kulic A *et al.* Prognostic value of proliferation markers expression in breast cancer. *Med Oncol* 2013; 30: 523-33
- Deschler B, Lubbert M. Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. *Cancer* 2006; 107: 2099-107
- Díaz-Beyá M, Brunet S, Nomdedéu J *et al.* MicroRNA expression at diagnosis adds relevant prognostic information to molecular categorization in patients with intermediate-risk cytogenetic acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2014; 28(4): 804-12
- Döhner H, Estey EH, Amadori S *et al.*; European LeukemiaNet. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2010; 115(3): 453-74
- Duan H, Jiang Y, Zhang H *et al.* MiR-320 and miR-494 affect cell cycles of primary murine bronchial epithelial cells exposed to benzo[a]pyrene. *Toxicol In Vitro* 2010; 24(3): 928-35

E

- Engelhard A, Campbell K, Calabretta B. B-myb alters the response of myeloid precursor cells to G-CSF. *Exp Cell Res* 2000; 254(1): 153-62
- Estey E, Döhner H. Acute myeloid leukaemia. *Lancet* 2006; 386: 1894-907
- Estey EH. Acute myeloid leukemia: 2013 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol* 2013; 88: 318-27

F

- Fabian MR, Sonenberg N, Filipowicz W. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu Rev Biochem* 2010; 79: 351-59
- Falini B, Mecucci C, Tiacci E *et al.* Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med* 2005; 352: 254-66
- Frau M, Ladu S, Calvisi DF *et al.* Mybl2 expression is under genetic control and contributes to determine a hepatocellular carcinoma susceptible phenotype. *J Hepatol* 2011; 55(1): 111-9
- Fröhling S, Scholl C, Gilliland D *et al.* Genetics of myeloid malignancies: pathogenetic and clinical implications. *J Clin Oncol* 2005; 23(26): 6285-95
- Fu J, Xu X, Kang L, *et al.* miR-30a suppresses breast cancer cell proliferation and migration by targeting *eya2*. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;445(2): 314-9

G

- García P, Frampton J. The transcription factor B-Myb is essential for S-phase progression and genomic stability in diploid and polyploid megakaryocytes. *J Cell Sci* 2006; 119(8): 1483-93
- Garzon R, Garofalo M, Martelli MP *et al.* Distinctive microRNA signature of acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic mutated nucleophosmin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(10): 3945-50
- Garzon R, Heaphy CE, Havelange V *et al.* MicroRNA 29b functions in acute myeloid leukemia. *Blood* 2009; 114(26): 5331-5341
- Gilliland DG, Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood* 2002; 100: 1532-42
- Golay J, Broccoli V, Borleri GM *et al.* Redundant functions of B-MYB and c-MYB in differentiating myeloid cells. *Cell Growth Differ* 1997; 8: 1305-16
- Gong JN, Yu J, Lin HS *et al.* The role, mechanism and potentially therapeutic application of microRNA-29 family in acute myeloid leukemia. *Cell Death Differ* 2014; 21(1): 100-12
- Grabher C, Payne EM, Johnston AB *et al.* Zebrafish microRNA-126 determines hematopoietic cell fate through c-Myb. *Leukemia* 2011; 25: 506-14
- Grimwade D, Walker H, Oliver F *et al.* The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood* 1998; 92(7): 2322-33

- Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, *et al.* Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukaemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated on the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood* 2010; 116(3): 354-65
- Guo C, Sah JF, Beard L *et al.*, The noncoding RNA, miR-126, suppresses the growth of neoplastic cells by targeting phosphatidylinositol 3-kinase signaling and is frequently lost in colon cancers. *Genes Chromosomes Cancer* 2008; 47: 939–46
- Gupta M, Raghavan M, Gale RE, *et al.* Novel regions of acquired uniparental disomy discovered in acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2008; 47(9): 729-39

H

- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144(5): 646-74
- Havelange V, Garzon, R. MicroRNAs: emerging key regulators of hematopoiesis. *Am J Hematol* 2010; 85: 935–42
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ *et al.* Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996; 6(10): 986-94
- Huang Y, Wu J, Li R *et al.* B-MYB delays cell aging by repressing p16 (INK4a) transcription. *Cell Mol Life Sci* 2011; 68: 893–901

I

- Iorio MV, Croce CM. Causes and consequences of microRNA dysregulation. *Cancer J* 2012; 18(3): 215-22

J

- Jansson MD, Lund H. microRNA and Cancer. *Molecular Oncology* 2012; 6(6): 590–610
- Johansen LM, Iwama A, Lodie TA *et al.* c-Myc is a critical target for C/EBP α in granulopoiesis. *Mol Cell Biol* 2001; 21(11): 3789–806
- Johnson TK, Schweppe RE, Septer J *et al.* 1999. Phosphorylation of B-Myb regulates its transactivation potential and DNA binding. *J Biol Chem* 1999; 274: 36741-9
- Johung K, Goodwin EC, DiMaio D. Human papillomavirus E7 repression in cervical carcinoma cells initiates a transcriptional cascade driven by the retinoblastoma family, resulting in senescence. *J Virol* 2007; 81: 2102–16
- Jongen-Lavrencic M, Sun SM, Dijkstra MK *et al.* MicroRNA expression profiling in relation to the genetic heterogeneity of acute myeloid leukemia. *Blood* 2008; 111(10): 5078-85
- Jordan CT, Guzman ML. Mechanisms controlling pathogenesis and survival of leukemic stem cells. *Oncogene* 2004; 23: 7178-87

K

- Ko ER, Ko D, Chen C, *et al.* A conserved acidic patch in the Myb domain is required for activation of an endogenous target gene and for chromatin binding. *Mol cancer* 2008; 7: 77-97
- Koeffler HP, Golde DW. Acute myelogenous leukemia: a human cell line responsive to colony-stimulating activity. *Science* 1978; 200: 1153-4

L

- Lam EW, Watson RJ. An E2F-binding site mediates cell-cycle regulated repression of mouse B-myb transcription. *EMBO J* 1993; 12(7): 2705-13
- Lam EW, Morris JD, Davies R *et al.* HPV16 E7 oncoprotein deregulates B-myb expression: correlation with targeting of p107/E2F complexes. *EMBO J* 1994; 13(4): 871-8
- Lam EW, Bennett JD, Watson RJ. Cell-cycle regulation of human B-myb transcription. *Gene* 1995; 160(2): 277-81
- Lane S, Farlie P, Watson R. B-Myb function can be markedly enhanced by cyclin A-dependent kinase and protein truncation. *Oncogene* 1997; 14: 2445–53
- Lang G, Gombert WM, Gould HJ, A transcriptional regularoty element in the coding sequence on the human bcl-2 gene. *Immunology* 2005; 114: 25-36
- Lechman ER, Gentner B, van Galen P *et al.* Attenuation of miR-126 activity expands HSC in vivo without exhaustion. *Cell Stem Cell* 2012; 11: 799–811
- Lee Y, Kim M, Han J *et al.* MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 2004; 23: 4051-60
- Li Z, Li N, Wu M *et al.*, Expression of miR-126 suppresses migration and invasion of colon cancer cells by targeting CXCR4. *Mol Cell Biochem* 2013; 381(1-2): 233-42
- Lin D, Fiscella M, O'Connor PM *et al.* Constitutive expression of B-myb can bypass p53-induced Waf1/Cip1-mediated G1 arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(21): 10079–83

- Liu Y, Lai L, Chen Q *et al.* MicroRNA-494 is required for the accumulation and functions of tumor-expanded myeloid-derived suppressor cells via targeting of PTEN. *J Immunol* 2012; 188(11): 5500-10
- Liu, Y, Song Y, Ma W, *et al.* Decreased microRNA-30a levels are associated with enhanced ABL1 and BCR-ABL1 expression in chronic myeloid leukemia. *Leukemia Res* 2013; 37(3): 349-56
- Lorvellec M, Dumon S, Maya-Mendoza A *et al.* B-Myb is critical for proper DNA duplication during an unperturbed S phase in mouse embryonic stem cells. *Stem Cells* 2010; 28(10): 1751-59
- Lu J, Getz G, Miska EA *et al.* MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005; 435(7043): 834-8
- Lytle JR, Yario TA, Steitz JA. Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 9667-9672

M

- Mannefeld M, Klassen E, Gaubatz S. B-MYB is required for recovery from the DNA damage-induced G2 checkpoint in p53 mutant cells. *Cancer Res* 2009; 69(9): 4073-80
- Marcucci G, Maharry K, Radmacher MD *et al.* Prognostic significance of, and gene and microRNA expression signatures associated with, CEBPA mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with high-risk molecular features: a Cancer and Leukemia Group B Study. *J Clin Oncol* 2008; 26(31): 5078-87

- Marcucci G, Mrózek K, Radmacher MD *et al.* The prognostic and functional role of microRNAs in acute myeloid leukemia. *Blood* 2011; 117(4): 1121-9
- Marcucci G, Maharry KS, Metzeler KH, *et al.* Clinical role of microRNAs in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: miR-155 upregulation independently identifies high-risk patients. *J Clin Oncol* 2013; 31(17): 2086-93
- Martínez I, DiMaio D. B-Myb, Cancer, Senescence, and MicroRNAs. *Cancer Res* 2011; 71(16): 5370-3
- Martínez I, Cazalla D, Almstead LL *et al.* miR-29 and miR-30 regulate B-Myb expression during cellular senescence. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108(2): 522-27
- Maruyama H, Ishitsuka Y, Fujisawa Y *et al.*, B-Myb enhances proliferation and suppresses differentiation of keratinocytes in three-dimensional cell culture. *Arch Dermatol Res* 2014; 306(4): 375-84
- Masselink H, Vastenhouw N, Bernards R. B-myb rescues ras-induced premature senescence, which requires its transactivation domain. *Cancer Lett* 2001; 171: 87–101
- Maynadié M, Girodon F, Manivet-Janoray I *et al.* Twenty-five years of epidemiological recording on myeloid malignancies: data from the specialized registry of hematologic malignancies of Côte d'Or (Burgundy, France). *Haematologica* 2011; 96(1): 55-61
- Mellios N, Huang HS, Grigorenko A *et al.* A set of differentially expressed miRNAs, including miR-30a-5p, act as post-transcriptional inhibitors of BDNF in prefrontal cortex. *Hum Mol Genet* 2008; 17(19): 3030-42

- Miranda KC, Huynh T, Tay Y *et al.* A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes. *Cell* 2006; 126: 1203–17
- Mishra PJ, Bertino JR. MicroRNA polymorphisms: the future of pharmacogenomics, molecular epidemiology and individualized medicine. *Pharmacogenomics* 2009; 10(3): 399-416
- Moretti F, Thermann R, Hentze MW. Mechanism of translational regulation by miR-2 from sites in the 5' untranslated region or the open reading frame. *RNA* 2010; 16: 2493-502
- Mortensen RD, Serra M, Steitz JA *et al.* Posttranscriptional activation of gene expression in *Xenopus laevis* oocytes by microRNA–protein complexes (microRNPs). *PNAS* 2011; 108(20): 8281–86
- Mrózek K, Marcucci G, Nicolet D *et al.* Prognostic significance of the European LeukemiaNet standardized system for reporting cytogenetic and molecular alterations in adults with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2012; 30(36): 4515-23
- Muller FJ, Laurent LC, Kistna D *et al.* Regulatory Networks define phenotypic classes of human stem cell lines. *Nature* 2008; 455: 401-05

N

- Nakajima T, Yasui K, Zen K *et al.* Activation of B-Myb by E2F1 in hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 2008; 38(9): 886-95

O

- O'Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA *et al.* Sustained expression of microRNA-155 in hematopoietic stem cells causes a myeloproliferative disorder. *J Exp Med* 2008; 205(3): 585-594
- Oelgeschläger M, Nuchprayoon I, Lüscher B, *et al.* C/EBP, c-Myb, and PU.1 cooperate to regulate the neutrophil elastase promoter. *Mol Cell Biol* 1996; 16(9): 4717-25
- Oh IH, Reddy EP. The myb gene family in cell growth, differentiation and apoptosis. *Oncogene* 1999; 18:3017-3033
- Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* 2008; 132(4): 631-44
- Ørom UA, Nielsen FC, Lund AH. MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol Cell* 2008; 30: 460-71

P

- Papetti M, Augenlicht LH. MYBL2, a link between proliferation and differentiation in maturing colon epithelial cells. *J Cell Physiol* 2011a; 226(3): 785-91
- Papetti M, Augenlicht LH. Mybl2, downregulated during colon epithelial cell maturation, is suppressed by miR-365. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011b; 301(3): 508-18
- Patel JP, Gönen M, Figueroa ME *et al.* Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2012; 366(12): 1079-89

- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR *Nucleic Acids Res* 2001; 29(9): e45

Q

- Qin W, Shi Y, Zhao B, *et al.* miR-24 regulates apoptosis by targeting the open reading frame (ORF) region of FAF1 in cancer cells. *PLoS ONE* 2010; 5: e9429

R

- Raschellà G, Negroni A, Sala A *et al.* Requirement of b-myb function for survival and differentiative potential of human neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 1995; 270(15): 8540-5
- Raschellà G, Cesi V, Amendola R *et al.* Expression of B-myb in neuroblastoma tumors is a poor prognostic factor independent from MYCN amplification. *Cancer Res* 1999; 59(14): 3365-8
- Renneville A, Roumier C, Biggio V *et al.* Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. *Leukemia* 2008; 22: 915–31
- Robinson C, Light Y, Groves R *et al.* Cell-cycle regulation of B-Myb protein expression: specific phosphorylation during the S phase of the cell cycle. *Oncogene* 1996; 12(9): 1855-64
- Rockova V, Abbas S, Wouters BJ, *et al.* Risk stratification of intermediate-risk acute myeloid leukemia: integrative analysis of a multitude of gene mutation and gene expression markers. *Blood* 2011; 118: 1069-1076
- Rodier F, Campisi J. Four faces of cellular senescence. *JCB* 2011; 192(4): 547-56

- Romano G, Acunzo M, Garofalo M *et al.* MiR-494 is regulated by ERK1/2 and modulates TRAIL-induced apoptosis in non-small-cell lung cancer through BIM down-regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012; 109(41): 16570-5
- Rushton JJ, Davis LM, Lei W *et al.* Distinct changes in gene expression induced by A-Myb, B-Myb and c-Myb proteins. *Oncogene* 2003; 22: 308–13

S

- Sakura H, Kanei-Ishii C, Nagase T *et al.* Delineation of three functional domains of the transcriptional activator encoded by the c-myb protooncogene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 5758–62
- Sala A, Kundu M, Casella I *et al.* Activation of human B-MYB by cyclins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 532–6
- Sala A, Watson R. B-Myb protein in cellular proliferation, transcription control, and cancer: latest developments. *J Cell Physiol* 1999; 179(3): 245-50
- Sala A. B-MYB, a transcription factor implicated in regulating cell cycle, apoptosis and cancer. *Eur J Cancer* 2005; 41(16):2479-84
- Santilli G, Schwab R, Watson R *et al.* Temperature-dependent modification and activation of B-MYB: implications for cell survival. *J Biol Chem* 2005; 280(16): 15628-34
- Sanz MA, Martin G, Rayón C *et al.*; Spanish PETHEMA Cooperative Group. Uncertain role of increased intensity chemotherapy with high-dose cytarabine in acute promyelocytic leukemia. *Leukemia* 2001; 15(12): 1999-2002

- Saraiya AA, Li W, Wang CC. Transition of a microRNA from repressing to activating translation depending on the extent of base pairing with the target. *PLoS One* 2013; 8(2): e55672
- Saville MK, Watson RJ. The cell cycle regulated transcription factor B-Myb is phosphorylated by cyclin A/Cdk2 at sites that enhance its transactivation properties. *Oncogene* 1998; 17:2679-89
- Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, *et al.* for the German–Austrian acute myeloid leukemia study Group. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2008; 358: 1909–18
- Schneider F, Bohlander SK, Schneider S *et al.* AML1-ETO meets JAK2: clinical evidence for the two hit model of leukemogenesis from a myeloproliferative syndrome progressing to acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2007; 21(10): 2199-201
- Sell S. Leukemia. *Stem cell reviews* 2005; 1(3): 197-205
- Sitzmann J, Noben-Trauth K, Kamano H *et al.* Expression of B-Myb during mouse embryogenesis. *Oncogene* 1996; 12(9): 1889-94
- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, *et al.*, Eds. WHO classification of tumours and haematopoietic and lymphoid tissues IARC 2008; Lyon, France

T

- Tahirov TH, Sato K, Ichikawa-Iwata *et al.* Mechanism of c-Myb-C/EBP beta cooperation from separated sites on a promoter. *Cell* 2002; 108(1): 57-70

- Tanaka Y, Patestos NP, Maekawa T *et al.* B-myb is required for inner cell mass formation at an early stage of development. *J Biol Chem* 1999; 274(40): 28067-70
- Tanner MM, Grenman S, Koul A *et al.* Frequent amplification of chromosomal region 20q12-q13 in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6(5): 1833-39
- Tarasov KV, Testa G, Tarasova YS *et al.* Linkage of pluripotent stem cell-associated transcripts to regulatory gene networks. *Cells Tissues Organs* 2008a; 188(1-2): 31-45
- Tarasov KV, Tarasova YS, Tam WL *et al.* B-MYB is essential for normal cell cycle progression and chromosomal stability of embryonic stem cells. *PLoS One* 2008b; 3(6):e2478
- Tavner FJ. Regulation of mammalian myb gene expression. En: *Myb transcription factors: their role in growth, differentiation and disease*. Frampton J (ed) Kluwer academics Publishers. Birmingham 2004; 201-21
- Tenen DG. Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(2): 89-101
- Thorner AR, Hoadley KA, Parker JS *et al.* In vitro and in vivo analysis of B-Myb in basal-like breast cancer. *Oncogene* 2009; 28(5): 742-51

V

- Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The world health organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 2002; 100: 2292-302

- Vardiman JW, 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. *Blood* 2009; 114: 937-51
- Varol N, Konac E, Gurocak OS *et al.* The realm of microRNAs in cancers. *Mol Biol Rep* 2011; 38(2): 1079-89
- Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 2001; 318: 1931-4

W

- Whitman SP, Maharry K, Radmacher MD *et al.* FLT3 internal tandem duplication associates with adverse outcome and gene- and microRNA-expression signatures in patients 60 years of age or older with primary cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *Blood* 2010; 116(18): 3622-6
- Wichmann C, Quagliano-Lo Coco I, Yildiz O *et al.* Activating c-KIT mutations confer oncogenic cooperativity and rescue RUNX1/ETO-induced DNA damage and apoptosis in human primary CD34+ hematopoietic progenitors. *Leukemia* 2014. [Epub ahead of print]
- Wong RSY. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res* 2011; 30: 87-100

Y

- Yendamuri S, Calin GA. The role of microRNA in human leukemia: a review. *Leukemia* 2009; 23(7): 1257-63
- Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 2003; 17: 3011-6
- Yu M, Gou WF, Zhao S *et al.* Beclin 1 expression is an independent prognostic factor for gastric carcinomas. *Tumour Biol* 2013; 34(2): 1071-83

Z

- Zauli G, Voltan R, di lasio MG *et al.* miR-34a induces the downregulation of both E2F1 and B-Myb oncogenes in leukemic cells. *Clin Cancer Res* 2011; 17(9): 2712-24
- Zhang N, Wang X, Huo Q *et al.* MicroRNA-30a suppresses breast tumor growth and metastasis by targeting metadherin. *Oncogene* 2014; 33(24): 3119-28
- Zhao H, Kalota A, Jin S, Gewirtz AM. The c-myb proto-oncogene and microRNA-15a comprise an active autoregulatory feedback loop in human hematopoietic cells. *Blood* 2009; 113(3): 505-16
- Zhou Y, Feng X, Liu YL *et al.* Down-regulation of miR-126 is associated with colorectal cancer cells proliferation, migration and invasion by targeting IRS-1 via the AKT and ERK1/2 signaling pathways. *PLoS One* 2013; 8(11): e81203
- Zhu W, Griangrande PH, Nervins JR. E2Fs link the control of G1/S and G2/M transcription. *EMBO J* 2004; 23: 4615-26

- Zhu H, Wu H, Liu X *et al.* Regulation of autophagy by a beclin 1-targeted microRNA, miR-30a, in cancer cells. *Autophagy*. 2009; 5(6): 816-23
- Ziebold U, Bartsch O, Marais, R *et al.* Phosphorylation and activation of B-Myb by cyclin A-Cdk2. *Curr Biol* 1997; 7(4): 253-60

Anexos

Tabla anexa I: Resultado del análisis cluster para determinar los miRNAs diferencialmente expresados entre las LMAs y las células CD34+, con un *fold-change* de 2 y un p-valor <0,01

miRNA	p-valor	FC	Expresión en LMA respecto a CD34
hsa-miR-3201_st	9,17296E-04	-42,783	Alto en la LMA
hsa-miR-3128_st	2,49542E-03	-36,143	Alto en la LMA
hsa-miR-4668-5p_st	2,55638E-06	-16,813	Alto en la LMA
hsa-miR-4507_st	7,33590E-05	-12,645	Alto en la LMA
hsa-miR-1281_st	2,89554E-05	-12,051	Alto en la LMA
hsa-miR-494_st	1,46827E-05	-11,075	Alto en la LMA
hsa-miR-4463_st	4,03206E-06	-10,397	Alto en la LMA
hsa-miR-3613-3p_st	9,16750E-06	-10,258	Alto en la LMA
hsa-miR-1268_st	1,73451E-06	-9,534	Alto en la LMA
hsa-miR-4505_st	1,95305E-04	-9,514	Alto en la LMA
hsa-miR-486-5p_st	1,40563E-03	-8,892	Alto en la LMA
hsa-miR-1244_st	1,24274E-03	-8,715	Alto en la LMA
hsa-miR-4529-3p_st	5,47983E-04	-8,497	Alto en la LMA
hsa-miR-1268b_st	1,36259E-05	-8,459	Alto en la LMA
hsa-miR-4530_st	1,07118E-06	-8,235	Alto en la LMA
hsa-miR-4298_st	1,26768E-08	-8,135	Alto en la LMA
hsa-miR-3609_st	8,31617E-07	-8,085	Alto en la LMA
hsa-miR-4492_st	1,48508E-04	-8,000	Alto en la LMA
hsa-miR-1207-5p_st	6,77441E-06	-6,940	Alto en la LMA
hsa-miR-4508_st	3,84575E-07	-6,881	Alto en la LMA
hsa-miR-4433_st	3,91470E-06	-6,813	Alto en la LMA
hsa-miR-4459_st	1,96347E-06	-6,748	Alto en la LMA
hsa-miR-3651_st	7,30582E-05	-6,572	Alto en la LMA
hsa-miR-4467_st	4,64378E-05	-6,526	Alto en la LMA
hsa-miR-1587_st	2,43785E-04	-6,298	Alto en la LMA
hsa-miR-4689_st	2,68392E-04	-6,197	Alto en la LMA
hsa-miR-4763-3p_st	5,28626E-05	-6,117	Alto en la LMA
hsa-miR-3656_st	1,72446E-06	-6,099	Alto en la LMA
hsa-miR-4484_st	1,61384E-03	-5,928	Alto en la LMA
hsa-miR-4687-3p_st	3,18038E-07	-5,838	Alto en la LMA
hsa-miR-4270_st	1,55626E-05	-5,798	Alto en la LMA
hsa-miR-4487_st	1,22898E-05	-5,788	Alto en la LMA
hsa-miR-4649-5p_st	2,57584E-03	-5,710	Alto en la LMA
hsa-miR-762_st	4,31316E-06	-5,707	Alto en la LMA
hsa-miR-3175_st	3,20112E-03	-5,599	Alto en la LMA
hsa-miR-3141_st	6,92624E-06	-5,430	Alto en la LMA
hsa-miR-1275_st	2,04135E-04	-5,324	Alto en la LMA

hsa-miR-1973_st	7,46486E-04	-5,306	Alto en la LMA
hsa-miR-149-star_st	1,03928E-05	-5,289	Alto en la LMA
hsa-miR-378h_st	3,04134E-03	-5,215	Alto en la LMA
hsa-miR-663_st	2,48229E-04	-5,161	Alto en la LMA
hsa-miR-4281_st	2,47042E-04	-5,048	Alto en la LMA
hsa-miR-4651_st	9,10451E-04	-4,907	Alto en la LMA
hsa-miR-4739_st	3,24255E-05	-4,892	Alto en la LMA
hsa-miR-2861_st	8,28706E-06	-4,819	Alto en la LMA
hsa-miR-1469_st	1,55480E-05	-4,763	Alto en la LMA
hsa-miR-1910_st	2,95653E-03	-4,724	Alto en la LMA
hsa-miR-1228- star_st	1,69471E-04	-4,717	Alto en la LMA
hsa-miR-3940-5p_st	7,63678E-05	-4,500	Alto en la LMA
hsa-miR-4497_st	3,61219E-06	-4,474	Alto en la LMA
hsa-miR-1184_st	2,64831E-04	-4,338	Alto en la LMA
hsa-miR-4485_st	3,44564E-03	-4,219	Alto en la LMA
hsa-miR-1908_st	6,97964E-05	-4,151	Alto en la LMA
hsa-miR-1915_st	8,37045E-06	-4,146	Alto en la LMA
hsa-miR-4516_st	5,84005E-05	-4,037	Alto en la LMA
hsa-miR-3196_st	1,77288E-05	-3,916	Alto en la LMA
hsa-miR-638_st	1,07834E-05	-3,857	Alto en la LMA
hsa-miR-4707-5p_st	3,24664E-03	-3,842	Alto en la LMA
hsa-miR-3162-5p_st	1,84468E-03	-3,814	Alto en la LMA
hsa-miR-4745-5p_st	2,78567E-03	-3,720	Alto en la LMA
hsa-miR-4695-5p_st	1,24770E-04	-3,640	Alto en la LMA
hsa-miR-4488_st	2,98655E-05	-3,518	Alto en la LMA
hsa-miR-3178_st	4,73574E-03	-3,414	Alto en la LMA
hsa-miR-4466_st	5,39303E-05	-3,403	Alto en la LMA
hsa-miR-4656_st	1,00726E-03	-3,209	Alto en la LMA
hsa-miR-3619-5p_st	1,10789E-04	-3,092	Alto en la LMA
hsa-miR-4669_st	5,64828E-04	-2,956	Alto en la LMA
hsa-miR-4787-5p_st	3,69250E-06	-2,938	Alto en la LMA
hsa-miR-3911_st	7,48128E-04	-2,716	Alto en la LMA
hsa-miR-4728-5p_st	1,13240E-03	-2,691	Alto en la LMA
hsa-miR-296-3p_st	3,02482E-03	2,175	Bajo en la LMA
hsa-miR-30e-star_st	2,27741E-04	2,236	Bajo en la LMA
hsa-miR-551a_st	1,13719E-06	2,238	Bajo en la LMA
hsa-miR-628-3p_st	5,81424E-05	2,262	Bajo en la LMA
hsa-miR-92a_st	4,74079E-04	2,318	Bajo en la LMA
hsa-miR-671-3p_st	2,66243E-06	2,346	Bajo en la LMA
hsa-miR-34a_st	2,72005E-03	2,397	Bajo en la LMA

hsa-miR-4288_st	1,04118E-05	2,403	Bajo en la LMA
hsa-miR-550a_st	1,40216E-04	2,415	Bajo en la LMA
hsa-miR-497_st	1,91356E-04	2,538	Bajo en la LMA
hsa-miR-484_st	7,62588E-07	2,562	Bajo en la LMA
hsa-miR-520c-5p_st	2,67776E-03	2,566	Bajo en la LMA
hsa-miR-199b-5p_st	1,45789E-04	2,583	Bajo en la LMA
hsa-miR-526b_st	2,15887E-03	2,623	Bajo en la LMA
hsa-miR-431_st	5,90159E-05	2,630	Bajo en la LMA
hsa-miR-378e_st	2,26426E-05	2,631	Bajo en la LMA
hsa-miR-19b-1-star_st	1,80001E-05	2,640	Bajo en la LMA
hsa-miR-671-5p_st	4,86530E-03	2,682	Bajo en la LMA
hsa-miR-485-5p_st	2,30605E-04	2,692	Bajo en la LMA
hsa-miR-4286_st	4,58354E-04	2,711	Bajo en la LMA
hsa-miR-30b-star_st	7,39863E-05	2,742	Bajo en la LMA
hsa-miR-550a-star_st	2,33972E-03	2,783	Bajo en la LMA
hsa-miR-148b_st	1,42725E-03	2,803	Bajo en la LMA
hsa-miR-518d-5p_st	2,92530E-03	2,814	Bajo en la LMA
hsa-miR-381_st	1,46264E-04	2,929	Bajo en la LMA
hsa-miR-526a_st	2,95141E-04	2,970	Bajo en la LMA
hsa-miR-515-3p_st	4,10604E-03	3,037	Bajo en la LMA
hsa-miR-363-star_st	9,49117E-08	3,089	Bajo en la LMA
hsa-miR-523-star_st	4,11286E-03	3,103	Bajo en la LMA
hsa-miR-522-star_st	2,06681E-03	3,130	Bajo en la LMA
hsa-miR-629-star_st	2,79576E-05	3,154	Bajo en la LMA
hsa-miR-505_st	2,58627E-04	3,183	Bajo en la LMA
hsa-miR-518f-star_st	9,33732E-04	3,195	Bajo en la LMA
hsa-miR-99b-star_st	1,09432E-03	3,215	Bajo en la LMA
hsa-miR-491-5p_st	3,14030E-05	3,215	Bajo en la LMA
hsa-miR-517b_st	3,93516E-03	3,344	Bajo en la LMA
hsa-miR-664-star_st	1,18922E-05	3,402	Bajo en la LMA
hsa-miR-142-5p_st	1,94045E-04	3,448	Bajo en la LMA
hsa-miR-370_st	1,57250E-06	3,457	Bajo en la LMA
hsa-miR-24-2-star_st	3,04351E-04	3,497	Bajo en la LMA
hsa-miR-519c-5p_st	3,92340E-03	3,657	Bajo en la LMA
hsa-miR-21_st	2,55613E-03	3,658	Bajo en la LMA
hsa-miR-519a-star_st	7,51507E-04	3,700	Bajo en la LMA
hsa-miR-29b-2-star_st	6,19190E-06	3,795	Bajo en la LMA
hsa-miR-433_st	2,46779E-06	3,829	Bajo en la LMA
hsa-miR-101-star_st	2,40262E-06	3,833	Bajo en la LMA
hsa-miR-493_st	4,87011E-08	3,851	Bajo en la LMA

hsa-miR-486-3p_st	8,31144E-04	3,879	Bajo en la LMA
hsa-miR-500a_st	7,50418E-04	3,904	Bajo en la LMA
hsa-miR-519b-5p_st	4,15129E-04	3,914	Bajo en la LMA
hsa-miR-4317_st	4,88714E-06	3,915	Bajo en la LMA
hsa-miR-518e-star_st	2,22570E-03	4,050	Bajo en la LMA
hsa-miR-192_st	6,24711E-05	4,067	Bajo en la LMA
hsa-miR-500a-star_st	2,28962E-03	4,205	Bajo en la LMA
hsa-miR-382_st	7,81741E-08	4,338	Bajo en la LMA
hsa-miR-20b-star_st	4,85322E-05	4,420	Bajo en la LMA
hsa-miR-502-3p_st	1,60329E-03	4,461	Bajo en la LMA
hsa-miR-26b_st	4,09599E-07	4,475	Bajo en la LMA
hsa-miR-4521_st	1,80535E-07	4,600	Bajo en la LMA
hsa-miR-376c_st	1,28897E-04	4,601	Bajo en la LMA
hsa-miR-411_st	9,32140E-08	4,678	Bajo en la LMA
hsa-miR-516a-5p_st	5,11223E-04	4,727	Bajo en la LMA
hsa-miR-362-5p_st	4,95255E-06	4,745	Bajo en la LMA
hsa-miR-125b-2-star_st	5,74047E-06	4,859	Bajo en la LMA
hsa-miR-196b-star_st	8,99155E-06	4,978	Bajo en la LMA
hsa-miR-146b-3p_st	1,52276E-05	4,979	Bajo en la LMA
hsa-miR-210_st	1,13824E-06	5,048	Bajo en la LMA
hsa-miR-27a-star_st	6,72997E-08	5,152	Bajo en la LMA
hsa-miR-378g_st	7,55135E-10	5,184	Bajo en la LMA
hsa-miR-134_st	1,30804E-07	5,229	Bajo en la LMA
hsa-miR-503_st	7,74070E-06	5,262	Bajo en la LMA
hsa-miR-195_st	3,63888E-07	5,282	Bajo en la LMA
hsa-miR-331-3p_st	8,94491E-06	5,370	Bajo en la LMA
hsa-miR-200c_st	2,01649E-06	5,452	Bajo en la LMA
hsa-miR-301a_st	1,36155E-05	5,485	Bajo en la LMA
hsa-miR-132_st	3,87129E-07	5,628	Bajo en la LMA
hsa-miR-378-star_st	2,34076E-06	5,913	Bajo en la LMA
hsa-miR-512-3p_st	3,71578E-05	5,929	Bajo en la LMA
hsa-miR-337-5p_st	2,43820E-07	6,082	Bajo en la LMA
hsa-miR-30a_st	3,03124E-06	6,219	Bajo en la LMA
hsa-miR-505-star_st	1,38904E-05	6,279	Bajo en la LMA
hsa-miR-330-3p_st	1,51492E-06	6,780	Bajo en la LMA
hsa-miR-542-5p_st	2,71329E-09	6,912	Bajo en la LMA
hsa-miR-517a_st	1,31554E-04	7,393	Bajo en la LMA
hsa-miR-223_st	1,22034E-03	7,564	Bajo en la LMA
hsa-miR-516b_st	1,65312E-04	7,675	Bajo en la LMA

hsa-miR-26a_st	3,18479E-04	7,775	Bajo en la LMA
hsa-miR-3607-5p_st	2,72445E-05	7,818	Bajo en la LMA
hsa-miR-769-5p_st	2,30988E-09	7,826	Bajo en la LMA
hsa-miR-16_st	4,00437E-04	8,325	Bajo en la LMA
hsa-miR-150_st	8,00394E-04	8,354	Bajo en la LMA
hsa-miR-424-star_st	9,82274E-04	8,539	Bajo en la LMA
hsa-miR-18a-star_st	1,43728E-07	8,641	Bajo en la LMA
hsa-miR-145_st	1,40396E-03	8,678	Bajo en la LMA
hsa-miR-409-3p_st	1,39688E-08	8,799	Bajo en la LMA
hsa-miR-379_st	4,20260E-09	9,571	Bajo en la LMA
hsa-miR-140-5p_st	3,96757E-09	9,586	Bajo en la LMA
hsa-miR-143_st	4,54133E-06	9,658	Bajo en la LMA
hsa-miR-324-5p_st	2,13652E-04	9,722	Bajo en la LMA
hsa-miR-421_st	4,42415E-09	9,833	Bajo en la LMA
hsa-miR-378d_st	3,63312E-08	10,326	Bajo en la LMA
hsa-miR-378i_st	1,23112E-04	10,600	Bajo en la LMA
hsa-miR-194_st	1,95346E-08	10,807	Bajo en la LMA
hsa-miR-339-3p_st	2,31036E-05	10,996	Bajo en la LMA
hsa-miR-432_st	7,89157E-09	11,217	Bajo en la LMA
hsa-miR-339-5p_st	9,91226E-05	11,248	Bajo en la LMA
hsa-miR-185_st	5,32297E-04	11,299	Bajo en la LMA
hsa-miR-151b_st	1,39068E-09	11,515	Bajo en la LMA
hsa-miR-128_st	3,65702E-08	11,548	Bajo en la LMA
hsa-miR-378f_st	1,51666E-04	12,576	Bajo en la LMA
hsa-miR-532-5p_st	3,20884E-08	12,706	Bajo en la LMA
hsa-miR-422a_st	8,39601E-09	13,049	Bajo en la LMA
hsa-miR-100_st	1,29499E-08	13,163	Bajo en la LMA
hsa-miR-629_st	6,00248E-09	13,190	Bajo en la LMA
hsa-miR-28-3p_st	4,34064E-07	13,356	Bajo en la LMA
hsa-miR-19a_st	3,46043E-06	13,583	Bajo en la LMA
hsa-miR-22_st	5,48457E-05	13,964	Bajo en la LMA
hsa-miR-487b_st	3,70737E-10	13,999	Bajo en la LMA
hsa-miR-1271_st	3,49825E-10	14,105	Bajo en la LMA
hsa-miR-199b-3p_st	2,44508E-09	14,347	Bajo en la LMA
hsa-miR-874_st	1,85885E-06	15,411	Bajo en la LMA
hsa-miR-181c-star_st	1,10860E-09	15,435	Bajo en la LMA
hsa-miR-151-3p_st	2,79474E-11	16,193	Bajo en la LMA
hsa-miR-28-5p_st	1,31288E-09	17,536	Bajo en la LMA
hsa-miR-181a-2-star_st	3,41647E-10	18,209	Bajo en la LMA
hsa-miR-199a-3p_st	1,91691E-09	18,630	Bajo en la LMA

hsa-miR-625_st	1,19643E-06	18,715	Bajo en la LMA
hsa-miR-378c_st	6,07458E-04	19,322	Bajo en la LMA
hsa-miR-17_st	1,68779E-04	19,387	Bajo en la LMA
hsa-miR-93-star_st	2,02237E-08	20,560	Bajo en la LMA
hsa-miR-106a_st	1,60746E-03	20,986	Bajo en la LMA
hsa-miR-30e_st	1,24783E-08	21,801	Bajo en la LMA
hsa-miR-20a_st	9,25289E-04	22,155	Bajo en la LMA
hsa-miR-18b_st	7,71979E-09	22,530	Bajo en la LMA
hsa-miR-181a-star_st	2,25544E-09	22,766	Bajo en la LMA
hsa-miR-551b_st	7,32510E-11	23,270	Bajo en la LMA
hsa-miR-196b_st	1,98779E-11	24,600	Bajo en la LMA
hsa-miR-361-5p_st	3,42111E-03	25,033	Bajo en la LMA
hsa-miR-10a_st	4,31447E-09	26,025	Bajo en la LMA
hsa-miR-30b_st	5,40028E-07	26,821	Bajo en la LMA
hsa-miR-342-3p_st	1,39307E-04	27,673	Bajo en la LMA
hsa-miR-99b_st	5,55899E-04	29,944	Bajo en la LMA
hsa-miR-29a_st	7,35914E-08	30,863	Bajo en la LMA
hsa-miR-181d_st	1,33534E-04	31,450	Bajo en la LMA
hsa-miR-17-star_st	2,50818E-07	33,695	Bajo en la LMA
hsa-miR-27b_st	8,61461E-10	35,006	Bajo en la LMA
hsa-miR-127-3p_st	1,77174E-10	35,740	Bajo en la LMA
hsa-miR-23b_st	6,52055E-04	41,479	Bajo en la LMA
hsa-miR-106b_st	3,56900E-04	41,712	Bajo en la LMA
hsa-miR-25_st	8,86369E-06	45,312	Bajo en la LMA
hsa-miR-15a_st	2,28843E-05	47,191	Bajo en la LMA
hsa-miR-27a_st	1,93143E-04	49,255	Bajo en la LMA
hsa-miR-130b_st	5,06412E-07	53,039	Bajo en la LMA
hsa-miR-146a_st	2,15197E-04	54,126	Bajo en la LMA
hsa-miR-30c_st	3,08479E-07	54,818	Bajo en la LMA
hsa-miR-19b_st	1,25216E-04	57,575	Bajo en la LMA
hsa-miR-363_st	8,40913E-13	59,937	Bajo en la LMA
hsa-miR-125b_st	1,48977E-05	63,028	Bajo en la LMA
hsa-miR-18a_st	1,57794E-07	66,286	Bajo en la LMA
hsa-miR-151-5p_st	8,75740E-06	68,011	Bajo en la LMA
hsa-miR-130a_st	1,87735E-05	77,220	Bajo en la LMA
hsa-miR-99a_st	6,86598E-12	87,848	Bajo en la LMA
hsa-miR-146b-5p_st	3,98713E-07	92,443	Bajo en la LMA
hsa-miR-126_st	5,04481E-05	93,322	Bajo en la LMA

Anexo II: Relación de Tablas

Introducción

Tabla 1. Clasificación FAB de la LMA. *Pág. 4*

Tabla 2. Clasificación de la OMS para LMA (2008). *Pág. 5*

Tabla 3. Grupos de riesgo citogenético establecidos por el MRC. *Pág. 7*

Tabla 4. Clasificación pronóstica de la ELN. *Pág. 9*

Tabla 5. Clasificación pronóstica de la NCCN. *Pág. 10*

Material y Métodos

Tabla 6. Protocolo de reacción de la transcripción reversa llevada a cabo con el kit de Qiagen miScript. *Pág. 51*

Tabla 7. Protocolo de PCR para el análisis de expresión de *MYBL2* y *GUS*. *Pág. 53*

Tabla 8. Programa de PCR para el análisis de expresión de *MYBL2* y *GUS*. *Pág. 53*

Tabla 9: miScript *primer Assays* para cada uno de los miRNAs cuya expresión ha sido analizada. *Pág. 54*

Tabla 10. Protocolo de PCR para la expresión de miRNAs. *Pág. 54*

Tabla 11. Programa de PCR para el análisis de expresión de miRNAs. *Pág. 54*

Tabla 12. Composición del gel de concentración de y de resolución para preparar un gel de poliacrilamida al 10%. *Pág. 56*

Tabla 13. Composición de la sol. de marcaje de la β -galactosidasa. *Pág. 73*

Resultados

Tabla 14. Resultado del análisis cluster que identificó los miRNAs maduros diferencialmente expresados en las LMAs respecto de las células CD34+, con un fold-change de 10 y un p-valor <0,001. *Pág. 79*

Tabla 15. Expresión de los miRNAs escogidos para la validación de los *arrays* de expresión en células CD34+ y en 52 muestras de LMA. Los datos están expresados en unidades de $2^{-\Delta Ct}$ multiplicadas por 1000. *Pág. 84*

Tabla 16. Expresión de los miR-29a y miR-30 en células CD34+ y LMA. Los datos están expresados en unidades de $2^{-\Delta Ct} \times 1000$. *Pág. 86*

Tabla 17. Expresión de *MYBL2* ($2^{-\Delta Ct}$) en función de las características clínico-biológicas de los pacientes. *Pág. 100*

Tabla 18. Expresión del miR-30a ($2^{-\Delta Ct}$) en función de las características clínico-biológicas de los pacientes Los datos están expresados en unidades de $2^{-\Delta Ct}$ multiplicadas por 1000. *Pág. 101*

Tabla 19. Resultado tras la terapia de inducción con quimioterapia intensiva en 209 pacientes de LMA. *Pág. 102*

Tabla 20. Análisis multivariante para la SLE y la SLR en toda la serie de pacientes, en pacientes de cariotipo de riesgo intermedio y en pacientes menores de 60 años. *Pág. 106*

Tabla 21. Resultado tras la terapia de inducción con quimioterapia intensiva según la expresión del miR-30a en 161 pacientes de LMA. *Pág. 107*

Anexo III: Relación de Figuras

Introducción

Figura 1. Evolución y estructura de los genes *MYB*. *Pág. 16*

Figura 2. Biogénesis y mecanismo de acción de los miRNAs. *Pág. 23*

Figura 3. Mecanismos de regulación de la expresión génica por miRNAs. *Pág. 25*

Figura 4. miRNAs como oncogenes o genes supresores de tumores. *Pág. 26*

Figura 5. miRNAs que participan en la regulación de la hematopoyesis. *Pág. 28*

Material y Métodos

Figura 6. Análisis de ciclo celular por citometría de flujo de células KG1. *Pág. 64*

Figura 7. Reacciones químicas del ensayo de MTS. *Pág. 66*

Figura 8. Ensayo de apoptosis con detección de Anexina V. *Pág. 70*

Resultados

Figura 9. Expresión de *MYBL2* en células CD34+ y en LMA. *Pág. 77*

Figura 10. Análisis de componentes principales de los *arrays* de expresión de miRNAs. *Pág. 78*

Figura 11. Análisis cluster obtenido a partir de los datos de expresión de los *arrays* de miRNAs. *Pág. 82*

Figura 12. Correlación entre el FC obtenido en los *arrays* y en la validación por qRT-PCR. *Pág. 84*

Figura 13. Expresión de los miR-29a y miR-30 en células CD34+ y en LMA. *Pág. 85*

Figura 14. Expresión de *MYBL2* según la expresión de los miR-30a/b/c categorizada en alta o baja. *Pág. 87*

Figura 15. Expresión de *MYBL2* y miR-30a/b/c en CD34+ y según el % de blastos en MO. *Pág. 88*

Figura 16. Estudio de la expresión de *MYBL2* y los miR-30a/b/c en cultivo celular KG1 sin cambio de medio para alcanzar la saturación y muerte con el tiempo. *Pág. 90*

Figura 17. Expresión de *MYBL2* y el miR-30a en las fases del ciclo celular. *Pág. 91*

Figura 18. Western blot para la identificación de *MYBL2*. *Pág. 92*

Figura 19. Actividad relativa de luciferasa. *Pág. 93*

Figura 20. Viabilidad celular. *Pág. 94*

Figura 21. Ensayos de incorporación de BrdU. *Pág. 95*

Figura 22. Estudio de la apoptosis. *Pág. 96*

Figura 23. Ensayo de β -galactosidasa. *Pág. 97*

Figura 24. Expresión de *MYBL2* en función del riesgo citogenético. *Pág. 98*

Figura 25. Análisis de Kaplan-Meier para la SLE según la expresión de *MYBL2*. *Pág. 104*