



# **Leucemia infantil de células B: preleucemia, estrés inmunológico y prevención**

**Ana Casado García**

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA - CSIC**

Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer

Salamanca, 2022



El trabajo recogido en la presente tesis doctoral ha dado lugar a la elaboración de 2 artículos científicos:

- **Ana Casado-García**, Marta Isidro-Hernández, Ninad Oak, Andrea Mayado, Christine Mann-Ran, Javier Raboso-Gallego, Silvia Alemán-Arteaga, Alexandra Buhles, Dario Sterker, Elena G. Sánchez, Jorge Martínez-Cano, Oscar Blanco, Alberto Orfao, Diego Alonso-López, Javier De Las Rivas, Susana Riesco, Pablo Prieto-Matos, África González-Murillo, Francisco Javier García Criado, María Begoña García Cenador, Thomas Radimerski, Manuel Ramírez-Orellana, César Cobaleda, Jun J. Yang, Carolina Vicente-Dueñas, Andreas Weiss, Kim E. Nichols, Isidro Sánchez-García; *Transient Inhibition of the JAK/STAT Pathway Prevents B-ALL Development in Genetically Predisposed Mice*. **Cancer Research** 15 March 2022; 82 (6): 1098–1109.  
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-21-3386>
- Carolina Vicente-Dueñas, Stefan Janssen, Marina Oldenburg, Franziska Auer, Inés González-Herrero, **Ana Casado-García**, Marta Isidro-Hernández, Javier Raboso-Gallego, Philipp Westhoff, Aleksandra A. Pandyra, Daniel Hein, Katharina L. Gösling, Diego Alonso-López, Javier De Las Rivas, Sanil Bhatia, Francisco Javier García-Criado, María Begoña García-Cenador, Andreas P. M. Weber, Karl Köhrer, Julia Hauer, Ute Fischer, Isidro Sánchez-García, Arndt Borkhardt; *An intact gut microbiome protects genetically predisposed mice against leukemia*. **Blood** 2020; 136 (18): 2003–2017.  
<https://doi.org/10.1182/blood.2019004381>



**D. Isidro Sánchez García**, investigador científico del Consejo Superior de investigaciones Científicas (CSIC) en el Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer (IBMCC) de Salamanca,

Y **Dña. Carolina Vicente Dueñas**, investigadora Miguel Servet del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (CP1119/00024) perteneciente al grupo de pediatría clínica del Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL),

**CERTIFICAN:**

Que el trabajo titulado **“Leucemia infantil de células B: preleucemia, estrés inmunológico y prevención”**, que presenta la doctoranda **Dña. Ana Casado García**, ha sido realizado bajo su dirección en el Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, y reúne, a su juicio, originalidad y contenidos suficientes para ser presentado ante el correspondiente tribunal y optar al título de doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, y a los efectos oportunos, expiden el presente certificado en Salamanca a 20 de abril de 2022.



Durante la realización de este trabajo doctoral, Ana Casado García ha disfrutado de una ayuda para la contratación predoctoral cofinanciada por el FSE -Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León (CSI067-18).

La investigación en el grupo de Carolina Vicente-Dueñas está parcialmente financiada por el Proyecto "PI17/00167" y el contrato "Miguel Servet" (CPII19/00024-AES 2017-2020), financiados por el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) y cofinanciados por la Unión Europea (FEDER/FSE) "Una manera de hacer Europa"/ "El FSE invierte en tu futuro". La investigación en el grupo de Isidro Sánchez-García está parcialmente financiada por FEDER, por MINECO (SAF2015-64420-R y RTI2018-093314-B-I00, PRE2019-088887), por la Junta de Castilla y León (UIC-017, CSI001U16, CSI234P18, y CSI144P20), por la fundación Unoentrecielmil (CUNINA Project), por la Fundación Científica de la Asociación Española Contra el Cáncer (PRYCO211305-SANC) y por el *National Institute of Health* (NIH, 1R01CA201380-01A1). ISG lab es un miembro de *EuroSyStem* y de *DECIDE Network* financiado por la *European Union under the FP7 program*. CVD e ISG han sido financiados por *The German Federal Office for Radiation Protection (BfS)-Germany* (FKZ: 3618S32274).



# ÍNDICE



<b>ABREVIATURAS</b>	<b>- 3 -</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>- 7 -</b>
<b>1. LA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE CÉLULAS B</b>	<b>- 7 -</b>
<b>2. ¿CÓMO SURGE LA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE TIPO B?</b>	<b>- 16 -</b>
<b>3. LA PREVENCIÓN DE LA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA</b>	<b>- 24 -</b>
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>- 35 -</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>- 41 -</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>- 47 -</b>
<b>1. LA PREDISPOSICIÓN GENÉTICA A LA LLA-B DEFINE UN MICROBIOMA ESPECÍFICO EN RATONES SANOS Y ENFERMOS</b>	<b>- 47 -</b>
1.1. EL CAMBIO DE LOS RATONES A UN AMBIENTE DE EXPOSICIÓN A INFECCIÓN ALTERA LA COMPOSICIÓN DE SU MICROBIOMA	- 48 -
1.2. LA PREDISPOSICIÓN GENÉTICA DEFINE UN MICROBIOMA INTESTINAL ESPECÍFICO EN LOS RATONES	- 55 -
1.3. EL TRATAMIENTO CON ANTIBIÓTICO EN RATONES <i>PAX5<sup>+/-</sup></i> MODIFICA EL MICROBIOMA INTESTINAL PERO NO PREVIENE EL DESARROLLO DE LA LEUCEMIA EN CONDICIONES DE EXPOSICIÓN A INFECCIÓN	- 63 -
1.4. EL DESARROLLO DE LLA-B ASOCIADO A LA EXPOSICIÓN A PATÓGENOS EN RATONES <i>PAX5<sup>+/-</sup></i> ES INDEPENDIENTE DE LA ACCIÓN O PRESENCIA DE CÉLULAS T	- 74 -
1.5. LA ELIMINACIÓN DEL MICROBIOMA INTESTINAL PROMUEVE EL DESARROLLO DE LLA-B EN RATONES <i>PAX5<sup>+/-</sup></i> EN AUSENCIA DE ESTÍMULO INFECCIOSO	- 77 -
1.6. LA COMPOSICIÓN DEL MICROBIOMA INTESTINAL ES DIFERENTE EN RATONES <i>PAX5<sup>+/-</sup></i> SANOS Y RATONES <i>PAX5<sup>+/-</sup></i> QUE DESARROLLAN LA LEUCEMIA	- 79 -
1.7. LA DISBIOSIS EN LOS RATONES <i>PAX5<sup>+/-</sup></i> SE TRADUCE EN UN METABOLOMA DISTINTO	- 81 -
<b>2. LA INHIBICIÓN TRANSITORIA DE LA VÍA JAK/STAT PREVIENE EL DESARROLLO DE LA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA DE CÉLULAS B EN RATONES CON PREDISPOSICIÓN GENÉTICA</b>	<b>- 85 -</b>

## ÍNDICE

---

2.1. ESTUDIO PILOTO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE RUXOLITINIB	- 86 -
2.2. LA INHIBICIÓN DE LA VÍA JAK/STAT SE DIRIGE ESPECÍFICAMENTE A LAS CÉLULAS B SUSCEPTIBLES DE TRANSFORMACIÓN MALIGNA IN VIVO	- 91 -
2.3. LA INHIBICIÓN TRANSITORIA DE LA VÍA JAK/STAT SE DIRIGE A LAS CÉLULAS PRELEUCÉMICAS A TRAVÉS DE UN MECANISMO CELULAR AUTÓNOMO	- 99 -
2.4. LA INHIBICIÓN TRANSITORIA DE LA VÍA JAK/STAT PREVIENE EL DESARROLLO DE LLA-B EN RATONES <i>PAX5<sup>+/-</sup></i>	- 105 -
2.5. LA EXPRESIÓN DE LA MUTACIÓN JAK3 <sup>V670A</sup> RESTRINGIDA AL LINAJE B CAUSA LLA-B EN RATONES CON UNA LATENCIA MUY CORTA	- 114 -
<b>3. EL TRATAMIENTO CON POLY(I:C) NO MITIGA EL DEFECTO INMUNOLÓGICO INDUCIDO POR LA DEFICIENCIA DE <i>PAX5</i> EN LOS RATONES NI DISMINUYE LA INCIDENCIA DE LEUCEMIA</b>	<b>- 120 -</b>
3.1 LA ADMINISTRACIÓN DE POLY(I:C) TIENE UN EFECTO ACTIVADOR DE LA RESPUESTA INMUNITARIA.	- 120 -
3.2 LA ADMINISTRACIÓN DE POLY(I:C) EN EDADES TEMPRANAS NO PREVIENE EL DESARROLLO DE LLA-B EN RATONES <i>PAX5<sup>+/-</sup></i>	- 124 -
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>- 138 -</b>
1. EL MICROBIOMA COMO PIEZA CLAVE EN EL DESARROLLO DE LA LLA-B	- 138 -
2. LA LLA-B INFANTIL COMO ENFERMEDAD PREVENIBLE	- 141 -
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>- 150 -</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>- 156 -</b>
1. MODELOS ANIMALES UTILIZADOS	- 156 -
2. GENOTIPADO DE RATONES	- 159 -
3. ESTUDIOS HISTOLÓGICOS	- 162 -
4. TRATAMIENTO CON ANTIBIÓTICOS	- 162 -
5. FORMULACIÓN DEL PIENSO CON RUXOLITINIB.	- 162 -
6. ESTUDIO FARMACOCINÉTICO DE RUXOLITINIB EN SANGRE	- 163 -
7. TRATAMIENTO CON POLY(I:C)	- 163 -

<b>8. TRASPLANTE DE MÉDULA ÓSEA</b>	<b>- 164 -</b>
<b>9. ESTUDIO DEL METABOLOMA</b>	<b>- 164 -</b>
<b>10. CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE CITOQUINAS EN EL SUERO</b>	<b>- 165 -</b>
<b>11. EXTRACCIÓN DE ADN</b>	<b>- 166 -</b>
<b>12. EXTRACCIÓN DE ARN</b>	<b>- 167 -</b>
<b>13. EXTRACCIÓN DEL ADN DE HECES DE RATONES</b>	<b>- 167 -</b>
<b>14. SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DEL ARN RIBOSÓMICO 16S</b>	<b>- 167 -</b>
<b>15. ANÁLISIS CELULAR MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO</b>	<b>- 170 -</b>
<b>16. ANÁLISIS DE CLONALIDAD DE INMUNOGLOBULINAS (RECOMBINACIÓN VDJ)</b>	<b>- 172 -</b>
<b>17. PREPARACIÓN DE LAS LIBRERÍAS Y SECUENCIACIÓN DEL ADN</b>	<b>- 173 -</b>
<b>18. SECUENCIACIÓN DEL GENOMA COMPLETO (WGS)</b>	<b>- 174 -</b>
<b>19. ARRAYS DE EXPRESIÓN</b>	<b>- 175 -</b>
<b>20. ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO (GSEA)</b>	<b>- 175 -</b>
<b><u>ANEXOS</u></b>	<b><u>- 182 -</u></b>
<b><u>BIBLIOGRAFÍA</u></b>	<b><u>- 190 -</u></b>







## **ABREVIATURAS**



## ABREVIATURAS

<b>AB</b>	antibióticos
<b>ADN</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	ADN complementario
<b>APC</b>	<i>Allophycocyanin</i> , alofococianina
<b>ARN</b>	ácido ribonucleico
<b>ARNbc</b>	ácido ribonucleico bicatenario
<b>ARNr</b>	ácido ribonucleico ribosomal
<b>ASV</b>	<i>amplicon sequence variants</i> , variantes de secuencia del amplicón
<b>BCR</b>	<i>B cell receptor</i> , receptor de células B
<b>bid</b>	<i>bid in die</i>
<b>CF</b>	<i>conventional facility</i> , animalario convencional
<b>CNV</b>	<i>copy number variants</i> , variaciones en el número de copias
<b>dNTPs</b>	desoxirribonucleótidos
<b>FCS</b>	<i>fetal calf serum</i> , suero de ternera fetal
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i> , Administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos
<b>FDR</b>	<i>false discovery rate</i> , tasa de descubrimientos falsos
<b>FITC</b>	<i>fluorescein isoTioCyanate</i> , Isotiocianato de fluoresceína
<b>GC</b>	<i>gas chromatography</i> , cromatografía de gases
<b>GC-MS</b>	<i>gas chromatography -mass spectrometry</i> , cromatografía de gases y espectrometría de masas
<b>GEO</b>	<i>Gene Expression Omnibus</i>
<b>GFP</b>	<i>green fluorescence protein</i> , proteína fluorescente verde
<b>GSEA</b>	<i>gene-set enrichment analysis</i> , análisis de enriquecimiento de grupos de genes
<b>GWAS</b>	<i>Genome-wide Association Study</i> , estudios de asociación del genoma completo
<b>Gy</b>	Gray
<b>IFN</b>	interferón
<b>Ig</b>	inmunoglobulina
<b>IL</b>	interleuquina
<b>LC/MS-MS</b>	<i>liquid chromatography-tandem mass spectrometry</i> , cromatografía líquida seguida de espectrometría de masas en tándem
<b>LLA-B</b>	leucemia linfoblástica aguda de células B

## ABREVIATURAS

---

<b>LLA-pB</b>	leucemia linfoblástica aguda de células B precursoras
<b>LLA-T</b>	leucemia linfoblástica aguda de células T
<b>MO</b>	médula ósea
<b>MPW</b>	<i>millipore water</i>
<b>NCBI</b>	<i>National Center for Biotechnology Information</i> , Centro Nacional para la Información Biotecnológica
<b>NGS</b>	<i>NOD scid gamma mouse</i>
<b>NL</b>	nódulos linfáticos
<b>OMS</b>	Organización Mundial de Salud
<b>pb</b>	pares de bases
<b>PBS</b>	<i>phosphate-buffered saline</i> , tampón fosfato salino
<b>PCA</b>	<i>principal component analysis</i> , análisis de componentes principales
<b>PCR</b>	<i>polymerase chain reaction</i> , reacción en cadena de la polimerasa
<b>PE</b>	<i>phycoerythrin</i> , ficoeritrina
<b>poly(I:C)</b>	<i>Polyinosinic:polycytidylic acid</i> , ácido polinosínico:policitidílico
<b>SNC</b>	sistema nervioso central
<b>SNP</b>	<i>single nucleotide polymorphism</i> , polimorfismo de nucleótido único
<b>SNV</b>	<i>single nucleotide variantion</i> , variante de nucleótido único
<b>SP</b>	sangre periférica
<b>SPF</b>	<i>specific-pathogen free</i> , libre de patógenos específicos
<b>TCR</b>	<i>T cell receptor</i> , receptor de células T
<b>TLR</b>	<i>Toll-like receptor</i> , receptor tipo <i>Toll</i>
<b>TNF</b>	<i>tumor necrosis factor</i> , factor de necrosis tumoral
<b>VAF</b>	<i>variant allele fraction</i> , fracción de variantes alélicas
<b>VDJ</b>	segmentos V (variable), D (diverso) y J ( <i>joining</i> , unión)
<b>WBC</b>	<i>white blood cell count</i> , recuento de células blancas de la sangre
<b>WES</b>	<i>whole exome sequencing</i> , secuenciación del exoma completo
<b>WGS</b>	<i>whole genome sequencing</i> , secuenciación del genoma completo
<b>WT</b>	<i>wild type</i> , silvestre





# INTRODUCCIÓN



---

# INTRODUCCIÓN

## 1. La leucemia linfoblástica aguda de células B

### 1.1. Definición y características de la leucemia linfoblástica aguda de células B (LLA-B)

Las leucemias agudas son un grupo de desórdenes clonales malignos que implican uno o más linajes de células hematopoyéticas<sup>1</sup>. La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica estas enfermedades en leucemias mieloides, linfoides, mixtas o indiferenciadas, en función del origen de las células hematopoyéticas implicadas<sup>1,2</sup>.

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es un cáncer producido por la acumulación de células linfoides inmaduras en la médula ósea<sup>3</sup>, que proliferan rápidamente y de forma descontrolada impidiendo la correcta hematopoyesis<sup>4</sup>. En el caso de la leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B (LLA-pB) se produce la acumulación en la médula ósea de células en estadio pre-B y pro-B como consecuencia de un bloqueo en la diferenciación de las células B<sup>5</sup>. Estas células malignas pueden entrar en la circulación a través de la sangre, permitiendo así la invasión de otros tejidos preferentemente linfoides, como los nódulos linfáticos y el bazo, pero también órganos y tejidos no linfoides, como el hígado y el sistema nervioso central (SNC)<sup>5</sup>. De esta manera, y como resultado de la incorrecta hematopoyesis y la invasión de otros tejidos, la mayoría de pacientes sufren de neutropenia, anemia, sangrados abundantes, dificultad para cicatrizar, infecciones recurrentes, fiebre, esplenomegalia, inflamación de los nódulos linfáticos<sup>5,6</sup> y otros síntomas no hematológicos como palidez, fatiga, erupciones en la piel y hepatomegalia<sup>4</sup>.

A pesar de la alta variabilidad de síntomas, causas y edad de aparición de esta enfermedad sí que se definen varios factores clave de riesgo y de pronóstico (**Tabla 1**). Entre ellos está el sexo (siendo diagnosticados más hombres que mujeres, con una proporción de 1,4:1<sup>7</sup>), la edad, el recuento de células blancas

## INTRODUCCIÓN

de la sangre (WBC, del inglés *white blood cell count*) y el inmunofenotipo, teniendo un peor pronóstico las leucemias en hombres, de mayor edad, con un mayor WBC y con fenotipo T<sup>7,8</sup>. También suele incluirse en el pronóstico la presencia de enfermedad extramedular<sup>4</sup>, los signos clínicos en el diagnóstico y la respuesta temprana al tratamiento<sup>6</sup>.

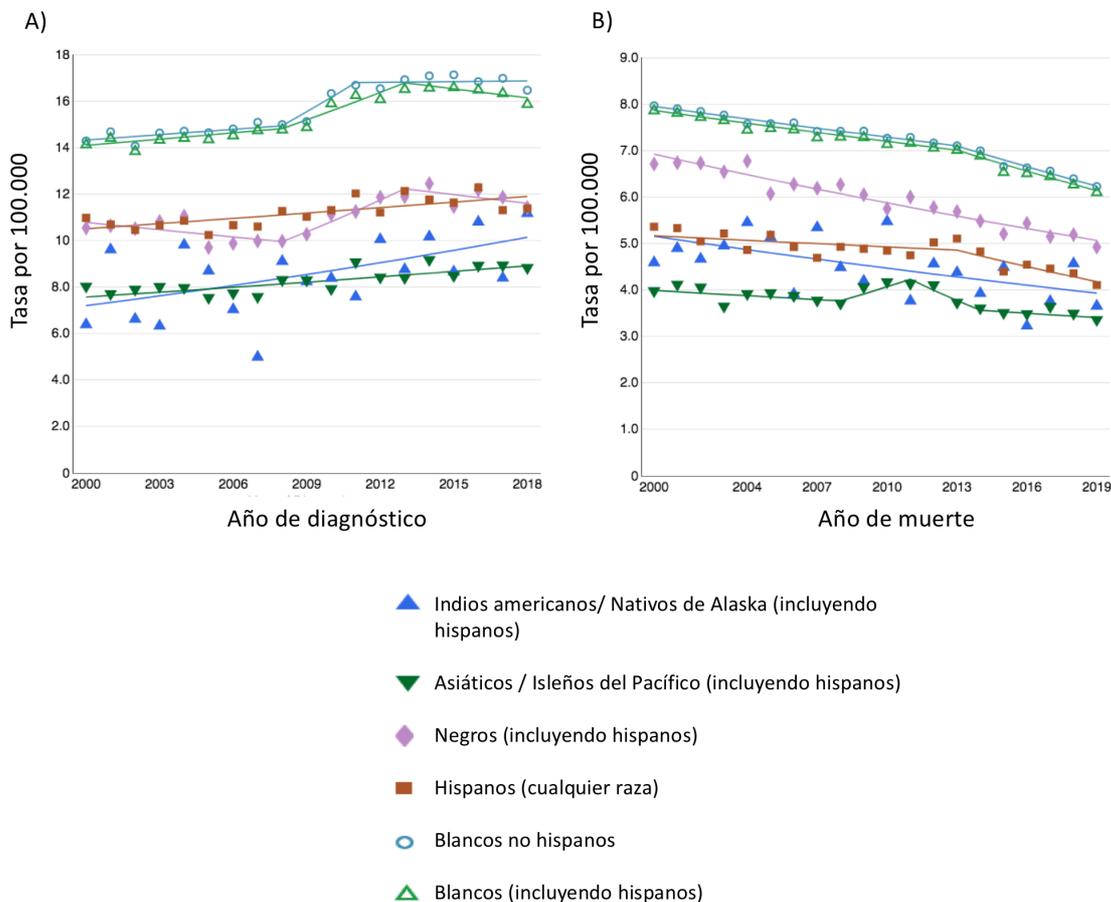
*Tabla 1- Factores de riesgo y su pronóstico en la leucemia linfática aguda. Adaptado de Inaba y Mulligan, 2020.*

Factor	Mejor pronóstico	Peor pronóstico
Paciente y clínica		
Edad	1 a <10 años	<1 o >10 años
Sexo	Mujer	Hombre
Raza	Asiático, caucásico	Afroamericano, hispanico
Síndrome de Down	No	Sí
WBC	<50 ×10 <sup>9</sup> /L	≥50 ×10 <sup>9</sup> /L
Inmunofenotipo	LLA-B	LLA-T
Citogenética y genética		
	Alta hiperdiploidía (51-65 cromosomas)	Hipodiploidía (<44 cromosomas)
	Traslocación <i>ETV6-RUNX1</i>	Reordenamientos <i>KTM2A</i>
	Reordenamientos <i>NUMT1</i>	Traslocación <i>BCR-ABL1</i> (cromosoma Ph)
		<i>Ph-like</i>
		Traslocación <i>TCF3-HLF</i>
		Reordenamientos <i>MEF2d</i>
		Amplificación intracromosómica del 21
		Reordenamientos <i>BCL2</i> o <i>MYC</i>

### 1.2. Incidencia de la LLA-B

La leucemia es un cáncer extendido por todos los grupos de edad y toda la geografía. El programa de vigilancia del Instituto Nacional de Cáncer de EEUU (NCI, del inglés *National Cancer Institute*) estimó 61.090 casos de leucemia diagnosticados en 2021 en todo el mundo, lo que supone un 3,2% del total de casos de cáncer<sup>9</sup>. A pesar de su amplia distribución, la incidencia de leucemia es mayor en los países desarrollados y la tasa de mortalidad es superior en los

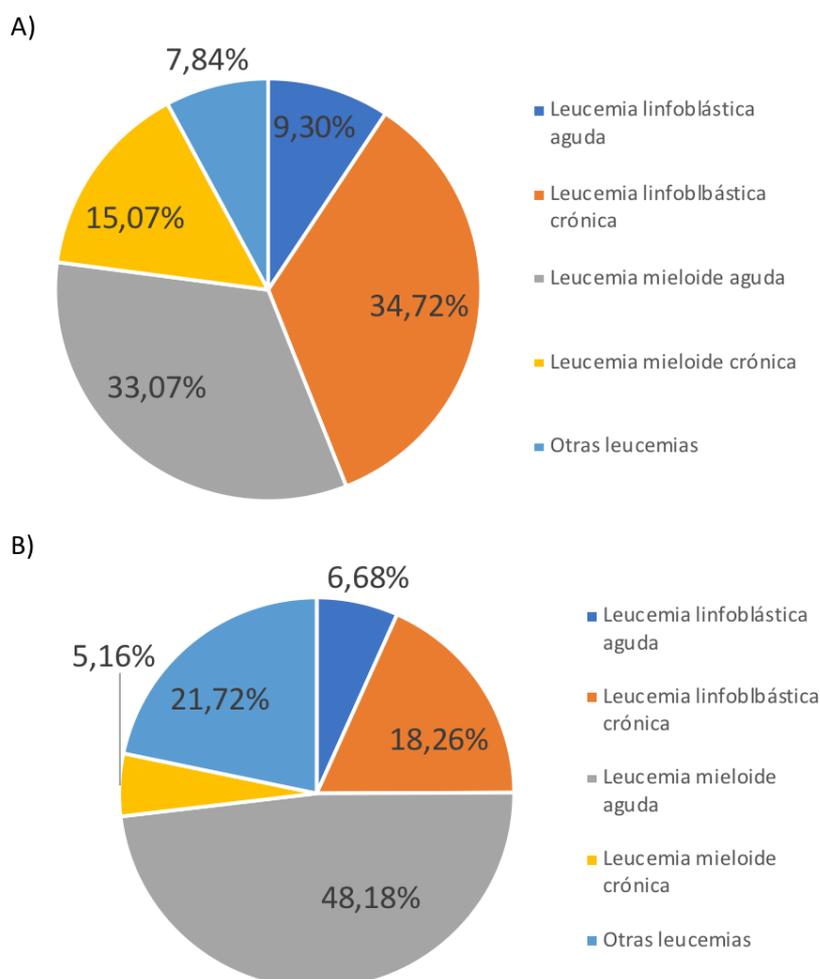
países en desarrollo<sup>1</sup>. En la **Figura 1** se muestra la distribución de los casos de leucemia y de mortalidad asociada a las distintas razas.



**Figura 1– Incidencia y tasa de mortalidad asociadas a la leucemia, ajustadas por años (2000 a 2019).** **A)** Incidencia de leucemia ajustada por años entre 2000 y 2018. Datos agrupados por raza, teniendo en cuenta ambos sexos y todas las edades. **B)** Tasa de mortalidad asociada a la leucemia por año entre 2000 y 2019. Agrupadas por raza teniendo en cuenta ambos sexos y todas las edades. Fuente: SEER Explorer del programa de vigilancia (SRP, del inglés Surveillance Research Program) de la Sección De Control De Cáncer Y Ciencias De La Población (DCCPS, del inglés Division Of Cancer Control And Population Sciences) del Instituto Nacional De Cáncer de EEUU (NCI, del inglés, National Cancer Institute).

En concreto, la LLA representa un 9,30% de los casos de leucemia diagnosticados cada año, un total de 5.690 casos en 2021 según la estimación. De ellos, se calcula que 3.000 fueron en hombres y 2.690 en mujeres<sup>9</sup> (**Figura 2**). Se estimó en ese mismo año unas 1.580 muertes debido a esa enfermedad, siendo también mayor el porcentaje en hombres (56,96% de las muertes por LLA frente al 43,03% en mujeres)<sup>9</sup>.

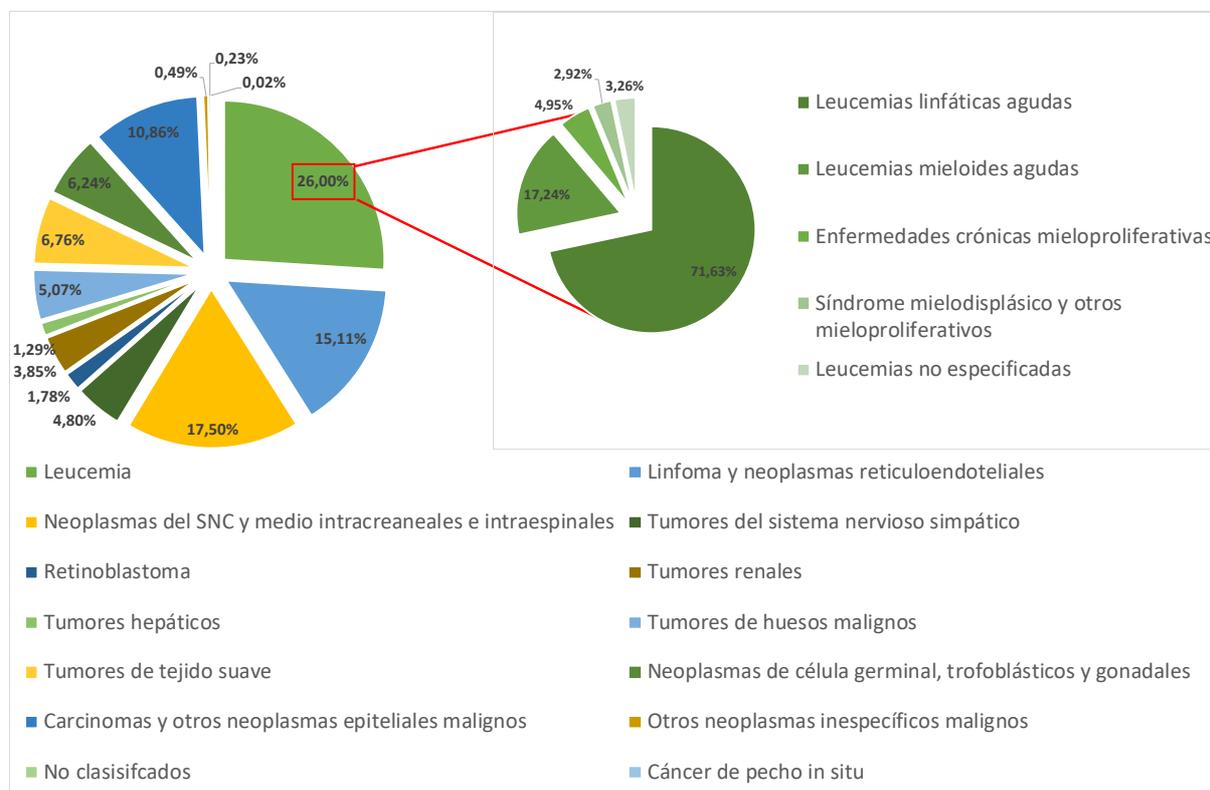
## INTRODUCCIÓN



**Figura 2– Distribución de los tipos de leucemia y mortalidad asociada. A)** Incidencia de cada tipo de leucemia. **B)** Mortalidad estimada asociada a cada tipo de leucemia en el año 2021. Fuente: *Cancer Facts & Figures 2021* de la American Cancer Society.

En cuanto a su distribución por edades, diferentes tipos de leucemias se acumulan en distintas franjas de edad<sup>1</sup>. Las grandes diferencias que hay entre la leucemia diagnosticada en niños y en adultos ha llevado a considerar la enfermedad como dos entidades diferentes en función de la edad del paciente. De esta manera, la leucemia en adolescentes y adultos conforma una entidad separada, y estas leucemias son típicamente crónicas y mieloides y con causas más específicas<sup>10</sup>. Sin embargo, se calcula que un 4,8% de los casos totales de leucemia y linfomas son diagnosticados en pacientes menores de 20 años<sup>1</sup>, conformando una entidad individual y separada, la leucemia infantil. En concreto, la LLA es el cáncer pediátrico más común, siendo diagnosticada en el 28% de los niños con cáncer en los EEUU<sup>4,9,11</sup> (**Figura 3**). De hecho, el pico de aparición de la LLA infantil se sitúa entre los 2 y los 5 años<sup>12</sup>. Entre la población

infantil, el cáncer es la segunda causa de mortalidad en este rango de edad. Fijándonos específicamente en la mortalidad asociada a la LLA infantil, esta enfermedad es considerada la segunda causa de mortalidad por cáncer entre los niños<sup>13</sup>.



**Figura 3– Incidencia de cánceres pediátricos.** Se muestra el porcentaje de casos asociados a cada tipo de cáncer en población pediátrica. La distribución de tipos de leucemia en niños se amplía en el gráfico de la derecha.

Durante las dos últimas décadas, la incidencia de LLA está aumentando un 1% por año<sup>11</sup> en paralelo con la adopción del estilo de vida moderno, sugiriendo que los factores causales son cada vez más prevalentes en nuestra sociedad<sup>10</sup>. Pese a los grandes conocimientos en la distribución de los casos de leucemia en general y de la LLA en particular, los factores responsables de estas diferencias aún continúan siendo desconocidos. La estructura social y financiera de las distintas regiones, así como la exposición a factores ambientales, han sido algunos de los factores más estudiados en este sentido<sup>1</sup>.

### 1.3. Tratamiento de la leucemia y supervivencia actuales

El tratamiento actual contra la leucemia comprende tres fases: inducción de la remisión (cuatro semanas de fármacos quimioterapéuticos para la entrada en remisión, antibióticos para paliar infecciones y tratamiento profiláctico para el SNC), consolidación o intensificación (seis a ocho semanas de combinación de quimioterapéuticos para consolidar la remisión y ácido fólico para rescatar la toxicidad) y mantenimiento (de dieciocho a treinta meses, una terapia de baja intensidad pero clave para la remisión completa)<sup>4,6,8</sup>.

Sin embargo, en los últimos años se están incorporando nuevas terapias más específicas que mejoran la supervivencia y calidad de vida de los pacientes y reducen el número de recaídas. Son ejemplos la terapia dirigida y la inmunoterapia, aunque sólo están disponibles en algunos casos<sup>6,8,14</sup>. Gracias a los avances en la investigación y la oncología de las últimas décadas, la tasa de curación tras una quimioterapia combinada contra la LLA está en torno al 85-90% en niños<sup>7,15</sup>, siendo en adultos de tan solo un 40%<sup>5</sup>. Sin embargo, el tratamiento tiene una elevada toxicidad y secuelas a largo plazo<sup>16</sup>. Además, un gran porcentaje de niños tienen recaídas o acaban con el tiempo sucumbiendo a otro cáncer derivado de la terapia contra la leucemia<sup>15</sup>. Actualmente, el objetivo de la investigación clínica se centra en mejorar los tratamientos y reducir sus efectos secundarios<sup>4</sup>.

### 1.4. Causas, factores de riesgo y factores causales del desarrollo de LLA-B

La leucemia es uno de los mejores ejemplos de enfermedad que aparece como resultado de la relación entre genética y ambiente. La cooperación entre una predisposición o susceptibilidad genética y un factor ambiental que dispara la aparición de la enfermedad son clave, pero también influyen moduladores del riesgo como la edad, el estilo de vida y la raza<sup>1,5,15,16</sup>.

Gracias a diversos estudios de perfil genético se han identificado distintas alteraciones genéticas de la línea germinal o adquiridas que predisponen al

portador a sufrir leucemia<sup>1,8,17</sup>. También se han determinado, por estudios de asociación del genoma completo (GWAS, del inglés *genome-wide association studies*), la presencia de polimorfismos de nucleótido único (SNPs, de las siglas inglés *single nucleotide polymorfism*) de efecto aditivo no codificante, que pueden aumentar la posibilidad de sufrir leucemia por acción indirecta sobre otra proteína o gen<sup>8,10,15,18</sup>. Estos avances han permitido relacionar algunos SNPs y otras mutaciones con un peor pronóstico en la leucemia y cambios en la respuesta al tratamiento o en la toxicidad de este<sup>19</sup>.

Son muy numerosos y extensos los estudios de la constitución genómica de pacientes con leucemia, los cuales han conseguido vincular algunas mutaciones genéticas y anomalías cromosómicas con un riesgo aumentado de desarrollar esta enfermedad<sup>17,20</sup>. Estos estudios han permitido identificar la evolución clonal y defectos en la reparación del ADN como procesos clave para el inicio de la leucemia<sup>1</sup>. Además, existen variantes genéticas que producen otras enfermedades pero que a su vez incrementan el riesgo de sufrir leucemia aguda. Algunos ejemplos de ello son los síndromes constitucionales raros, síndromes de cáncer familiar asociados a LLA, SNPs no codificantes o variantes germinales de mutaciones no silenciosas que dan riesgo esporádico a LLA<sup>8</sup>. Algunos síndromes asociados a desórdenes genéticos en los que el riesgo a sufrir leucemia se encuentra aumentado son el síndrome de Down, el síndrome de Li-Fraumeni, el síndrome de Shwachman, neurofibromatosis tipo 1, anemia de Fanconi y el síndrome de Bloom<sup>10,21-27</sup>. Los pacientes de síndromes autoinmunes heredados también tienen una predisposición a desarrollar cánceres hematológicos. Ejemplos de ello son el síndrome de Wiskott-Aldrich y la agammaglobulinemia de Bruton<sup>20</sup>.

Aunque los casos de herencia directa de leucemia son raros, se han descrito mutaciones en tres genes que pueden ser heredados de forma autosómica dominante y que potencialmente desembocan en el desarrollo de leucemia. Estos genes son *CEPBA*, *RUNX1* y *GATA2*, y todos tienen papeles clave en la hematopoyesis o en el funcionamiento normal del proceso<sup>8,20</sup>.

## INTRODUCCIÓN

---

También, la herencia de varios síndromes asociados a fallo medular derivados de otras alteraciones genéticas puede conducir al desarrollo de leucemia<sup>20</sup>.

En los países desarrollados se ha observado un aumento de casos de leucemia en los últimos años que en un principio se asoció a una mayor exposición a factores ambientales disparadores de la enfermedad (uso de pesticidas, exposición a radiaciones y la desregulación de la respuesta inmunitaria debido a una mejor atención sanitaria)<sup>5</sup>. Sin embargo, en algunos países en desarrollo se planteó que en realidad fuese un aumento del diagnóstico de casos (que antes no se diagnosticaban como leucemias) en lugar de un aumento real de los mismos. Esta controversia puso de manifiesto que si este aumento de casos se debe a la aparición de un mayor número de mutaciones secundarias propiciadas por los factores ambientales, esta enfermedad podría ser altamente evitable<sup>28,29</sup>.

El estudio de los factores ambientales como factores causales de la leucemia ha sido y es actualmente un campo muy amplio. A día de hoy, aún se desconoce cuál es el principal factor causal de la LLA-B. Sólo se ha conseguido establecer una relación clara de causalidad con la radiación ionizante de alta frecuencia<sup>10,18,29,30</sup> y, aunque la infección se haya posicionado como un gran candidato, hasta muy recientemente no se ha empezado a esclarecer su papel en la etiología de la enfermedad<sup>15</sup>. Principalmente, se ha postulado la exposición a agentes causantes de cáncer como desencadenante de leucemia infantil: componentes de la dieta, el tabaco en los padres, el uso de pesticidas y otros químicos del hogar, el humo del tráfico, los campos electromagnéticos, la exposición de los padres al benceno y los modificadores inmunológicos<sup>5,10,18,29-31</sup>. De hecho, algunas profesiones en las que se da la exposición a dichos agentes el porcentaje de casos de leucemia es mayor<sup>31-37</sup>. Además, los tratamientos de quimioterapia para otros cánceres aumentan el riesgo a sufrir leucemia, que se incrementa al incluir radioterapia en el tratamiento<sup>38</sup>.

La exposición a radiaciones ha sido uno de los principales factores ambientales estudiados en este sentido<sup>39-41</sup>. Estudios epidemiológicos

demuestran el aumento de casos de leucemia en áreas afectadas por radiaciones nucleares. Sin embargo, sólo se ha conseguido establecer una relación clara de causalidad con la exposición a radiación ionizante de alta frecuencia<sup>10,18,29,30</sup>. Por otro lado, los datos referentes al efecto de los rayos X son controvertidos e inconsistentes en lo que se refiere a la aparición de esta enfermedad.

Cuando hablamos de leucemia infantil, a estos factores se les suma la exposición parental, ya que las condiciones de vida de los progenitores también influyen<sup>42-49</sup>. Por tanto, al referirse a leucemia infantil no sólo se debe tener en cuenta la exposición directa, sino también la indirecta. El lugar de nacimiento, el tipo de parto, y el peso en el nacimiento también se consideran factores de riesgo de leucemia, siendo el parto por cesárea y tener un alto peso al nacer factores que se asocian con mayor riesgo de sufrir LLA<sup>50</sup>.

Las infecciones producidas por cualquier patógeno común (virus, bacterias y hongos) son el factor ambiental más estudiado y enigmático como disparador de la leucemia infantil en pacientes genéticamente predispuestos a esta enfermedad<sup>10,15,51-54</sup>. A pesar de su amplio estudio, aún no se ha conseguido establecer una conexión clara entre la exposición a infecciones y un grupo de pacientes definido. En países desarrollados se ha observado una disminución de las infecciones, que se ha visto acompañada de un aumento en las enfermedades autoinmunes y las alergias<sup>55</sup>. Estas observaciones se han intentado explicar por la hipótesis de la higiene, que se ha relacionado también con el aumento de casos de leucemia<sup>56,57</sup>. Según esta teoría, el ambiente “hiperlimpio” de los países desarrollados conlleva una disbiosis del microbioma intestinal que conduce a deficiencias en la maduración y el equilibrio del sistema inmunitario. De ahí derivarían un aumento de casos de leucemia, de alergias, de diabetes tipo I y otras enfermedades<sup>58</sup>. De esta manera, la infección en un tiempo y espacio correcto podría proteger de desregulaciones y enfermedades de base inmunológica<sup>55</sup>.

### 2. ¿Cómo surge la leucemia linfoblástica aguda de tipo B?

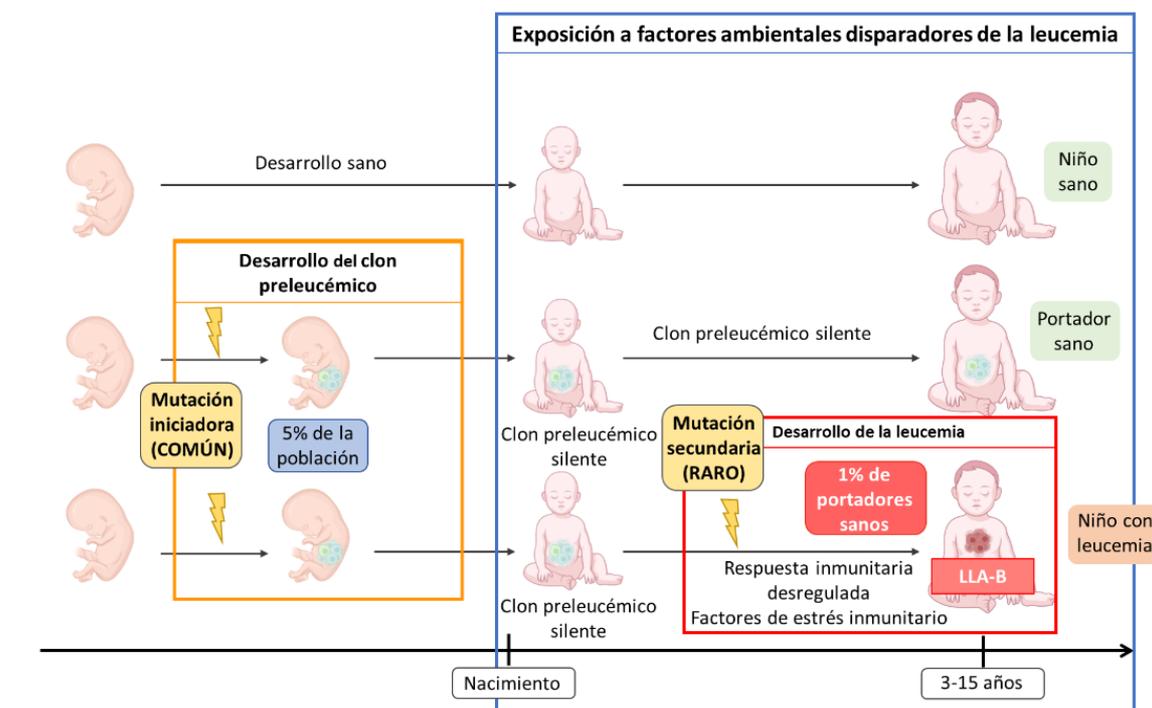
Para la mayoría de las LLA-B, la leucemia surge como consecuencia de un proceso multietapa. En primer lugar, surge una lesión genética que conduce a la generación de un clon preleucémico que necesita de la aparición de un segundo evento para que se desarrolle la leucemia<sup>59</sup>. Aunque la genética juega un papel principal en el desarrollo de la LLA, la interacción con factores ambientales es clave para el desarrollo de esta enfermedad. Así, la mayoría de leucemias, aunque tienen un origen prenatal, no se explican sin la acción de factores ambientales que induzcan la aparición de mutaciones secundarias en el contexto de una predisposición genética<sup>5,15</sup>. Son muchos los factores ambientales que han sido propuestos como disparadores de la leucemia por su papel en la aparición de mutaciones secundarias que permiten la transformación maligna. De esta manera, se ha propuesto el modelo de dos eventos para explicar el origen de la leucemia.

#### 2.1. El modelo de dos eventos para explicar el origen de la LLA-B

Para explicar el origen de la LLA-B se ha propuesto un modelo multietapa en el que varias alteraciones genéticas cooperan para el desarrollo de la enfermedad. La LLA se inicia con una lesión genética de predisposición o susceptibilidad y culmina con mutaciones secundarias propiciadas por la exposición a algún factor ambiental, hasta ahora desconocido. La primera alteración puede ser una mutación germinal o una mutación somática adquirida durante el desarrollo prenatal (*in utero*). Esta alteración supone **el primer evento** y conlleva la aparición de un clon preleucémico; este clon puede permanecer silente durante mucho tiempo, incluso durante toda la vida del portador, sin transformarse a una célula leucémica<sup>7,16</sup>. Sin embargo, en un pequeño porcentaje de casos, un estrés celular inducirá la aparición de mutaciones somáticas en algunas células preleucémicas, conformando **el segundo evento** que iniciará la transformación maligna y la aparición de la leucemia<sup>7,16,60</sup> (**Figura 4**).

Las alteraciones más comunes como primer evento son un cambio en el número de cromosomas, una translocación o una mutación no aleatoria. Esta es la lesión genética que define el tipo de leucemia y el rango de alteraciones secundarias permitidas<sup>7</sup>. Se estima que más de un 5% de los neonatos sanos nacen con mutaciones consideradas como primeros eventos<sup>61</sup>. El segundo evento corresponde a una alteración genética que surge en la célula preleucémica durante el desarrollo postnatal y puede ser disparado por un agente ambiental que causa un estrés en un sistema inmunitario desregulado y que, por lo tanto, se podría prevenir<sup>5,10,62</sup>.

El porcentaje de niños nacidos con ciertas alteraciones genéticas que predisponen a sufrir leucemia es mucho más alto que el número de niños que sufren leucemia, lo que indica que la mayoría de esas lesiones preleucémicas no progresan a LLA-B<sup>15</sup>. Así, en la mayor parte de los casos (99%) este clon preleucémico debe permanecer silente toda la vida del individuo y no llegar a desarrollar LLA-B<sup>63</sup>, aunque haya una exposición a los disparadores ambientales que podrían desencadenar la aparición de la enfermedad durante su infancia<sup>10</sup> (**Figura 4**). Por qué en algunos casos esos factores ambientales inducen la aparición del segundo evento y en otros no, continúa siendo una incógnita<sup>1</sup>.



**Figura 4– Modelo de dos eventos para el desarrollo de leucemia.** En un niño sano, el desarrollo es normal y la exposición a factores ambientales nunca podrá dar lugar a la aparición de leucemia. En un 5%

## INTRODUCCIÓN

---

de los neonatos ocurrirá una mutación en el desarrollo prenatal que dará lugar a la aparición de un clon preleucémico. Este clon preleucémico puede permanecer silente durante años, incluso toda la vida del individuo, a pesar de la exposición perinatal a factores ambientales que en otras ocasiones disparen la aparición de la leucemia. Para que se desarrolle la enfermedad es necesaria la aparición de mutaciones secundarias, que sólo ocurren en un 1% de los portadores de clones preleucémicos, y que están promovidas por la exposición a factores ambientales comunes.

Existe una excepción a este modelo de dos eventos, y son las LLA con reordenamientos de *KMT2A*, una lesión genética que es suficiente para iniciar el desarrollo de la enfermedad<sup>10,64</sup>.

### 2.2. El papel de la genética en el modelo de dos eventos

Para demostrar el papel de la genética en el desarrollo de leucemia y la veracidad del modelo de dos eventos, los estudios en gemelos idénticos fueron clave<sup>65</sup>. De hecho, en algunas parejas de gemelos monocigotos que compartían una lesión de predisposición a leucemia al nacer, tan sólo uno de ellos desarrollaba la enfermedad. En este caso, aunque los dos portasen el clon preleucémico, en uno de ellos permaneció silente toda la vida mientras que en el otro este clon preleucémico malignizó tras adquirir una segunda mutación<sup>15,66</sup>. Además, cuando uno de los gemelos desarrolla la leucemia antes de los siete años, la posibilidad de que el otro también acabe por sufrir la enfermedad se duplica<sup>65</sup>. En los casos en que los dos gemelos desarrollaron la leucemia, la lesión iniciadora era idéntica, así como el reordenamiento de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (Ig<sub>H</sub> de siglas en inglés *immunoglobuline heavy chain*) de los segmentos diversidad – unión (D<sub>H</sub>J<sub>H</sub>, del inglés *diversity – joining*), lo que demostró que la lesión estaba presente ya en el útero<sup>50</sup>. Sin embargo, el análisis del reordenamiento del segmento variable-DJ (V<sub>H</sub>D<sub>H</sub>J<sub>H</sub> del inglés *variable – D<sub>H</sub>J<sub>H</sub>*) mostraba puntos de ruptura distintos, por tanto el segundo evento y la célula donde surgía eran distintos, confirmando que esta segunda lesión se producía en una etapa postnatal<sup>15</sup>.

En el desarrollo de LLA, las alteraciones genéticas iniciadoras de la enfermedad son específicas del inmunofenotipo de la leucemia. Así, la hiperdiploidía, la hipodiploidía, las fusiones génicas *BCR-ABL1*, *ETV6-RUNX1* y *TCF3-PBX1*, mutaciones en *ETV6* y *PAX5*, reordenamientos del gen *KMT2A* o

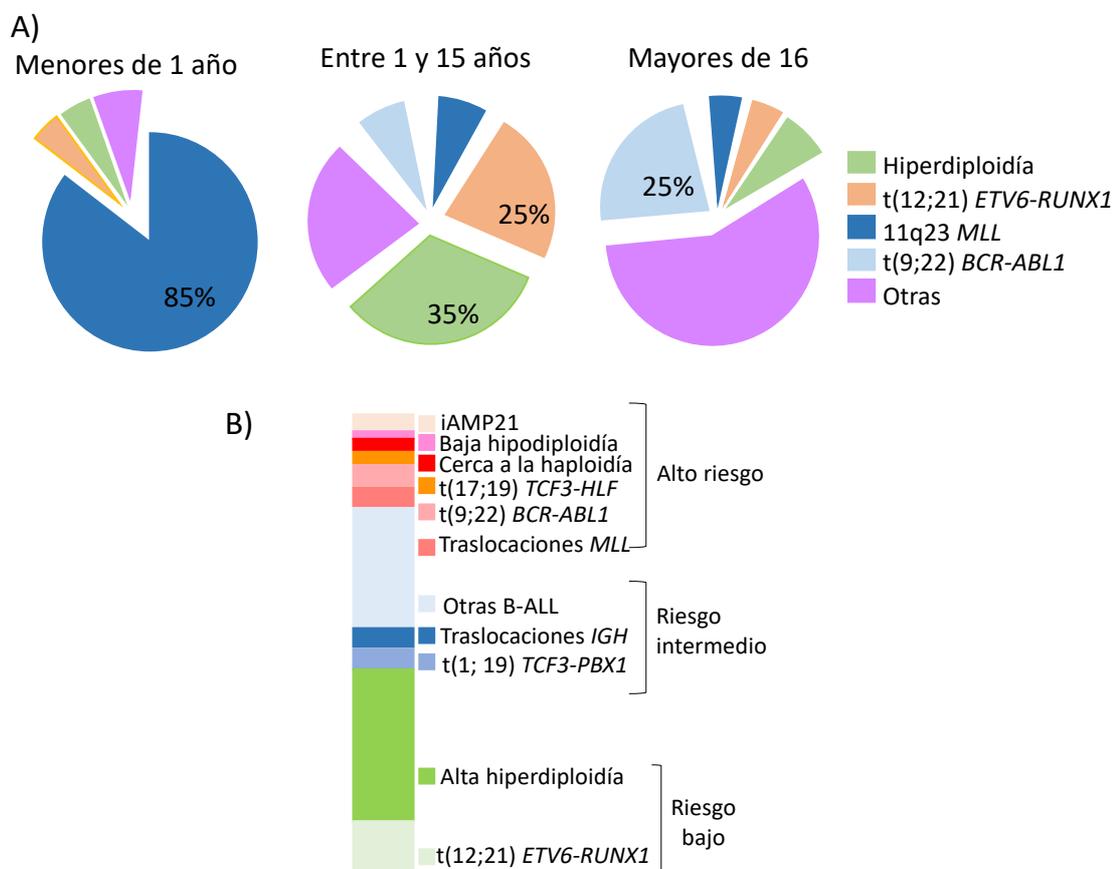
la amplificación intracromosómica del cromosoma 21, son alteraciones específicas de la LLA-B. Alteraciones en los genes *LMO2*, *TAL1*, *TAL2*, *TLX1*, *TLX2* o *HOXA* son específicas de LLA de fenotipo T. La LLA-B es una enfermedad altamente heterogénea desde un punto de vista genético y el número de alteraciones genéticas y epigenéticas asociadas a su desarrollo es muy amplio<sup>7,67,68</sup>.

Las lesiones iniciadoras de la LLA-B más comunes son las hierdiploidías, seguidas de los cambios en el número de copias (CNV, del inglés *copy number variations*) como deleciones o translocaciones; y las menos comunes las mutaciones puntuales (SNV, del inglés *single nucleotide variation*) que se producen en genes clave para el desarrollo hematopoyético y linfoide<sup>15</sup>. Aproximadamente en dos tercios de las LLA-B hay alteraciones específicas y patogénicas en genes reguladores del desarrollo linfoide B, como *PAX5*, *EBF1*, *IKZF1*, *TCF3*, *MEF2D* y *ZNF384*<sup>8,17,69</sup>. Gracias al estudio genético de la LLA, se han podido estratificar los casos de LLA-B basándose en la alteración genética iniciadora, describiendo algunas leucemias asociadas a una alteración genética recurrente<sup>2</sup>. Cada subtipo de estas leucemias es más común dependiendo de la edad y raza de los pacientes<sup>64,70</sup> (**Figura 5**):

- Los reordenamientos del gen *KMT2A* son el evento genético más común en niños menores de 1 año, y están asociados con mal pronóstico<sup>8</sup>.
- La translocación *ETV6-RUNX1* es el CNV más común en niños de entre 2 y 5 años y está asociada con buen pronóstico<sup>7</sup>.
- La alta hiperdiploidía es más común entre los 2 y 5 años y junto con la translocación *ETV6-RUNX1* son responsables de entre un 30 y un 60% de los casos de leucemia infantil<sup>67</sup>.
- La translocación *BCR-ABL1* o cromosoma *Philadelphia* supone entre un 2 y un 5% de los casos de leucemia infantil. Tradicionalmente se asociaba con un mal pronóstico, pero gracias al desarrollo de los inhibidores de tirosina quinasa su pronóstico está mejorando<sup>8</sup>.

## INTRODUCCIÓN

- La translocación *TCF3-PBX1* es más común en niños mayores de 5 y población negra y está asociado con un pronóstico favorable, pero con una mala repercusión para el SNC<sup>8</sup>.
- La baja hipodiploidía (pérdida cromosómica masiva resultando en un número de 30 cromosomas) se asocia también con mal pronóstico<sup>7,8,70</sup>, aunque es más común en leucemias en adultos<sup>67</sup>.
- Mutaciones o deleciones que conllevan la pérdida de función en *PAX5* ocurren en un tercio de las LLA-B<sup>17,71</sup>.



**Figura 5 -Distribución de los subtipos y principales anomalías genéticas asociadas a la LLA. A)** Distribución de los subtipos según alteración genética de LLA por edad. Se observan cambios en la distribución de las distintas alteraciones genéticas según el rango de edad de diagnóstico del paciente con leucemia. Adaptado de Wiemels, *Chem Biol Interactions* 2012. **B)** Frecuencia de las principales anomalías cromosómicas en LLA-B en niños y el riesgo asociado. Adaptado de Moorman, *Haematologica* 2016.

### 2.3. El papel de la infección en el desarrollo de la LLA-B

El papel de la infección como disparador del desarrollo de LLA-B ha sido ampliamente estudiado y revisado en los últimos años. Son muy numerosos los estudios epidemiológicos que se han llevado a cabo para intentar esclarecer el

papel de la infección en el desarrollo de la leucemia en base a los registros médicos de atención primaria y urgencias, que demuestran un patrón alterado de respuesta inmunitaria en niños que desarrollaron LLA-B<sup>10,15,28,72</sup>. Aunque este papel de la infección en el desarrollo de la LLA-B aún no está aclarado, sí se afirma que la clave puede estar en una respuesta inmunitaria desregulada o en un proceso de inflamación crónica<sup>58</sup>. Algo seguro es que la infección nunca producirá leucemia en pacientes que no tengan ya un clon preleucémico, es decir, que no hayan nacido con la lesión de predisposición o susceptibilidad genética<sup>16</sup>.

Para intentar explicar el papel de las infecciones en la génesis de la leucemia existen dos teorías principales. En ambos casos, aunque desde puntos de vista distintos, se define la leucemia como la consecuencia de una respuesta inmunitaria anómala a una infección. La primera de ellas es la hipótesis de Kinlen<sup>73</sup>, basada en la aparición de grupos o “*clusters*” de leucemia asociados a movimientos migratorios, y que propone que la LLA-B se produce por una reacción anormal de una población de riesgo a una infección común de baja patogenicidad<sup>73-75</sup>. La segunda es la teoría de Greaves, que introduce el concepto de “exposición retardada a la infección” para explicar que los niños con una menor exposición a patógenos comunes en su etapa perinatal podrían tener un riesgo mayor de sufrir leucemia, aludiendo a un papel protector de una infección temprana<sup>51,56</sup>. Esta teoría considera que el sistema inmunitario requiere de las infecciones en los primeros años de vida para desarrollarse correctamente, de manera que una falta de exposición a microbios y patógenos podría dar lugar a un sistema inmunitario desregulado<sup>15,51</sup>.

Son muchos los estudios que han intentado establecer la conexión a nivel molecular entre la infección y el desarrollo de LLA-B. La mayoría partían del hecho de que, en el inicio de una respuesta inmunitaria normal, en las células B se reactiva la proteína RAG implicada en la maduración de la afinidad de las inmunoglobulinas. Esta activación en una célula del clon preleucémico es la responsable de la aparición de muchas mutaciones consideradas segundos eventos en la LLA-B (*PAX5*, *IKZF1*, *ERG*, *CDKN2A*, *CDKN2B*, etc)<sup>29</sup>. De hecho,

## INTRODUCCIÓN

---

el pico de aparición por edad de LLA-B, entre los 2 y 6 años, corresponde con el momento de mayor proliferación en el sistema hematopoyético y una mayor actividad RAG<sup>76</sup>. También se pensó en la activación de la enzima AID como principal responsable<sup>15</sup>, pero estudios recientemente publicados demostraron que, incluso en ausencia de esta enzima, la infección tiene un papel desencadenante de la LLA de células precursoras B<sup>77</sup>.

El uso de modelos de ratón que imiten la situación de predisposición a leucemia en humanos ha permitido obtener la primera evidencia del papel de la infección como desencadenante del segundo evento en la leucemia. Así, utilizando modelos murinos heterocigotos para *Pax5* (*Pax5*<sup>+/-</sup>), una alteración considerada primer evento en leucemia humana, se demostró que en ausencia de infecciones no se desarrollaba la LLA-B. Sin embargo, cuando estos ratones eran expuestos a patógenos comunes un 22% desarrollaba la enfermedad<sup>78</sup>. Además, las leucemias murinas reflejaban a la perfección el escenario humano en términos de fenotipo, incidencia e incluso alteraciones secundarias observadas. También, el modelo de ratón que expresa la fusión *ETV6-RUNX1* en células madre hematopoyéticas mimetizó este comportamiento, con ausencia de LLA-B en ausencia de exposición a infecciones y desarrollo de la enfermedad en condiciones de exposición a patógenos<sup>79</sup>.

### 2.4. Otros factores causantes de estrés inmunitario como disparadores de la LLA-B

La variedad de etiologías de la LLA-B infantil implica que la exposición a infecciones no es el único estrés capaz de disparar la conversión de preleucemia a leucemia. Además, datos recientes en ratones *Pax5*<sup>+/-</sup> y ratones que expresan la fusión *ETV6-RUNX1* muestran que la predisposición genética está sistemáticamente asociada con cambios en el microbioma sin importar si los animales desarrollan o no la enfermedad<sup>80</sup>. Esto sugiere que el microbioma intestinal tiene un papel importante en la predisposición y causa del cáncer, al igual que se ha demostrado en otras enfermedades y desórdenes de base inmunológica<sup>81-84</sup>.

Estos descubrimientos tienen importantes implicaciones para el uso de antibióticos en niños ya que este tratamiento tiene consecuencias directas en la composición del microbioma intestinal. Se ha demostrado que el tratamiento con antibióticos reduce la diversidad del microbioma y además puede alterar la actividad metabólica de estos microorganismos y seleccionar cepas resistentes a antibióticos que puede causar enfermedades graves<sup>85,86</sup>. El uso excesivo de antibióticos en algunos países desarrollados se asocia con consecuencias a corto plazo y menos graves (como diarreas tras el tratamiento o la infección con *Helicobacter pylori*) pero también con otras enfermedades más serias y a largo plazo, como obesidad, asma, alergia, celiaquía, diabetes y enfermedad inflamatoria de la vejiga<sup>85,87</sup>. Por ello, es necesario realizar un mayor número de estudios para comprobar si el tratamiento con antibióticos podría estar relacionado con el desarrollo de otras enfermedades, como podría ser la LLA infantil.

El microbioma tiene un papel clave en la homeostasis y en el sistema inmunitario (a nivel sistémico pero también a nivel local en el intestino y tracto digestivo)<sup>84</sup> y sus alteraciones se asocian con varios desórdenes como neoplasias, infecciones, enfermedades inflamatorias o desórdenes inmuno-mediados, asma, alergia y diabetes tipo II<sup>81,88,89</sup>. La disbiosis intestinal se describe como la alteración en la composición de la microbiota debido a cambios cuantitativos o cualitativos de su composición, cambios en su funcionamiento o actividades metabólicas, o bien, a cambios en su distribución. Este desbalance del equilibrio microbiano tiene un efecto directo en el sistema inmunitario y suele ofrecer una ventaja para la aparición y el crecimiento de microorganismos patógenos<sup>90</sup>, estando este estado del microbioma asociado con la enfermedad<sup>91</sup>.

La microbiota se ha visto siempre implicada en la linfopoyesis a través del estímulo inflamatorio que aporta, por su papel en la definición del repertorio TCR (del inglés *T cell receptor*) y BCR (del inglés *B cell receptor*) de cada individuo, en la modulación, tolerancia y supervivencia del sistema inmunitario y en la inflamación<sup>81,84,89,92,93</sup>. Entre el microbioma y el sistema inmunitario hay una estrecha relación y, por tanto, una disbiosis en el microbioma puede conducir a

## INTRODUCCIÓN

---

infecciones, fallos en la maduración del sistema inmunitario, inflamación o alteraciones autoinmunes<sup>84</sup>. Actualmente existe una gran evidencia de que la colonización del microbioma intestinal por comunidades bacterianas aberrantes en las fases tempranas de la vida podría dar lugar a una enfermedad a través de la alteración en el desarrollo del sistema inmunitario. Por tanto, la regulación del microbioma podría usarse también como aproximación terapéutica de prevención<sup>89,94</sup>.

Aunque el papel exacto del microbioma en la autoinmunidad y la carcinogénesis aún no está claro, parecen guardar una estrecha relación. En general, cuanto mayor es la diversidad del microbioma, más beneficios se reportarán en la inmunidad antitumoral<sup>88,93</sup>. Existen estudios que justifican que en ciertas enfermedades inflamatorias, en leucemia mieloide aguda y en LLA el microbioma es menos diverso<sup>84</sup>. Por otra parte, se están realizando estudios para comprobar si la disbiosis en cánceres hematológicos es más bien una causa o un efecto de su tratamiento<sup>84</sup>.

Los antibióticos alteran el sistema inmunitario porque modifican el microbioma, bien disminuyéndolo o bien modulando su composición al atacar algunas especies de bacterias<sup>89,95-97</sup>. Por ello, es probable que el uso de antibióticos pueda tener un papel en el desarrollo o aparición de la leucemia<sup>15</sup>. Actualmente, en los países desarrollados se abusa de los antibióticos, lo que trae consigo varios problemas como la aparición de organismos resistentes y la disbiosis en la flora comensal<sup>95</sup>. Además, se han demostrado asociaciones entre el mal uso de antibióticos en la infancia y un aumento del riesgo a sufrir obesidad y diabetes tipo II<sup>95</sup>.

### 3. La prevención de la leucemia linfoblástica aguda

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo y, pese a los avances en la investigación de nuevos tratamientos, continúa creciendo su mortalidad, en parte debido a su alta toxicidad. Por eso, la prevención del cáncer sería la opción más deseable a la hora de abordar esta enfermedad<sup>98</sup>. Con

excepción del cáncer de piel no melanoma, se calcula que el 42% de los cánceres diagnosticados cada año en EEUU son prevenibles<sup>11</sup>.

En cánceres pediátricos la situación es compleja debido al desconocimiento de sus bases moleculares y los disparadores de la enfermedad<sup>16,58</sup>. La LLA-B es, sin embargo, el que mejor perspectiva tiene en cuanto a prevención<sup>58</sup>. Basándose en el modelo de dos eventos, el primer evento en la leucemia se corresponde con una alteración genética prenatal y no es posible su modificación, por lo que se hace necesario actuar sobre los factores disparadores o causantes del segundo<sup>29</sup>. Hasta ahora, cualquier circunstancia que someta al sistema inmunitario a cierto estrés se ha postulado como factor ambiental disparador de la LLA-B y son estos los que se deberán considerar para lograr la prevención de la leucemia<sup>29</sup>.

El principal problema a la hora de aplicar un tratamiento preventivo es determinar a quién, ya que una persona con predisposición no siempre acaba padeciendo la enfermedad. De esta manera, es necesario buscar formas de prevención que permitan una aplicación general sin que tenga efectos secundarios pero que tenga beneficios. Además, se ha de considerar siempre que cualquier alteración que cause cambios en la respuesta inmunitaria ha de estar equilibrada con el fin de evitar efectos colaterales.

### 3.1. La inhibición de la vía JAK/STAT como método de prevención de la LLA-B

La vía de señalización JAK/STAT es una vía frecuentemente mutada en leucemias infantiles como segundo evento, siendo típica en leucemias *PAX5* heterocigotas o leucemias con translocación *ETV6-RUNX1*<sup>99,100</sup>.

Las proteínas JAK son tirosina quinasas unidas a las regiones citoplasmáticas de receptores de citoquinas tipo I y II, que multimerizan y se transfosforilan cuando se unen los ligandos al receptor. Así, inician una cascada de señalización reclutando una proteína STAT para que sea fosforilada y entre

## INTRODUCCIÓN

---

al núcleo, donde actuará como regulador transcripcional<sup>101–103</sup>. Las proteínas JAK son esenciales en la señalización por citoquinas, de ahí su importancia en la maduración hematopoyética y en los procesos inflamatorios, por lo que una activación aberrante puede provocar desórdenes de inmunidad e inflamación<sup>104</sup>. La activación constitutiva de las proteínas STAT también se ha vinculado con patologías como leucemias, cáncer de próstata o de mama<sup>103</sup>.

Debido a la importancia de esta vía en la señalización intracelular y su frecuente alteración en ciertos desórdenes, se ha iniciado el uso de inhibidores en el tratamiento de patologías relacionadas. El uso de fármacos que inhiben la vía JAK-STAT de señalización intracelular ha demostrado ser también eficaz en el tratamiento de varias proliferaciones hematológicas<sup>105–107</sup>.

Ruxolitinib es un inhibidor de clase I que compite con el ATP en el sitio catalítico de las proteínas JAK, bloqueando su activación<sup>108,109</sup>. Su acción llega a inhibir hasta 33 quinasas, pero ninguna de ellas fundamental para el desarrollo hematopoyético<sup>109,110</sup>. Ruxolitinib es el primer inhibidor de la vía JAK/STAT (en concreto de JAK1 y JAK2) aprobado por la FDA (del inglés *Food and Drug Administration*) para el tratamiento de síndromes mieloproliferativos como la mielofibrosis y policitemia vera en humanos<sup>108,110–117</sup>. Se ha utilizado también en combinación con otros agentes inmunomoduladores o inhibidores de metiltransferasas en neoplasmas mieloproliferativos<sup>114,118,119</sup> y se ha iniciado su uso como tratamiento en la enfermedad de injerto contra huésped<sup>120,121</sup>. Los efectos secundarios más típicos que se experimentan tras el tratamiento con ruxolitinib son las citopenias derivadas de los defectos producidos en la hematopoyesis como consecuencia de la inhibición de la vía, aunque son fácilmente manejables con cambios en la dosis<sup>108</sup>. También se tienen evidencias que relacionan el tratamiento con ruxolitinib con un aumento de las infecciones víricas debido a la inmunosupresión que puede llegar a producir<sup>121,122</sup>. Debido a estos efectos secundarios, que pueden enmascarar en parte los beneficios de este tratamiento, la estratificación y la búsqueda de biomarcadores predictivos para la respuesta al tratamiento ha de ser prioritaria<sup>108,123</sup>. En cuanto a su uso en

cánceres hematológicos, ya hay evidencias que demuestran el éxito en leucemia aguda<sup>124</sup>.

### 3.2. Restauración del defecto inmunológico inducido por la deficiencia de PAX5 para prevenir el desarrollo de LLA-B

La heterocigosidad de *PAX5* se asocia a susceptibilidad al desarrollo de LLA-B y además conlleva la aparición de inmunodeficiencia al impedir la correcta linfopoyesis B<sup>125,126</sup>. Trabajos previamente publicados avalan el uso del modelo de ratón *Pax5*<sup>+/−</sup> para el estudio del desarrollo de la LLA-B<sup>77,78,127</sup>. Estos modelos han permitido establecer el papel inequívoco de la infección como disparador de la leucemia en estos ratones *Pax5*<sup>+/−</sup>, que muestran una linfopoyesis B alterada y una respuesta desregulada y diferente a ratones silvestres, en adelante ratones WT (del inglés *Wild type*) a la infección<sup>78</sup>. Esto es prueba del defecto inmunológico que provoca la deficiencia de *Pax5*.

Como ya se ha expuesto, la infección ha sido siempre relacionada con la aparición de la leucemia<sup>29,51,73</sup>. Defectos en el sistema inmunitario innato se relacionan con un aumento de susceptibilidad a ciertas infecciones por la aparición de inmunodeficiencias y otras alteraciones inmunitarias<sup>128–130</sup>. Por otro lado, varios estudios han demostrado que la activación de la inmunidad innata mediante moléculas agonistas de los TLR (del inglés *toll-like receptors*) puede ser una estrategia válida para acrecentar la inmunidad antitumoral<sup>131,132</sup>. Por este motivo, centrarse en la vía de inmunidad innata mediada por la señalización TLR y Myd88 como método para restaurar la respuesta inmunitaria normal en ratones *Pax5*<sup>+/−</sup> podría ser interesante.

Los TLRs tienen un papel clave en controlar la homeostasis tisular, en el equilibrio del hospedador con la microbiota intestinal y en la inflamación y la inmunidad<sup>133</sup>. También están implicados en el desarrollo del linaje B, el cambio de clase de anticuerpos y la activación y mantenimiento de las células B<sup>134–138</sup>. Todos los TLRs presentan una señalización intracelular mediada por Myd88, excepto TLR3 que lo hace vía TRIF<sup>128</sup>. Defectos en cualquier proteína de toda

## INTRODUCCIÓN

---

esta vía de señalización están relacionados con inmunodeficiencias, siendo los defectos de Myd88 más graves que los defectos de un solo TLR<sup>139-141</sup>.

Alteraciones en la expresión de algunos TLRs o polimorfismos en estos genes se han relacionado con ciertos cánceres, como cáncer colorrectal, de pulmón, de ovario, de vejiga o melanomas<sup>142-148</sup>. En estudios de pacientes de LLA se ha demostrado que la expresión de los TLRs puede verse alterada por la transformación maligna<sup>149</sup>. Se ha relacionado la activación de varios TLRs por diferentes ligandos con la inducción de la apoptosis o autofagia, mecanismo que podría usarse contra las propias células tumorales<sup>150</sup>.

Myd88, además de inducir la respuesta innata, tiene un papel importante en la maduración de las células B, especialmente al inicio del desarrollo B y en la formación de los centros germinales<sup>135,151</sup>. Mutaciones y alteraciones en la señalización vía Myd88 se relacionan con el desarrollo de hepatocarcinoma por daño hepático, cáncer de piel, cáncer de colon y sarcoma<sup>133,152</sup>. La ausencia de señalización Myd88 en células del microambiente tumoral aumenta el ataque inmunológico a estas células, por tanto, Myd88 podría estar implicada en la inmunosupresión tumoral<sup>153</sup>. Existen antecedentes de una colaboración entre *Pax5* y *Myd88* en enfermedades hematológicas malignas, y aunque Myd88 no induce directamente la expresión de *Pax5* sí que interviene en la regulación de su activación<sup>154</sup>.

La otra vía de señalización por TLR es la vía TRIF<sup>155,156</sup>, empleada principalmente por TLR3<sup>157</sup> y en ocasiones por TLR4<sup>158</sup>. Deficiencias en esta vía aumentan la susceptibilidad a enfermedad por el virus herpes simple, encefalitis y otras infecciones por poliovirus y bacterias<sup>158</sup>. TLR3 es el principal receptor de ARN bicatenario (ARNbc, en inglés *double-strand RNA*) en las células<sup>159</sup>, junto con MDA-5 y RG-1<sup>160,161</sup>.

Tras quedar demostrada la relación entre alteraciones en esta vía y el cáncer, se puede plantear su regulación como estrategia antitumoral. Se han iniciado varios ensayos con agonistas y antagonistas de TLR en terapias oncológicas, y aunque en algunos tipos de cánceres los resultados son

---

esperanzadores, también hay resultados negativos que indican que podrían aparecer resistencias o inducir una mayor tolerancia inmunológica al tumor<sup>150</sup>, por lo que es necesario que esta estrategia sea ampliamente definida y estudiada<sup>134</sup>.

En nuestro caso, una vez demostrado el papel de las infecciones como disparador de la leucemia, se buscó emplear la activación de la vía TLR como estrategia preventiva para la leucemia en ratones susceptibles. Sabiendo además que en las leucemias de ratones *Pax5<sup>+/-</sup>*, la expresión de Myd88 estaba también disminuida, se planteó la estrategia preventiva por una vía Myd88-independiente, por lo que se decidió emplear la molécula poly(I:C) (abreviado del inglés *polyinosinic\_polycytidylic acid*), un análogo del ARN de doble cadena que se usa como inmunoestimulador.

El uso de poly(I:C) se ha demostrado como seguro y eficaz en modelos de ratón y de ratón humanizado. Por su composición se supone que es detectado vía TLR3<sup>162</sup>, sin embargo tanto en modelos de ratón *TLR3<sup>-/-</sup>* como *Myd88<sup>-/-</sup>* la señalización en respuesta a la estimulación por poly(I:C) ha sido detectada (por medición de las citoquinas de respuesta inflamatoria o de marcadores de activación celular en respuesta inmunitaria a infección vírica), por lo que, en principio, ninguna de las dos vías sería indispensable para la señalización<sup>163,164</sup>. Además, el poly(I:C) se utiliza como adyuvante en vacunas, como activador de la respuesta antiviral<sup>165-170</sup> y en vacunación antitumoral<sup>132,171-174</sup>. En algunos estudios se ha postulado el uso de poly(I:C) para inducir la muerte celular en células cancerígenas en cáncer de pulmón, páncreas y gastrointestinales<sup>172,175-179</sup>.







**HIPÓTESIS**



---

## HIPÓTESIS

La LLA-B es el cáncer pediátrico más común, siendo diagnosticado en el 75% de los menores de 20 años que sufren de cáncer. Pese a la elevada tasa de supervivencia (en torno al 90%) tras el tratamiento contra la LLA-B, el 20% de los niños recaen o sufren consecuencias a largo plazo debidas a la alta toxicidad del tratamiento. Los avances en la investigación han conseguido identificar una gran cantidad de alteraciones genéticas que se asocian con una predisposición o susceptibilidad a sufrir dicha enfermedad. Las técnicas de cribado han permitido descubrir que el porcentaje de niños que nace cada año con alguna de estas lesiones genéticas es mucho mayor que el número de casos de leucemias que se diagnostican. Por tanto, ha de haber algún paso adicional en el desarrollo de la enfermedad que no ocurre en todos los portadores de esta predisposición o susceptibilidad. De esta manera, se acepta para el desarrollo de la LLA-B el modelo de dos eventos: a la predisposición o susceptibilidad genética que se adquiere en el desarrollo prenatal se le suma la acción de un factor ambiental que propicia la aparición de mutaciones secundarias en una etapa postnatal y que permiten la aparición de la leucemia. La exposición a infecciones es considerada el primer causante del estrés inmunitario que permite esta transformación maligna en el clon preleucémico.

El desafío es encontrar una forma de prevenir la conversión del clon preleucémico a un clon leucémico. Estudios anteriores han determinado que la exposición a infecciones comunes en niños con predisposición a sufrir leucemia actúa de disparador de la enfermedad. La hipótesis que sostiene este trabajo es que **regular la respuesta inmune en una situación de predisposición o susceptibilidad genética a desarrollar LLA-B podría ser una estrategia de prevención que impidiera el estrés inmunitario en las células preleucémicas y con ello su transformación maligna**. Para demostrar esta hipótesis, se usarán los modelos de ratón con susceptibilidad a leucemia por la deficiencia de *Pax5* a los que se aplicarán distintas estrategias de prevención.







## **OBJETIVOS**



## OBJETIVOS

- 1- Estudiar si el tratamiento con antibióticos a edades tempranas puede tener un efecto protector en el desarrollo de leucemia en distintas situaciones preleucémicas.
- 2- Determinar si la inhibición transitoria de la vía JAK/STAT en ratones heterocigotos para *Pax5* previene el desarrollo de LLA-B cuando estos ratones son expuestos a infecciones comunes.
- 3- Determinar si la activación del sistema inmunitario innato en ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* mediante el tratamiento con poly(I:C) previene el desarrollo de LLA-B mediado por la exposición a infecciones comunes.







## **RESULTADOS**



## RESULTADOS

### 1. La predisposición genética a la LLA-B define un microbioma específico en ratones sanos y enfermos

La LLA-B es una enfermedad multifactorial que aparece cuando en un clon preleucémico se produce una segunda mutación que le permite transformarse a clon leucémico maligno. Para los experimentos in vivo se utilizó principalmente el modelo de ratón heterocigoto para *Pax5* (*Pax5*<sup>+/-</sup> en adelante). Puntualmente, se incluyó para algunos estudios el modelo *Sca1-ETV6-RUNX1* (que expresa el gen de fusión *ETV6-RUNX1* bajo el promotor *Sca1*, específico de células madre hematopoyéticas). En consistencia con el modelo de dos eventos para la génesis de la LLA-B, los ratones *Pax5*<sup>+/-</sup> y los ratones *Sca1-ETV6-RUNX1* nacen con una predisposición o susceptibilidad genética a desarrollar la enfermedad, pero este evento es insuficiente para su desarrollo completo. Es por eso que, en ausencia de una segunda mutación, estos ratones no desarrollan leucemia. La exposición a la infección común actúa como disparador de la segunda mutación, por lo que solo cuando se trasladan a CF, un porcentaje significativo de los animales sucumbe a la enfermedad<sup>78,79</sup>.

De esta manera, en condiciones de *Pax5*<sup>+/-</sup> o presencia de la fusión génica y exposición a infección (cuando los animales son estabulados en un animalario convencional, CF de las siglas en inglés *conventional facility*), un 22-23% de los ratones desarrollan leucemia entre los 6 y los 19 meses. Sin embargo, ratones con esta misma susceptibilidad genética pero mantenidos en condiciones libres de infección (cuando se estabulan en un animalario SPF, de las siglas en inglés *specific-pathogen free*) no desarrollan leucemia<sup>78,79</sup>. Ambos modelos habían demostrado mimetizar la enfermedad humana en incidencia, fenotipo y mutaciones secundarias<sup>78,79,180</sup>. De esta manera, se demostró que la infección tiene un papel en el desarrollo de la leucemia, sin embargo este rol aún no se encuentra completamente definido.

## RESULTADOS

---

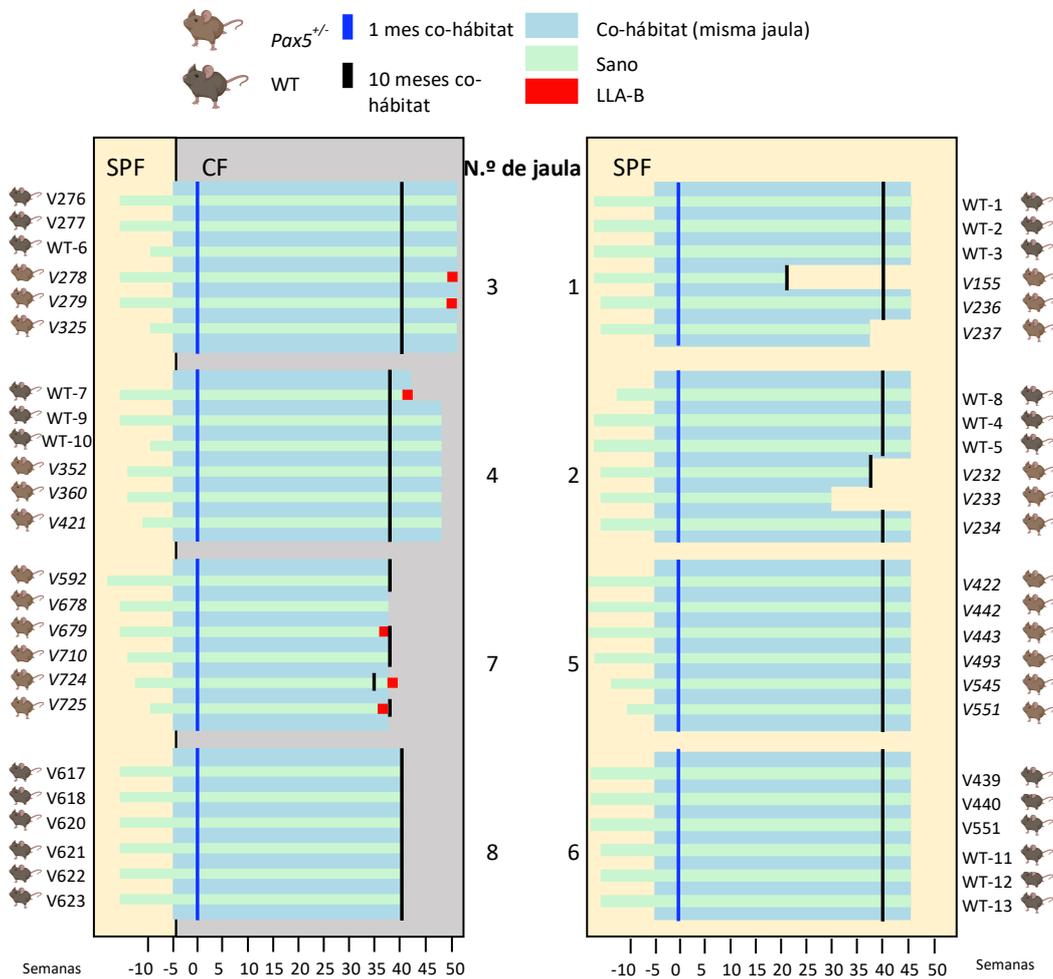
Actualmente, los estudios sobre la composición del microbioma intestinal se encuentran en auge, pues se está comenzando a valorar su papel como disparador o modulador del desarrollo de ciertas enfermedades, como por ejemplo la leucemia. En nuestro caso, se quiso estudiar el papel del microbioma en el desarrollo de la LLA-B. Se planteó que una alteración en la microbiota de estos ratones al exponerse a infecciones comunes podría ser la responsable del inmunoestrés que propicia la aparición de mutaciones secundarias en el clon preleucémico. Siguiendo esta hipótesis, alterar el microbioma de una manera u otra podría ser responsable de iniciar a la enfermedad o, por el contrario, proteger frente al desarrollo de esta.

### 1.1. El cambio de los ratones a un ambiente de exposición a infección altera la composición de su microbioma

Teniendo en cuenta que en un animalario SPF los ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* nunca desarrollan leucemia pero en un animalario CF la incidencia de LLA-B se encuentra alrededor del 22%, se planteó la hipótesis de que la exposición a infecciones comunes estuviese alterando la composición del microbioma y, de esta manera, afectando el desarrollo de la leucemia. Para estudiar si realmente el traslado a un animalario convencional alteraba el microbioma de los ratones, se estableció una cohorte de 24 ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* y 25 ratones WT de la misma edad en los que se estudiaría la composición del microbioma. Se utilizaron únicamente hembras en el estudio para evitar el sesgo por razón de sexo, ya que el microbioma intestinal es diferente entre machos y hembras.

Por un lado, se establecieron jaulas donde todos los ratones eran del mismo genotipo (6 ratones por jaula, 4 jaulas en total: 2 de ratones WT y 2 de ratones *Pax5<sup>+/-</sup>*) y por otra parte se establecieron otras 4 jaulas con genotipo mezclado (cada jaula alojaba 3 ratones WT y 3 ratones *Pax5<sup>+/-</sup>*). Todos los ratones nacieron en el animalario SPF y a las 6 semanas se trasladaron a CF una jaula de ratones *Pax5<sup>+/-</sup>*, una jaula de ratones WT y dos jaulas de genotipos mezclados (**Figura 6**). El resto de las jaulas se mantuvieron siempre en el animalario SPF. Todos los ratones fueron monitorizados y mantenidos hasta el

punto final de experimento (24 meses) o hasta que mostraron signos de enfermedad.

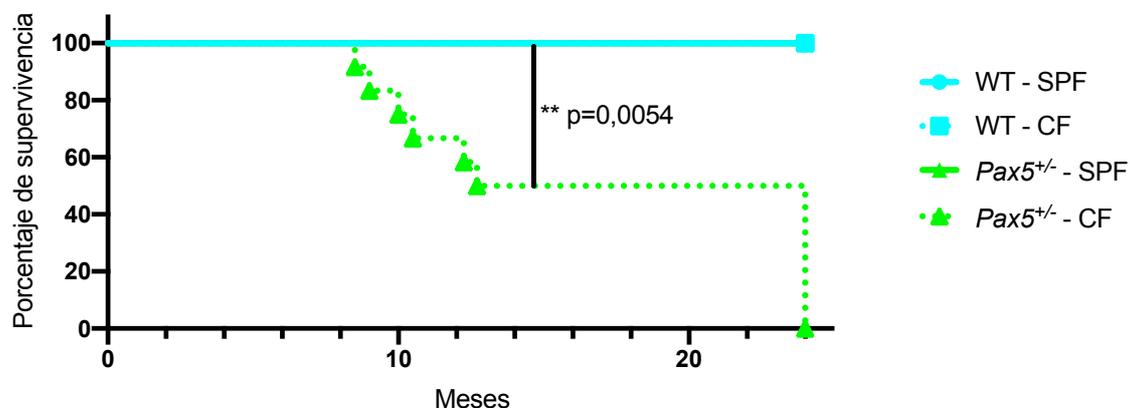


**Figura 6 - Diseño experimental del estudio de la composición del microbioma.** Los ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* (marrón claro) y WT (marrón oscuro) fueron generados en el animalario SPF. Los animales se estabularon en jaulas de un único genotipo (jaulas 7 y 5 de ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* y jaulas 8 y 6 de ratones WT) o de genotipo mezclado (jaulas 1, 2, 3 y 4 con tres ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* y tres ratones WT). A las 6 semanas de vida de los animales, las jaulas 3, 4, 7 y 8 fueron trasladadas al animalario CF. En la parte inferior se indican las semanas de vida de cada animal. La línea horizontal verde indica el tiempo que cada animal se mantuvo sano, y con un recuadro rojo se inicia el momento en que un animal desarrolló LLA-B. Las cajas azules representan el tiempo que los animales co-habitaron en la misma jaula. Se recogieron muestras fecales cuando los animales habían compartido jaula por 1 mes (línea azul) y cuando habían compartido por 10 meses (línea negra). En los animales que fueron sacrificados antes por enfermedad o mal estado, se recogió pellet en el momento del sacrificio (se indica con la barra negra). Los animales encontrados muertos de los cuales no pudo recogerse muestra se indican sin barra negra final.

Los 24 ratones WT se mantuvieron sanos durante todo el experimento, tanto en el animalario SPF como en CF. Los 12 animales *Pax5<sup>+/-</sup>* que se estabularon los dos años en el animalario SPF también se mantuvieron sanos.

## RESULTADOS

Sin embargo, de los 12 ratones *Pax5*<sup>+/-</sup> que fueron trasladados a CF, 6 de ellos desarrollaron leucemia (50%) (**Figura 7**).

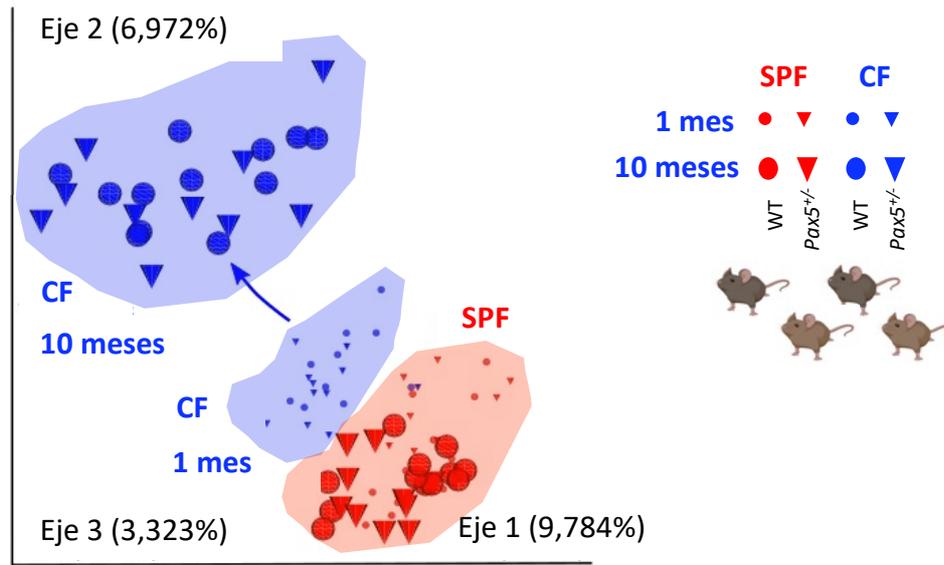


**Figura 7 – Supervivencia asociada a LLA-B.** Supervivencia asociada a la leucemia B de ratones WT en CF (línea azul discontinua, n=12) y en animalario SPF (línea azul continua, n=12) y ratones *Pax5*<sup>+/-</sup> en CF (línea verde discontinua, n=12) y en animalario SPF (línea verde continua, n=12). Las figuras representan la edad a la que los animales fueron sacrificados. Los p-valores se corresponden a los obtenidos por análisis Log-rank (Mantel-cox): p-valor 0,0054 comparando supervivencia específica asociada a LLA-B de ratones *Pax5*<sup>+/-</sup> en CF versus ratones del mismo genotipo pero mantenidos en animalario SPF, y mismo valor si lo comparamos con la supervivencia de ratones WT, ya sea en CF o en SPF. Del resto de las comparaciones no se muestra el p-valor al no ser estadísticamente significativa.

Una vez se comprobó de nuevo que sólo en exposición a infección los ratones con susceptibilidad genética desarrollaban la infección, se procedió al análisis del microbioma intestinal para comprobar si había cambios en el microbioma asociados al cambio de animalario. Con este propósito, se recogieron las heces de los ratones tras 1 mes y 10 meses de co-habitat. A partir de estas muestras se aisló el ADN y se llevó a cabo la secuenciación del amplicón de la región variable V4 del gen ARN ribosomal 16S (16S ARNr). Se utilizaron los 150 primeros pares de bases (pb) para generar un perfil del microbioma intestinal gracias a las distintas variantes de secuencias del amplicón (ASVs, del inglés *amplicon sequence variants*) siguiendo el método Deblur<sup>181</sup>, de manera que cada secuencia de 150 pb se relacionó con un microorganismo. Es decir, se utilizaron estas secuencias para identificar los microorganismos como si se tratase de una etiqueta identificativa.

Como era de esperar, el análisis de ARNr 16S reveló grandes cambios en la composición del microbioma intestinal de los animales mantenidos en animalario SPF y los trasladados a CF, tanto para los WT como para los *Pax5*<sup>+/-</sup>

(Figura 8). Además, las muestras recogidas de los ratones trasladados a CF mostraron un mayor incremento en la diversidad del microbioma a lo largo del tiempo, transcurridos 10 meses en CF al compararlo con cuando sólo llevan 1 mes en dicho animalario (Figura 8). Sin embargo, las muestras recogidas en ratones de edades similares, pero mantenidos siempre en animalario SPF, no mostraron diferencias en el tiempo.

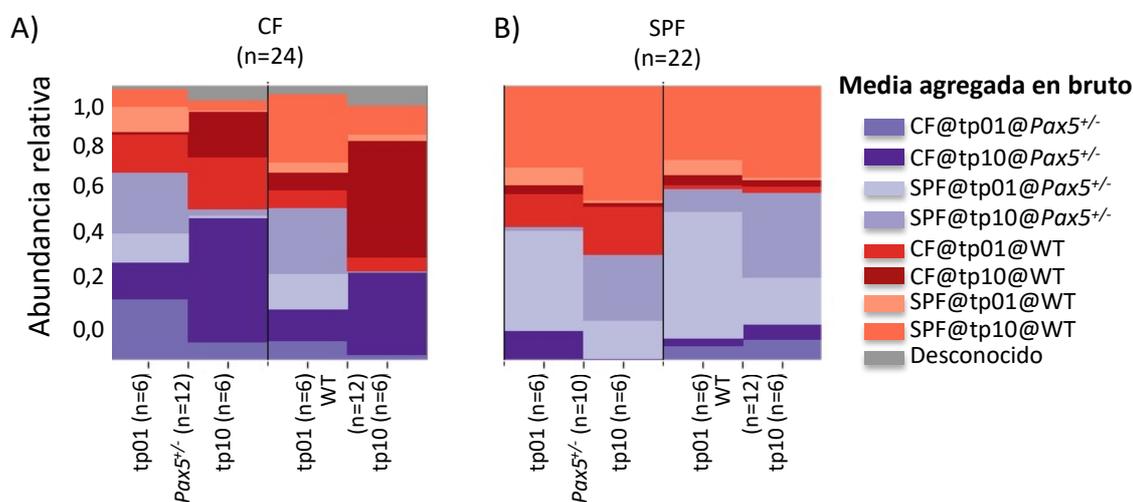


**Figura 8 - Visualización en 3D vía EMPeRor<sup>182</sup> del análisis de componentes principales (PCA) de los valores de beta-diversidad de las muestras fecales recogidas.** Las distancias de beta-diversidad (UniFrac cualitativo por pares) se calcularon para todas las muestras fecales de los animales. Los ejes indican el porcentaje de la variación explicada. Los triángulos representan los microbiomas de ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* y las esferas los de ratones WT. Las muestras recogidas tras un mes de co-habitat se representan en menor tamaño que las de diez meses. Se observa un cambio significativo a lo largo del tiempo entre las muestras de CF (azules), que no es resaltable en las muestras de animalario SPF (rojas).

Se llevó a cabo un análisis con SourceTracking2 para estudiar la mezcla del microbioma en los ratones que se estabularon en jaulas de genotipos mezclados, ya que el comportamiento coprofágico de los ratones altera la composición. Para poder clasificar el microbioma, se denominaron ocho grupos de microorganismos o rasgos a partir del análisis del microbioma de ratones mantenidos con ratones de su mismo genotipo. Estos grupos se catalogaron según el origen en procedentes de WT o de *Pax5<sup>+/-</sup>*, y también según tipo de animalario (CF o SPF) y tiempo (tp01 para 1 mes de convivencia o tp10 para los 10 meses). Las seis muestras de los ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* que habían estado en jaulas de genotipo mezclado en CF (Figura 9 A) mostraron en el primer punto de recogida (primera columna) una mezcla casi equitativa de microorganismos

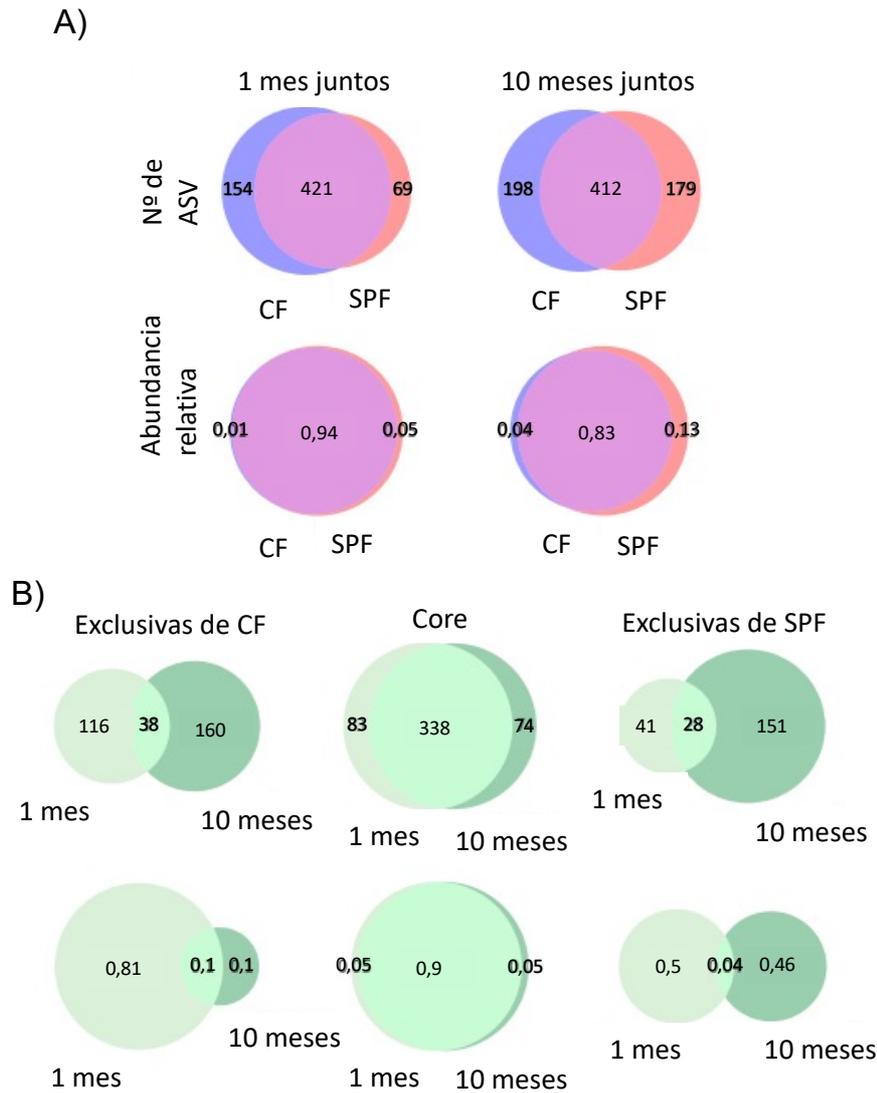
## RESULTADOS

específicos del microbioma de cada genotipo, con una ligera dominancia (aproximadamente del 60%) de microorganismos de microbioma típico de *Pax5<sup>+/-</sup>*. Sin embargo, este porcentaje descendió al 50% en el punto tp10 (segunda columna), cuando los ratones habían convivido 10 meses en la misma jaula. Se observaron tendencias similares en los ratones WT, que en este caso mostraron una dominancia de microorganismos asociados a microbiomas específicos de ratones WT (tercera y cuarta columna). En el caso de los animales en animalario SPF (**Figura 9 B**) los resultados fueron similares, pero la diferencia entre los microbiomas tras un mes de convivencia y 10 meses fue menor, en línea con resultados anteriores (**Figura 8**).



**Figura 9 -Rastreo realizado con SourceTracker2 del origen de la composición del microbioma de los ratones estabulados en jaulas con genotipos mezclados.** A) Análisis de las jaulas mantenidas en CF. B) Análisis de las jaulas mantenidas siempre en el animalario SPF. En la parte derecha de la figura se muestra la leyenda para las dos gráficas: cada color representa la media agregada de las distintas muestras individuales.

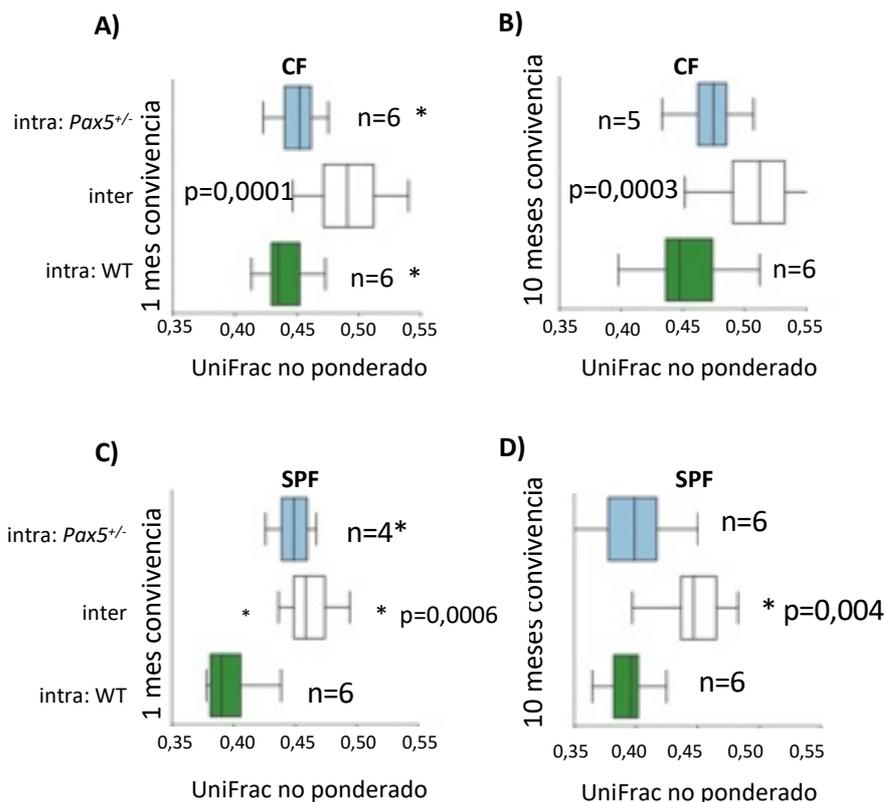
Centrándose en la diversidad beta, que refleja cómo de distintas son las muestras comparando unas con otras, se observaron diferencias significativas según el animalario en que se estabularon los animales de ambos genotipos (**Figura 10**). En SPF las ASVs típicas de este animalario aumentaron desde representar un 1% de las secuencias en primer mes, a ser un 5% de las secuencias pasados 9 meses. En animalario CF el aumento fue del 4 al 13% (**Figura 10**). Las ASV del “core” (*core* ASV se refiere a las ASVs que son típicas de un hospedador o de un nicho) permanecieron estables, pero representaban un porcentaje minoritario en cada uno de los animalarios (**Figura 10**).



**Figura 10 -Diagramas de Venn representativos de la composición taxonómica de las muestras recogidas. A)** En colores rosados y naranjas se muestra el número de ASVs cuya abundancia era diferente en animalarios CF y SPF: 421 (94%) ASV eran comunes, pero 154 se encontraron exclusivamente en CF y 69 exclusivamente en animalario SPF cuando los animales habían convivido 1 mes. Tras 9 meses más de convivencia, las ASV comunes habían disminuido, indicando una diferenciación de los microbiomas según el animalario. **B)** En verde se muestran los diagramas de Venn representativos de los microorganismos específicos de cada animalario. Solo 38 ASV exclusivos de CF se mantuvieron tras diez meses de convivencia, representando tan solo un 0,1% de la variabilidad existente. En el caso de los ASV exclusivos de animalario SPF, solo 28 (0,04%) se mantuvieron durante ese tiempo. Por tanto, los ASV específicos de cada animalario contribuían mínimamente a la abundancia relativa total.

Estas diferencias entre la composición del microbioma de animales de distintos genotipos y mantenidos en distintos animalarios se hicieron más evidentes a los 10 meses (**Figura 11**), y la abundancia relativa de las ASV típicas de cada animalario aumentó con el tiempo.

## RESULTADOS

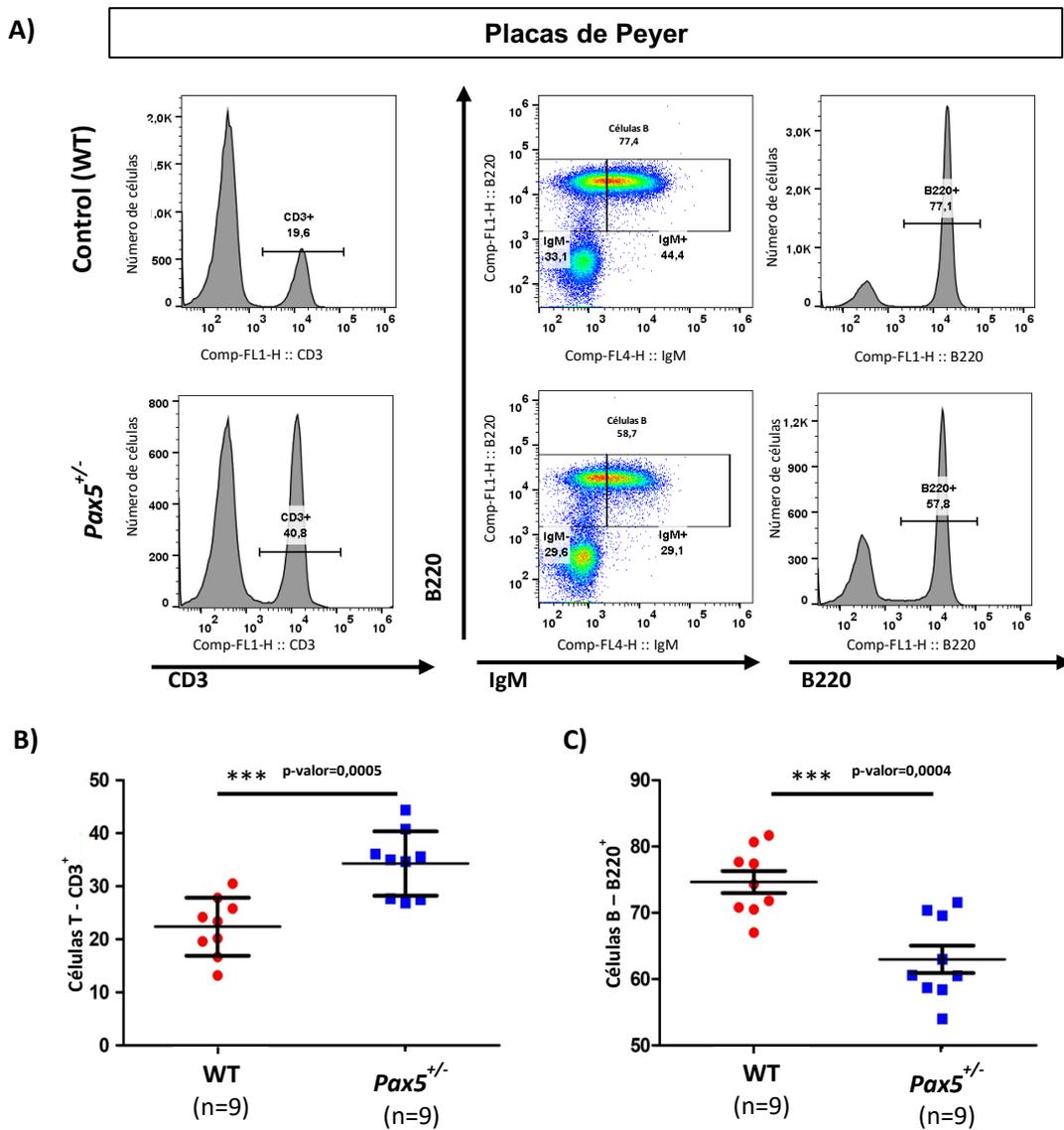


**Figura 11 - Análisis de la beta-diversidad de las muestras de microbioma.** Las muestras se estratificaron por tiempo (1 mes de convivencia y 10 meses de convivencia) y animalario (CF y SPF). Se aplicó el análisis PERMANOVA con 999 permutaciones para determinar las diferencias en la beta-diversidad del microbioma de ratones estabulados en jaulas de un único genotipo. Las cajas representan las distancias UniFrac no ponderadas entre ratones del mismo grupo (en azul para Pax5<sup>+/-</sup> y en verde para WT) y en blanco las distancias entre distintos genotipos (intergrupo, comparando cada vez 1 Pax5<sup>+/-</sup> con un 1 WT cada vez). Las cajas representan los cuartiles de los datos y las barras de error el resto de la distribución, excepto puntos que se encontraban fuera de la distribución (outliers), usando el rango intercuartil de 1,5. El análisis demuestra que el traslado a CF es capaz de redefinir el microbioma de los animales y darle un perfil totalmente distinto al microbioma de animales mantenidos en animalario SPF. Además, se demostró que la heterocigosidad de Pax5 es capaz de definir un microbioma distinto al que se observa en ratones WT. Se muestran los p-valores del test PERMANOVA. A) Análisis de la beta diversidad de muestras de microbioma tras 1 mes de convivencia en CF. B) Análisis de la beta diversidad de muestras de microbioma tras 10 meses de convivencia en CF. C) Análisis de la beta diversidad de muestras de microbioma tras 1 mes de convivencia en animalario SPF. D) Análisis de la beta diversidad de muestras de microbioma tras 10 meses de convivencia en animalario SPF.

El traslado de los animales a CF se realizó a las 6 semanas de edad, momento en el que se supone que la composición de su microbioma intestinal se ha estabilizado y ha alcanzado el estado de “adulto”<sup>183</sup>. Sin embargo, este microbioma aún es susceptible de sufrir cambios debido a la exposición a factores ambientales. Los datos de este estudio demostraron que la exposición a infecciones altera la composición del microbioma intestinal de ratones WT y ratones Pax5<sup>+/-</sup>.

1.2. La predisposición genética define un microbioma intestinal específico en los ratones

El defecto en la maduración de las células B de los ratones *Pax5*<sup>+/-</sup> también afecta al tejido inmunitario asociado al intestino<sup>78</sup>, en concreto a las placas de Peyer, los folículos linfoides asociados a este órgano. Como consecuencia de la heterocigosidad de *Pax5*, se observó que estos ratones presentan un número de células B220<sup>+</sup> (células B) significativamente reducido (p-valor=0,0004) en las placas de Peyer comparado con ratones WT (**Figura 12**). Sin embargo, el número de células CD3<sup>+</sup> (células T) en este tejido linfático se encuentra estadísticamente aumentado en los ratones *Pax5*<sup>+/-</sup> (p-valor=0,0005).



**Figura 12 – Análisis del porcentaje de células B (B220<sup>+</sup> IgM<sup>+/+</sup>) y células T (CD3<sup>+</sup>) en las placas de Peyer de ratones *Pax5*<sup>+/-</sup> y ratones WT de la misma edad. A) Imágenes representativas del análisis por citometría de flujo de las poblaciones B y T en las placas de Peyer de ratones *Pax5*<sup>+/-</sup> y ratones WT de 3 meses de edad. Las células T se identifican como células CD3<sup>+</sup>, y se observa un aumento en las placas de**

## RESULTADOS

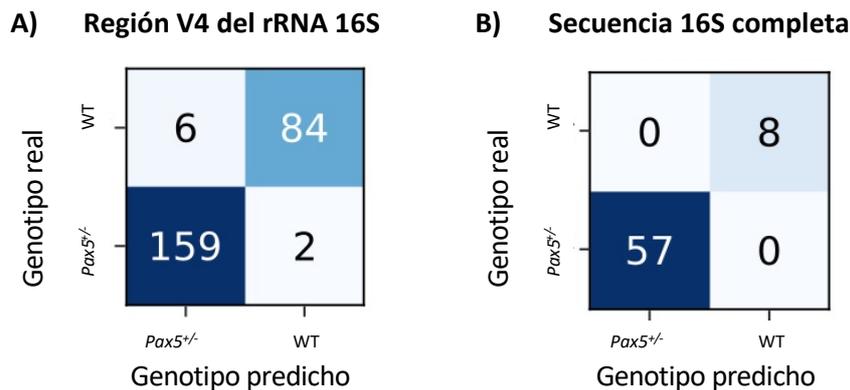
---

*Peyer de ratones Pax5<sup>+/-</sup> comparado con ratones WT de la misma edad. Las células B se identifican como B220<sup>+</sup> IgM<sup>+/-</sup>, y se observa una disminución de esta población en las placas de Peyer de ratones Pax5<sup>+/-</sup> comparado con ratones WT de la misma edad. B) Análisis estadístico de los porcentajes de células T (CD3<sup>+</sup>) en las placas de Peyer de ratones Pax5<sup>+/-</sup> (n=9) comparado con ratones WT (n=9) de la misma edad. Se observa un aumento significativo (p-valor=0,0005) en los ratones Pax5<sup>+/-</sup>. C) Análisis estadístico de los porcentajes de células B (B220<sup>+</sup>) en las placas de Peyer de ratones Pax5<sup>+/-</sup> (n=9) comparado con ratones WT (n=9) de la misma edad. Se observa un aumento significativo (p-valor=0,0004) en los ratones WT. Las barras horizontales representan la media y la desviación estándar. Los p-valores corresponden a los obtenidos por test t no pareado.*

Teniendo en cuenta la influencia del sistema inmunitario en la composición del microbioma intestinal<sup>184–190</sup>, se planteó que la disminución de células B en las placas de Peyer podría estar definiendo los cambios que se observan en el microbioma intestinal de los ratones Pax5<sup>+/-</sup>. Para comprobar esta hipótesis, se analizó la composición del microbioma de ratones Pax5<sup>+/-</sup> mantenidos en jaulas que contenían sólo ratones de este genotipo y se comparó con la composición del microbioma de ratones WT mantenidos en jaulas donde sólo había ratones de ese mismo genotipo. En total se analizaron 45 muestras fecales y se observó que la heterocigosidad de Pax5 es suficiente para definir un microbioma intestinal característico claramente distinto del microbioma de los ratones WT (**Figura 11**). Estas diferencias se observaron tanto en los animales alojados en un animalario SPF como los mantenidos en CF.

Para validar este resultado, junto a estas muestras se analizaron las muestras de una nueva cohorte de ratones WT (n=18) y Pax5<sup>+/-</sup> (n=27) que se usaron en fases posteriores en este estudio para analizar el efecto del tratamiento con antibióticos (la muestra que se utilizó de estos ratones correspondía al punto 0, antes de ser tratados con antibióticos). En total se analizaron 173 muestras fecales de ratones WT y 329 de ratones Pax5<sup>+/-</sup>. Del total de las 3.983 ASV que se analizaron, se identificaron 1.013 ASV que tenían una abundancia diferente en las muestras fecales de los ratones WT y los Pax5<sup>+/-</sup><sup>191</sup>. A partir de estas 3.983 ASVs y aplicando un método de aprendizaje automático (*machine-learning*), se separaron 40 ASVs que definían por sí solas el genotipo. Para entrenar al algoritmo se partió del 50% de las muestras para ordenar los ASV según la importancia de las características en cada genotipo con el algoritmo “*random forest*”<sup>192</sup>, y después se testó con el otro 50% de las muestras, demostrando que los 40 ASV elegidos eran capaces de predecir el

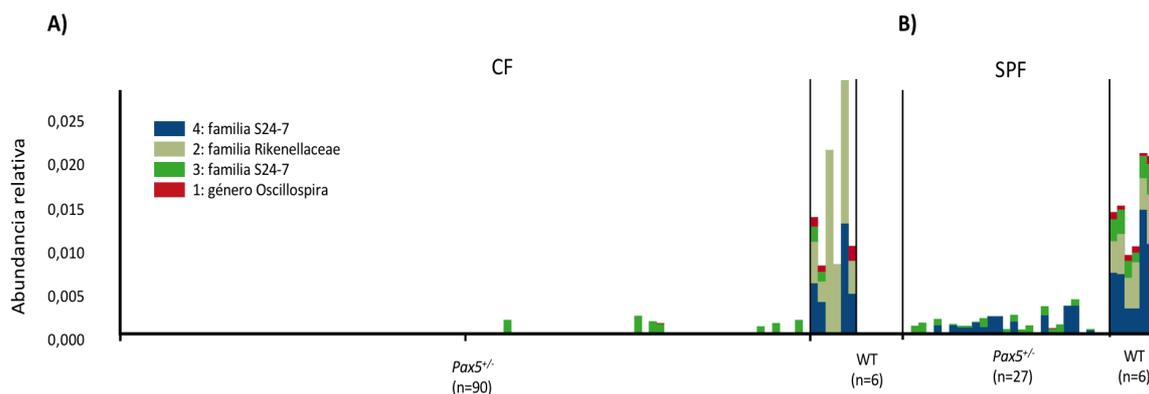
genotipo de cada ratón por sí solos con un 96,8% de precisión (**Figura 13 A**). De hecho, la herramienta de aprendizaje automático aplicada era capaz de confirmar que la heterocigosidad de *Pax5* definía un microbioma intestinal específico. Cuando se utilizaba la secuencia 16S completa en lugar de los 150 primeros pb, la predicción del genotipo se volvía mucho más precisa, ya que con sólo 4 de las 5.212 ASV de secuencia completa se predecía el genotipo con una precisión del 100% (**Figura 13 B**).



**Figura 13– Predicción del genotipo (*Pax5*<sup>+/-</sup> o WT) basada en la abundancia relativa de las secuencias estudiadas en cada caso del microbioma de las muestras fecales. A) Predicción del genotipo a partir de la abundancia relativa de 40 ASVs de la región V4. B) Predicción del genotipo a partir de la abundancia relativa usando la secuencia 16S completa. Se utilizaron las muestras fecales de los ratones de la nueva cohorte (que se usaría para el tratamiento con antibióticos) antes de ser tratados y de los ratones del experimento de convivencia (excluyendo las muestras de las jaulas de ratones de genotipos mezclados), un total de 502 muestras. Se utilizó la abundancia relativa de las 3.983 ASVs de la V4 para la predicción del genotipo. Para el entrenamiento del algoritmo de aprendizaje automático se utilizaron 168 muestras de *Pax5*<sup>+/-</sup> y 83 muestras de WT. Para la comprobación se utilizaron 161 muestras de *Pax5*<sup>+/-</sup> y 90 muestras de WT. El método de aprendizaje automático se entrenó con el algoritmo random forest (1000 árboles, biblioteca scikit-learn) para estimar la importancia de las 3.983 ASV en la predicción de cada genotipo. Después, empezando con la ASV más importante, se comprobó la precisión de la predicción del genotipo del ratón con un segundo random forest. A continuación, se fueron añadiendo más ASVs al algoritmo para mejorar la precisión general. Se alcanzó el límite con un 96,8% de precisión utilizando las 40 primeras ASV. La matriz de confusión demostró que solo para 8 muestras se hizo una predicción del genotipo errónea. Para la predicción por secuencia 16S completa se siguió la misma estrategia a partir de las 16S de PacBio; en este caso se utilizaron para el entrenamiento del algoritmo 60 muestras de *Pax5*<sup>+/-</sup> y 4 muestras de WT y para la comprobación 57 muestras de *Pax5*<sup>+/-</sup> y 8 muestras de WT. En este caso y utilizando solo las 4 ASV de secuencia completa más importantes, la precisión de la predicción del genotipo fue del 100%, sin predicciones erróneas.**

La diferencia principal que se encontró entre los microbiomas de los dos genotipos fue la pérdida total de un rango completo de bacterias comensales en los ratones *Pax5*<sup>+/-</sup>: miembros de la familia *Rikenellaceae* (*Alistipes* spp), S24-7 y del género *Oscillospira* no fueron detectados en el microbioma intestinal de ratones *Pax5*<sup>+/-</sup> ni siquiera en CF. Aunque en animalario SPF si se detectaron algunos miembros de la familia S25-7, tampoco se encontraron de la familia *Rikenellaceae* ni del género *Oscillospira* (**Figura 14**).

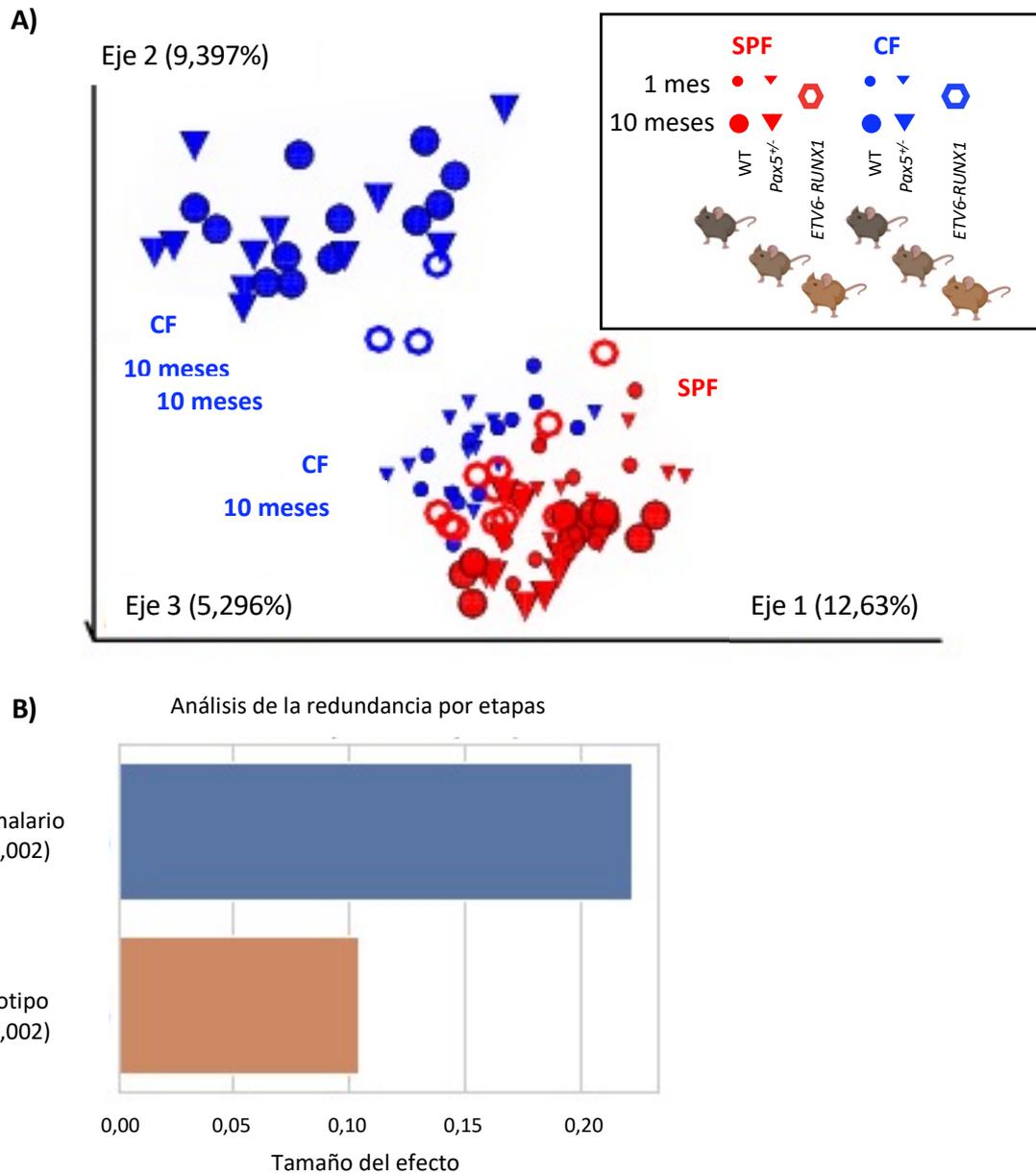
## RESULTADOS



**Figura 14 - Representación de la presencia o ausencia de las 4 ASV de secuencia completa que diferencian los genotipos Pax5<sup>+/-</sup> y WT.** Se agruparon las muestras según animalario donde se estabularon los ratones en **A)** CF y en **B)** SPF, y luego se subdividieron por genotipo (Pax5<sup>+/-</sup> a la izquierda y WT a la derecha). Se expone para cada muestra la composición de ASVs de longitud completa como una barra apilada según el subgrupo taxonómico por colores. La abundancia relativa máxima combinada de las 4 ASV de longitud completa fue del 2%. Se aplicó un clasificador bayesiano ingenuo contra la base de datos de referencia Greengenes 13.8 para asignar etiquetas taxonómicas a las ASVs de longitud completa, que están anotadas en la leyenda.

Cuando se analizó el microbioma de los ratones que habían sido mantenidos en jaulas con genotipos mezclados, se observó una mezcla de microbioma WT y microbioma Pax5<sup>+/-</sup> consecuencia del comportamiento coprofágico de los ratones. Esta mezcla dio lugar a un microbioma mixto en proporción 1:1 (**Figura 9**).

Para comprobar si la disminución de células B en los ratones Pax5<sup>+/-</sup> era responsable de estas diferencias en el microbioma, se incluyó en el estudio el modelo de ratón transgénico Sca1-ETV6-RUNX1. En este modelo de ratón, aunque haya una predisposición genética a la LLA-B, no se observa ninguna disminución en el número de células B recirculantes<sup>77,79</sup>. Estos ratones se generaron también en el animalario SPF y cuando tenían entre 6 y 8 semanas de edad, algunos de ellos fueron trasladados a CF. Se tomaron muestras fecales cuando los ratones llevaban entre 3 y 4 meses en CF, y a los 10 meses en los ratones que se habían mantenido en SPF. Se analizó la composición del microbioma intestinal en este modelo de ratón al igual que se había hecho con los ratones WT y Pax5<sup>+/-</sup>. El análisis del microbioma intestinal de los ratones Sca1-ETV6-RUNX1 confirmó que tanto el ambiente (el animalario donde se estabularon los animales) como el genotipo son factores clave para la definición del microbioma (**Figura 15**).

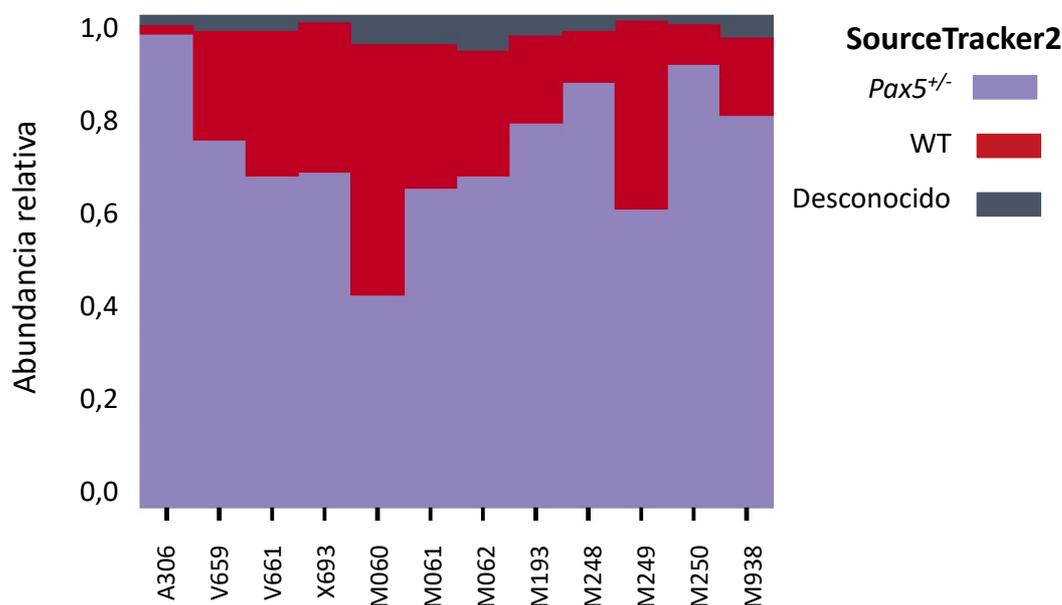


**Figura 15 – Diferencias en la composición del microbioma asociadas al genotipo o al animalario de los ratones. A)** Visualización en 3D vía EMPeror<sup>182</sup> del PCA de los valores de beta-diversidad de las muestras fecales recogidas. Se incluyeron en el análisis de las muestras anteriores (**Figura 8**) las muestras fecales de ratones *Sca1-ETV6-RUNX1* (representadas como anillos); los triángulos representan los microbiomas de ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* y las esferas los de ratones WT. Las muestras recogidas tras 1 mes de convivencia se representan en menor tamaño que las de 10 meses. Se observa claramente una agrupación de la composición del microbioma por genotipo. Las distancias de beta-diversidad (UniFrac cualitativo por pares) se calcularon para todas las muestras fecales de los animales. Los ejes indican el porcentaje de la variación explicada. **B)** Gráfica de representación del análisis de redundancia por pasos para cuantificar el efecto de cada factor en las diferencias del microbioma utilizando todas las muestras de la cohorte de convivencia y de los ratones *Sca1-ETV6-RUNX1*. El entorno y el genotipo fueron identificados como los factores más importantes.

Análisis realizados con el SourceTracker2<sup>193</sup> demostraron que en el microbioma de los ratones *Sca1-ETV6-RUNX1*, los rasgos microbianos de los ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* eran más abundantes que los de los WT. Por tanto, el

## RESULTADOS

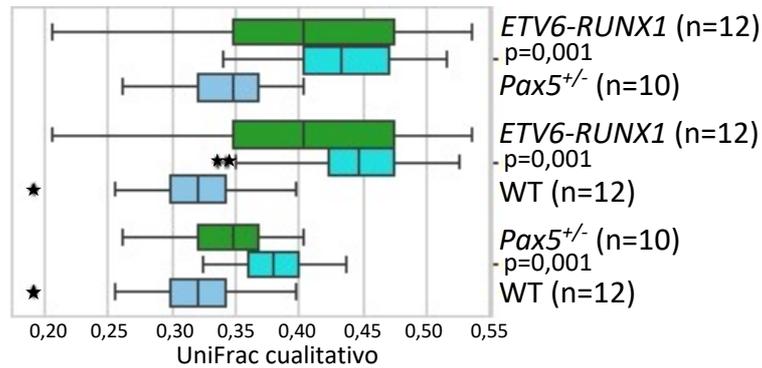
microbioma de estos nuevos ratones introducidos presentaba mayor similitud con el de ratones con otra predisposición genética a la leucemia (**Figura 16**).



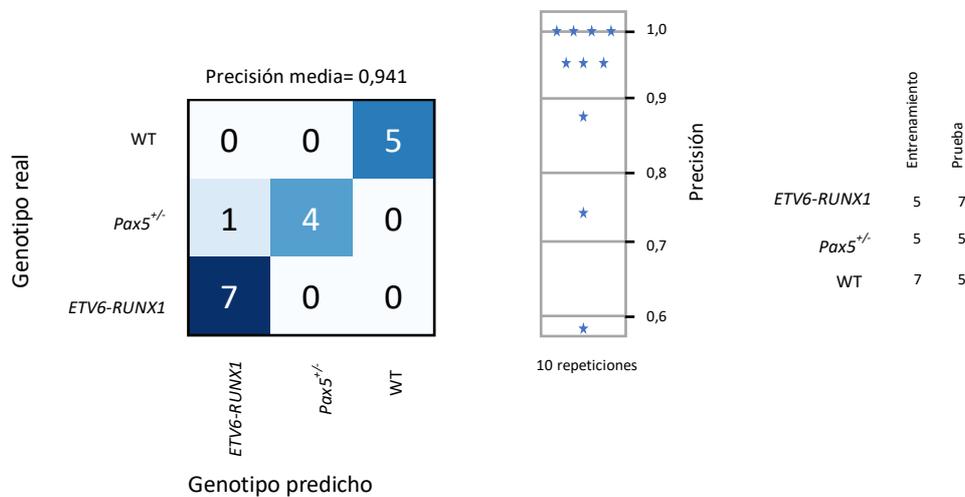
**Figura 16- Análisis vía SourceTracker2 de la composición del microbioma de ratones Sca1-ETV6-RUNX1.** En estos ratones, la mayoría de los rasgos de la composición microbioma se asemejaban a los encontrados en el microbioma de ratones Pax5<sup>+/-</sup>. Se encontraron también rasgos asociados al microbioma de ratones WT, y rasgos no asociados con ninguno de los dos genotipos estudiados anteriormente. De esta manera, se demuestra que el microbioma de estos ratones Sca1-ETV6-RUNX1 es más similar al microbioma de ratones Pax5<sup>+/-</sup> que al de ratones WT.

El análisis PERMANOVA (con distancia UniFrac cualitativa con 999 permutaciones para la beta-diversidad) confirmó que los genotipos analizados definían microbiomas intestinales que eran significativamente distintos (**Figura 17 A**). Estos dos genotipos podían ser predichos con el método de aprendizaje automático usando las 10 ASVs más destacables (usando un algoritmo *random forest* con 1.000 árboles) (**Figura 17 B**). Estos análisis confirmaron que los ratones con genotipos que otorgan una predisposición genética para el desarrollo de la leucemia tienen microbiomas distintos, independientemente de si los niveles de células B están alterados.

A) PERMANOVA a dos bandas (999 permutaciones)



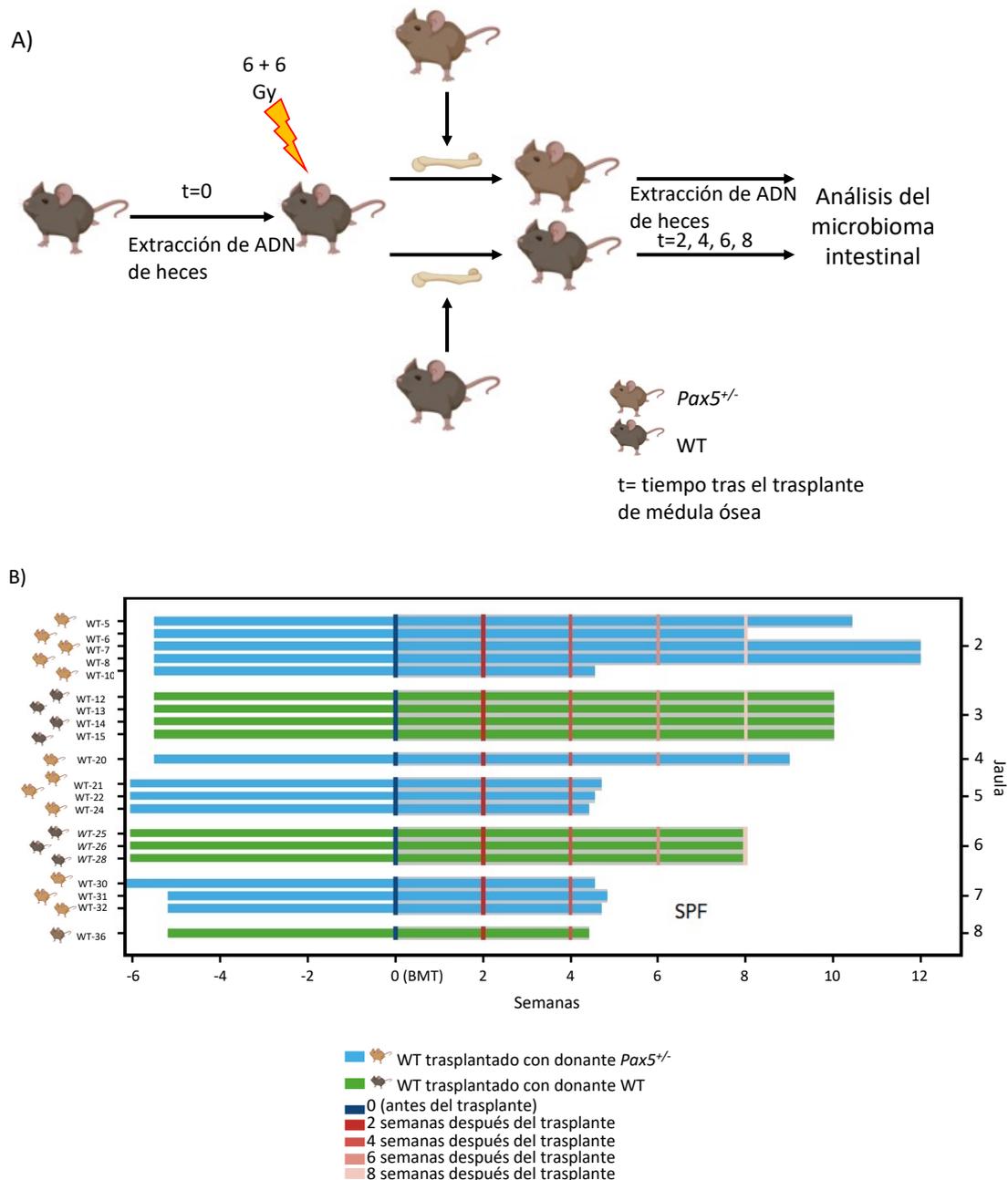
B)



**Figura 17 - Análisis estadísticos representativos de la diferenciación de los microbiomas de ratones Sca1-ETV6-RUNX1, Pax5<sup>+/-</sup> y WT. A)** Test PERMANOVA con 999 permutaciones - UniFrac cualitativo de las distancias de beta-diversidad. Los tres genotipos definen tres microbiomas significativamente diferentes. Se compararon cada genotipo con los otros dos, usando muestras de microbiomas de 12 ratones Sca1-ETV6-RUNX1, 10 ratones Pax5<sup>+/-</sup> y 12 ratones WT. Se muestran los p-valores del análisis PERMANOVA. Las cajas representan las distancias UniFrac no ponderadas entre ratones del mismo grupo en cada comparación y en azul claro las distancias entre distintos genotipos (intergrupo, comparando cada vez 1 ratón de cada genotipo por parejas). Las cajas representan los cuartiles de los datos y las barras de error el resto de la distribución, excepto los valores que se encontraban fuera de la distribución (outliers), usando el rango intercuartil de 1,5. **B)** El algoritmo de aprendizaje automático fue capaz de predecir el genotipo de ratones genéticamente predispuestos a LLA-B con una precisión del 94,1%. Se muestra la matriz de confusión para la predicción del genotipo con las 10 ASV más importantes (random forest con 1000 arboles).

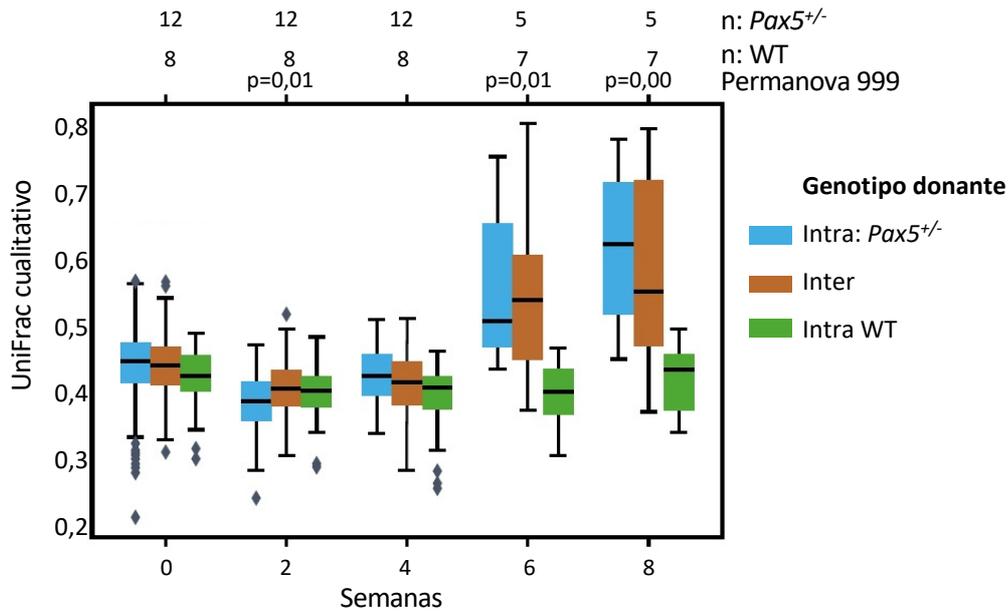
Una vez se comprobó que cualquier alteración genética que otorgue una predisposición a sufrir LLA-B define un microbioma específico, se quiso comprobar si esto era responsabilidad de las células hematopoyéticas. Para este experimento, se realizó un trasplante de la médula ósea (MO) de ratones WT (n=8) o ratones Pax5<sup>+/-</sup> (n=12) a ratones WT previamente irradiados (n=20), y se recogieron muestras fecales antes y después del trasplante (**Figura 18**).

## RESULTADOS



**Figura 18 - Diseño experimental de la recogida de muestras fecales para el análisis del microbioma de los ratones trasplantados con médulas de donantes WT o *Pax5<sup>+/-</sup>*.** A) Los ratones WT receptores se generaron y mantuvieron en el animalario SPF. Se recogieron muestras fecales antes de la irradiación con dos dosis de 6 Gy para eliminar las células de la médula ósea de estos ratones. El trasplante de médula ósea se llevó a cabo 2 horas después de la irradiación usando médula ósea total de ratones donantes WT o *Pax5<sup>+/-</sup>*. Los ratones receptores fueron monitorizados después del trasplante y se recogieron muestras fecales a los puntos indicados. B) La médula ósea de ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* fue trasplantada a 12 ratones WT que se estabularon en 4 jaulas en el SPF. Como control, se realizó el experimento de trasplante pero con médulas óseas de ratones WT que fueron trasplantadas a 8 ratones WT estabulados en 3 jaulas en el animalario SPF. Se recogieron muestras fecales a las 2, 4, 6 y 8 semanas desde el trasplante.

El análisis longitudinal del microbioma mostró diferencias significativas en la composición microbiana, según el genotipo del donante en cada caso, y que podían observarse en sólo 6 semanas después de trasplante (Figura 19).



**Figura 19 - Análisis PERMANOVA por pares de la composición del microbioma de los ratones que recibieron el trasplante de médula ósea (MO).** Se comprobó que las diferencias en la beta diversidad debidas al genotipo se mantenían en los ratones trasplantados. Las cajas representan las distancias Unifrac cualitativas entre muestras de los donantes del mismo genotipo (distancia intra-grupo azul para *Pax5*<sup>+/-</sup> y verde para WT) y las distancias entre donantes de distinto genotipo (marrones). Las cajas representan los cuartiles de los datos y las barras de error el resto de la distribución, excepto puntos que se encontraban fuera de la distribución (outliers), usando el rango intercuartil de 1,5. 6 semanas después del trasplante de MO se detectan diferencias significativas en función del genotipo del donante. Se muestran los p-valores del análisis PERMANOVA.

Todos estos resultados sugieren que las células hematopoyéticas que portan la susceptibilidad genética al desarrollo de LLA-B son responsables de definir un microbioma intestinal específico asociado a cada genotipo.

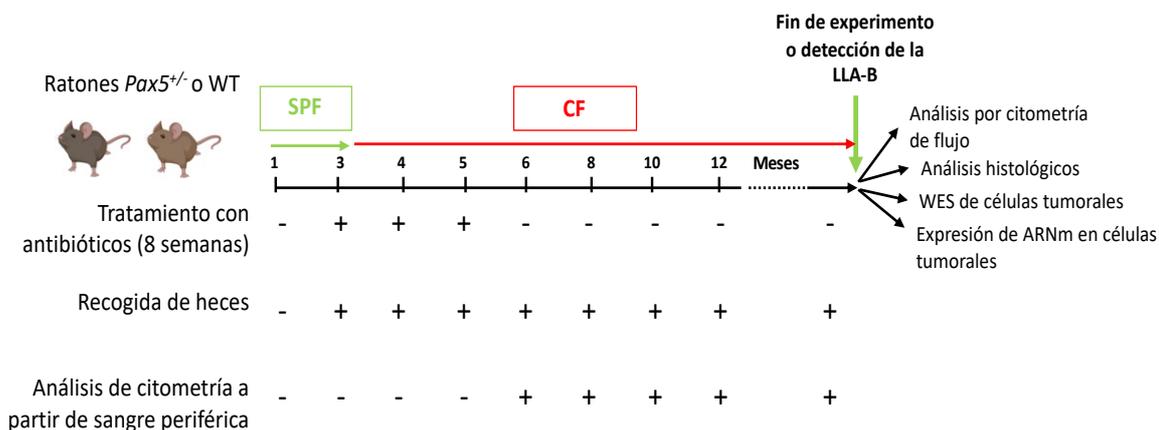
### 1.3. El tratamiento con antibiótico en ratones *Pax5*<sup>+/-</sup> modifica el microbioma intestinal pero no previene el desarrollo de la leucemia en condiciones de exposición a infección

Hasta ahora se ha visto que la composición del microbioma intestinal en ratones con susceptibilidad genética a desarrollar LLA-B es distinta a la que se observa en ratones WT. A partir de ahí, se quiso estudiar si estas diferencias en la composición del microbioma eran responsables de la aparición de la leucemia en ratones *Pax5*<sup>+/-</sup> o bien tenían un papel protector de la enfermedad en ratones WT.

Para este experimento se generaron 27 ratones *Pax5*<sup>+/-</sup> y 18 ratones WT, que fueron trasladados a CF a las 6 semanas de vida. En el momento del

## RESULTADOS

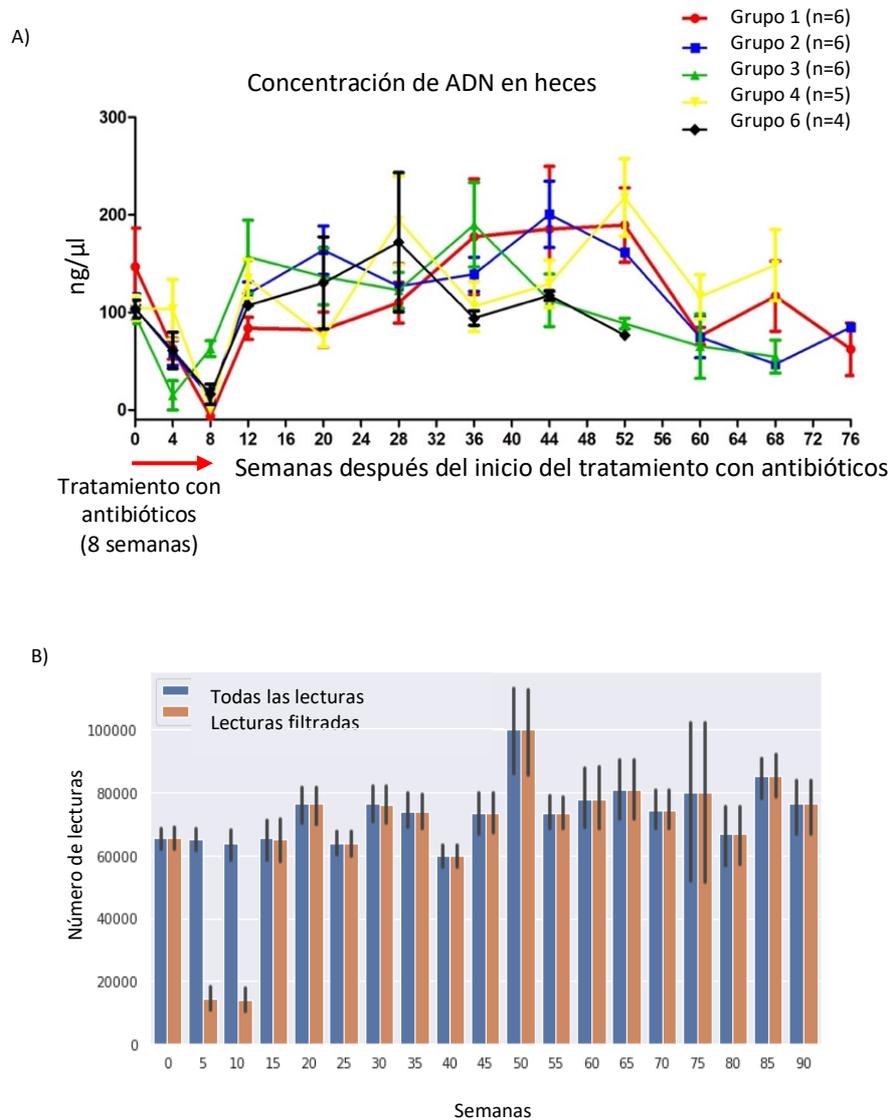
traslado, se inició el tratamiento con un coctel de antibióticos (ampicilina, vancomicina, ciprofloxacina, imipenem y metronidazol)<sup>194</sup>. Estos fármacos se administraron junto al agua en los biberones de las jaulas durante 8 semanas, con el objetivo de eliminar por completo los microorganismos que conformaban el microbioma intestinal. Se recogieron muestras fecales antes de que empezasen el tratamiento, a las 4 semanas de tratamiento, a las 8 semanas de tratamiento y después cada 2 semanas hasta que los animales mostraron signos de leucemia o hasta el punto final de experimento. Además, periódicamente se llevaron a cabo análisis por citometría de flujo a partir de sangre periférica (SP) para comprobar cómo afectaba el tratamiento con antibióticos a la composición hematopoyética y poder detectar la presencia de células leucémicas en la sangre (Figura 20).



**Figura 20 - Diseño experimental del tratamiento con antibióticos y seguimiento de los animales.** Los ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* y WT nacieron en el animalario SPF y aproximadamente a las 6-8 semanas fueron trasladados a CF. En este momento, se inició el tratamiento con el coctel de antibióticos con una duración de 8 semanas. Durante todo el estudio se recogieron muestras fecales (antes del tratamiento, durante éste y al finalizar el tratamiento cada 2 semanas hasta que el animal fue sacrificado). También se realizaron análisis periódicos de la sangre periférica por citometría de flujo para determinar el estado hematopoyético y poder determinar, en ciertos casos, la aparición de células leucémicas en circulación. Cuando los ratones alcanzaron los 22 meses de edad o cuando se detectó LLA-B, fueron sacrificados y se procedió al análisis de los tejidos hematopoyéticos por citometría de flujo. También se llevaron a cabo análisis histológicos de varios tejidos y análisis de ADN y expresión genética de las células leucémicas en los ratones enfermos.

El tratamiento con antibióticos fue eficaz en cuanto a la eliminación del microbioma. La ausencia de microbioma se determinó no sólo midiendo la concentración del ADN presente en las heces (Figura 21 A), sino también por la secuenciación del ARNr 16S (Figura 21 B). De hecho, las secuencias encontradas en las muestras de ADN obtenidas de las heces recogidas durante el tratamiento con antibióticos correspondían principalmente a secuencias

relacionadas con cloroplastos o mitocondrias (un 82% de las lecturas), seguramente fruto de la dieta de los animales (**Figura 21 B**).

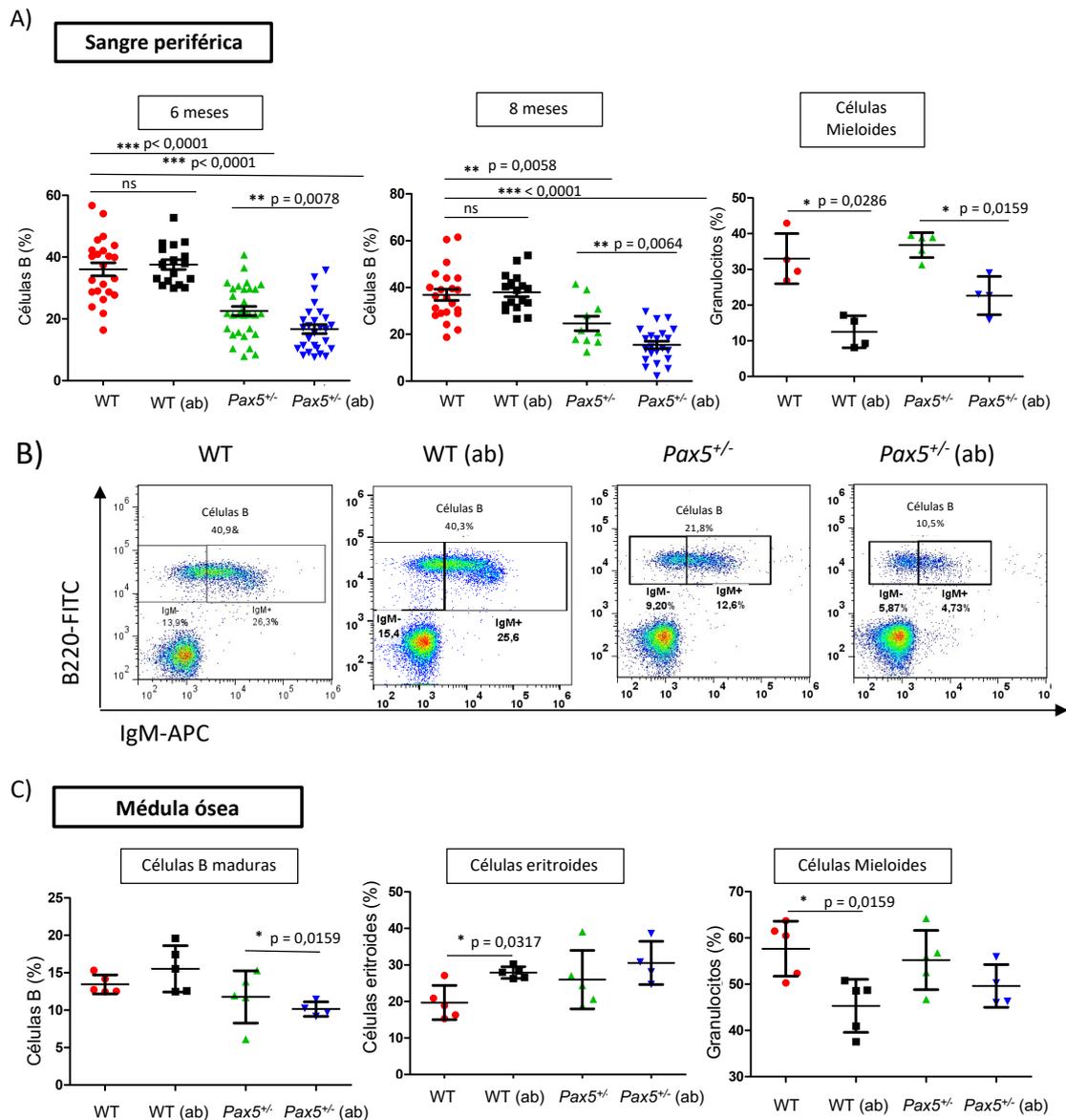


**Figura 21 - Gráficas representativas de la concentración de ADN en las muestras fecales recogidas a lo largo del experimento. A)** Representación de la concentración de ADN de las muestras fecales de cada grupo de ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* tratados con antibióticos a lo largo del tiempo. Al finalizar el tratamiento con antibióticos (semana 8) la concentración de ADN en las heces era prácticamente 0. Las concentraciones de ADN bacteriano en las muestras fecales se reestablecieron aproximadamente 1 mes tras finalizar el tratamiento. **B)** Representación del número de lecturas que se obtuvieron a partir de ADN de las muestras fecales a lo largo del tiempo (en semanas desde el inicio del tratamiento con antibióticos). Las columnas azules representan el número total de lecturas. Las columnas naranjas representan el número de lecturas después de retirar las ASV relacionadas con cloroplastos o mitocondrias, ya que se supusieron como originarias de la comida o del propio ratón. Como se observa, solo se retiró un número importante de muestras durante el tratamiento con antibióticos, mostrando el impacto de este tratamiento en el microbioma.

Cuando se analizó el efecto del tratamiento con antibióticos en la composición hematopoyética, se observó una reducción en el número de células B maduras en SP en los ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* que no se observó en los WT (**Figura**

## RESULTADOS

**22 A-B).** Este cambio también se reflejó en la MO de estos ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* tratados con antibióticos (**Figura 22 C**). Se observó también una disminución en la población mieloide en la SP en ambos genotipos pero que no se reflejaba en la médula ósea de los ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* (**Figura 22 A-C**). En el resto de órganos hematopoyéticos, no se observó ninguna otra alteración en el desarrollo B debido a este tratamiento, ni en ratones WT ni en ratones *Pax5<sup>+/-</sup>*.

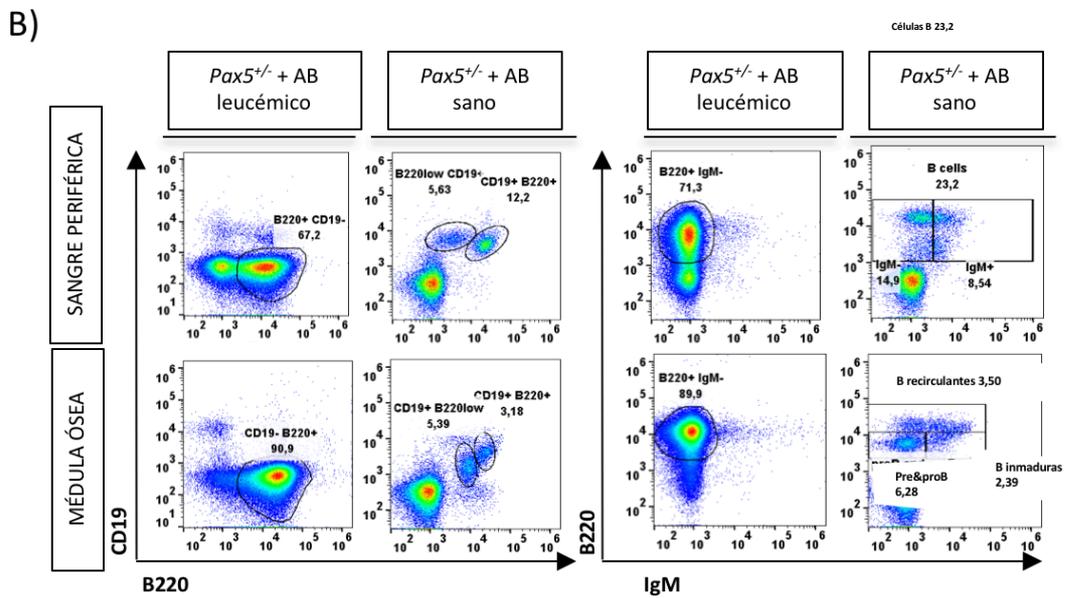
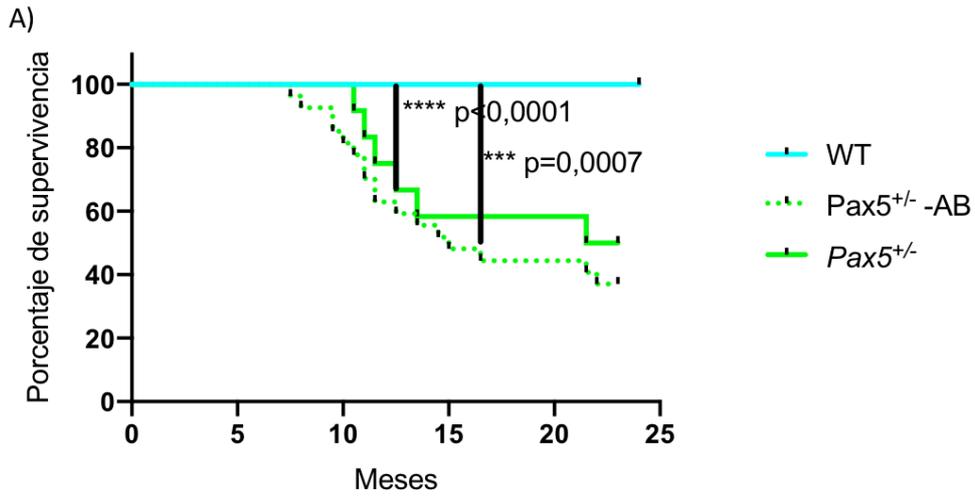


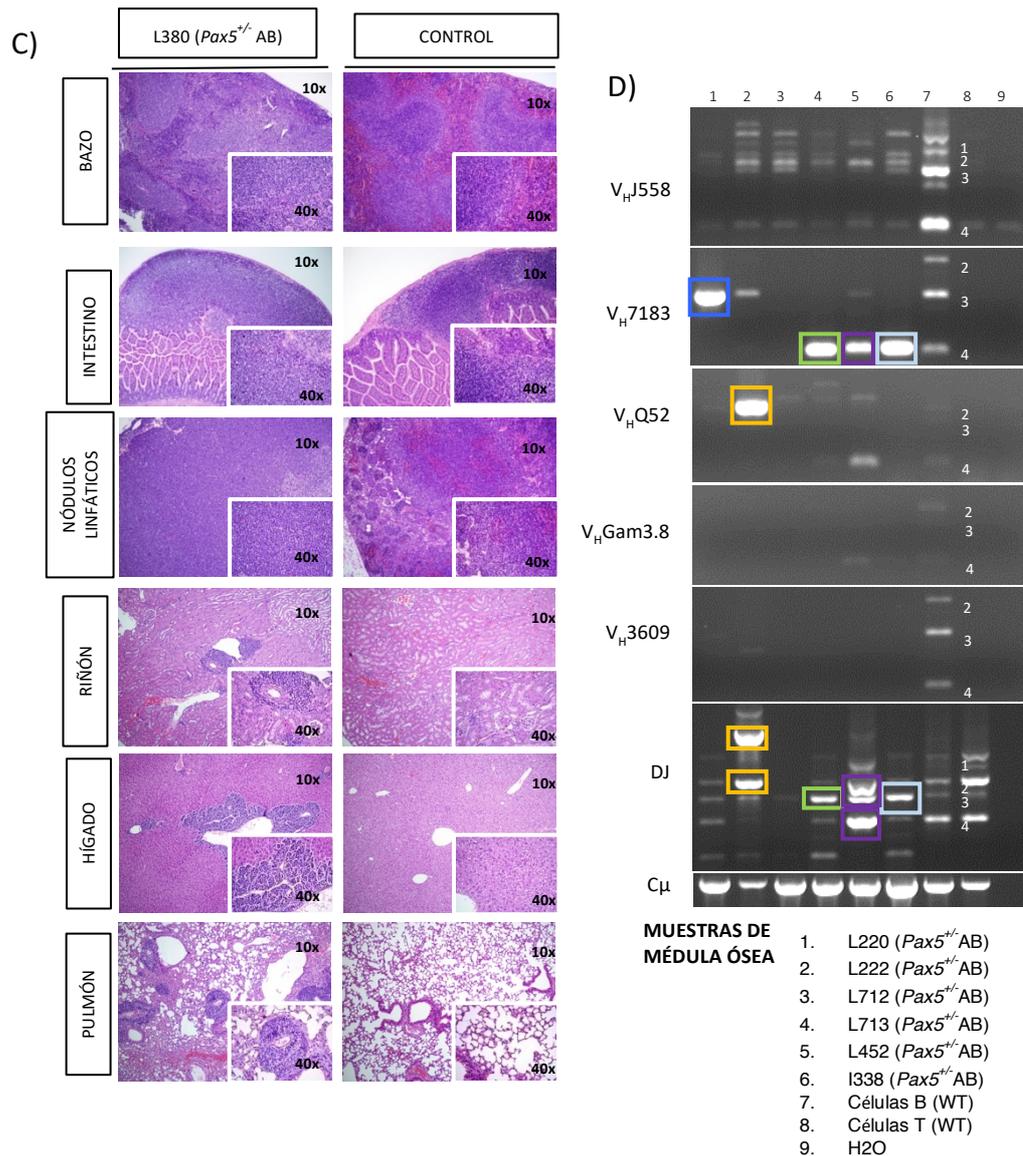
**Figura 22 - Análisis representativos estadísticos y de citometría de flujo de los cambios producidos por el tratamiento con antibióticos (ab) en las poblaciones hematopoyéticas de sangre periférica y médula ósea. A)** Análisis estadístico de las poblaciones hematopoyéticas de sangre periférica en las que se observaron cambios estadísticamente significativos debido al tratamiento con antibióticos. Se observaron diferencias en la población B de sangre periférica en ratones WT y *Pax5<sup>+/-</sup>* tratados con antibióticos (WT ab n=17 y *Pax5<sup>+/-</sup>* ab n=27, respectivamente) en comparación con ratones de los mismos genotipos sin tratamiento con antibióticos y de la misma edad (n=23 y n=31, respectivamente). Se observó una disminución significativa en el número de células B en los ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* tratados con antibióticos comparado con ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* no tratados a los 6 (p=0,0078) y a los 8 meses (p=0,0064). En ambos genotipos se observó una disminución en la población mieloide debido al tratamiento con antibióticos (p=0,0286 para ratones WT tratados versus no tratados y p=0,0159 para *Pax5<sup>+/-</sup>* tratados versus no

tratados). Las barras horizontales representan la media y la desviación estándar. Los p-valores corresponden a los obtenidos por test t no pareado. **B)** Ejemplo representativo de análisis por citometría de flujo de la población B en sangre periférica. **C)** Análisis estadístico de las poblaciones hematopoyéticas de médula ósea en las que se observaron cambios estadísticamente significativos debido al tratamiento con antibióticos. Se observó una disminución en la población B madura en ratones Pax5<sup>+/-</sup> debido al tratamiento con antibióticos (datos de 4 ratones Pax5<sup>+/-</sup> tratados con antibióticos y 4 no tratados, p=0,0159) que no se observó en los ratones WT (datos de 5 ratones Pax5<sup>+/-</sup> tratados con antibióticos y 5 no tratados). Se observó un aumento de células eritroides en ratones WT tratados con antibióticos (p=0,0317) que no se observó en ratones Pax5<sup>+/-</sup>. La población mielóide no cambió debido al tratamiento con antibióticos en ratones Pax5<sup>+/-</sup>, aunque sí se observó la misma disminución que en sangre periférica en ratones WT (p=0,0159). Las barras horizontales representan la media y la desviación estándar. Los p-valores corresponden a los obtenidos por test t no pareado.

En el grupo de ratones Pax5<sup>+/-</sup> tratados con antibióticos, se observó un aumento en la incidencia de LLA-B: 17 de los 27 ratones Pax5<sup>+/-</sup> mantenidos en CF y tratados con antibiótico desarrollaron la enfermedad (equivale a una incidencia del 62,96%) (**Figura 23 A**). Esto se corresponde con un incremento, aunque no alcanza la significación estadística, si se compara con la incidencia de la enfermedad en los ratones del mismo genotipo no tratados con antibióticos (6 de 12, una incidencia del 50%). En estudios anteriores, se había reportado una incidencia de LLA-B menor en ratones Pax5<sup>+/-</sup> en exposición a infección<sup>78</sup>; las diferencias con la incidencia actual observada en esta cohorte de ratones Pax5<sup>+/-</sup> no tratados con ruxolitinib puede deberse al menor número de animales incluidos en este estudio. La enfermedad se diagnosticó entre los 7,5 y los 22 meses de edad en los animales tras la aparición de células leucémicas en SP, MO, bazo, nódulos linfáticos (NL) e intestino de los ratones, las cuales llegaron a infiltrar tejidos no hematopoyéticos como riñones, hígado y pulmones (**Figura 23 C**). El análisis por citometría de flujo confirmó que las células leucémicas tenían un fenotipo B220<sup>+</sup> CD19<sup>+/-</sup> IgM<sup>-</sup> cKit<sup>+/-</sup> CD25<sup>+/-</sup> (**Figura 23 B**). El análisis de la clonalidad del BCR de las leucemias, tanto de los ratones tratados con antibiótico como de los no tratados, reveló la presencia de clonalidad consistente con un origen celular pro-B o pre-B (**Figura 23 D**).

# RESULTADOS

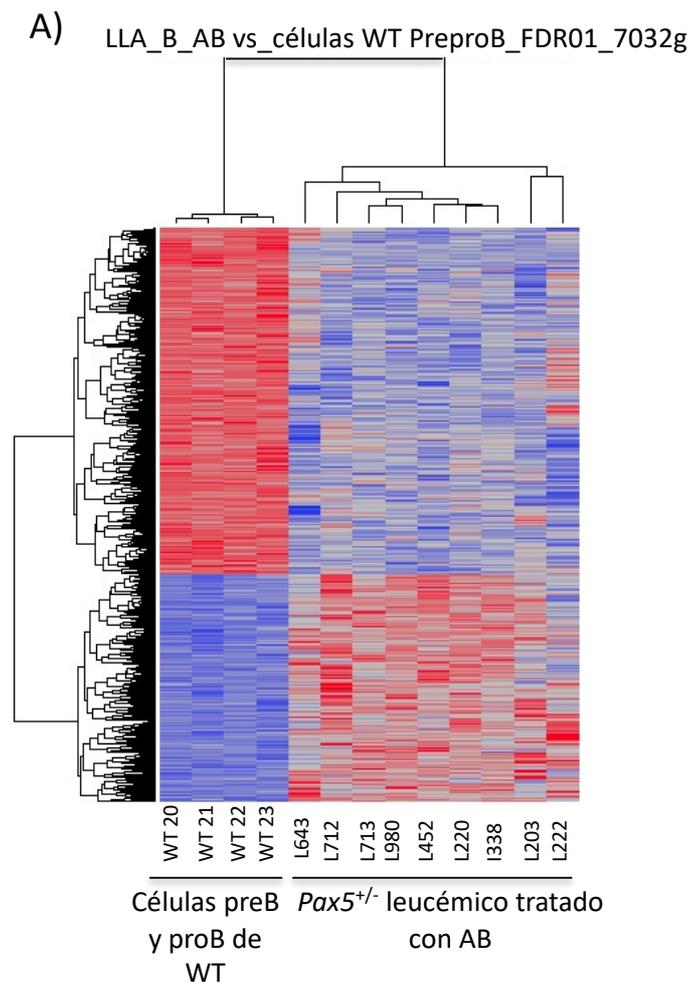


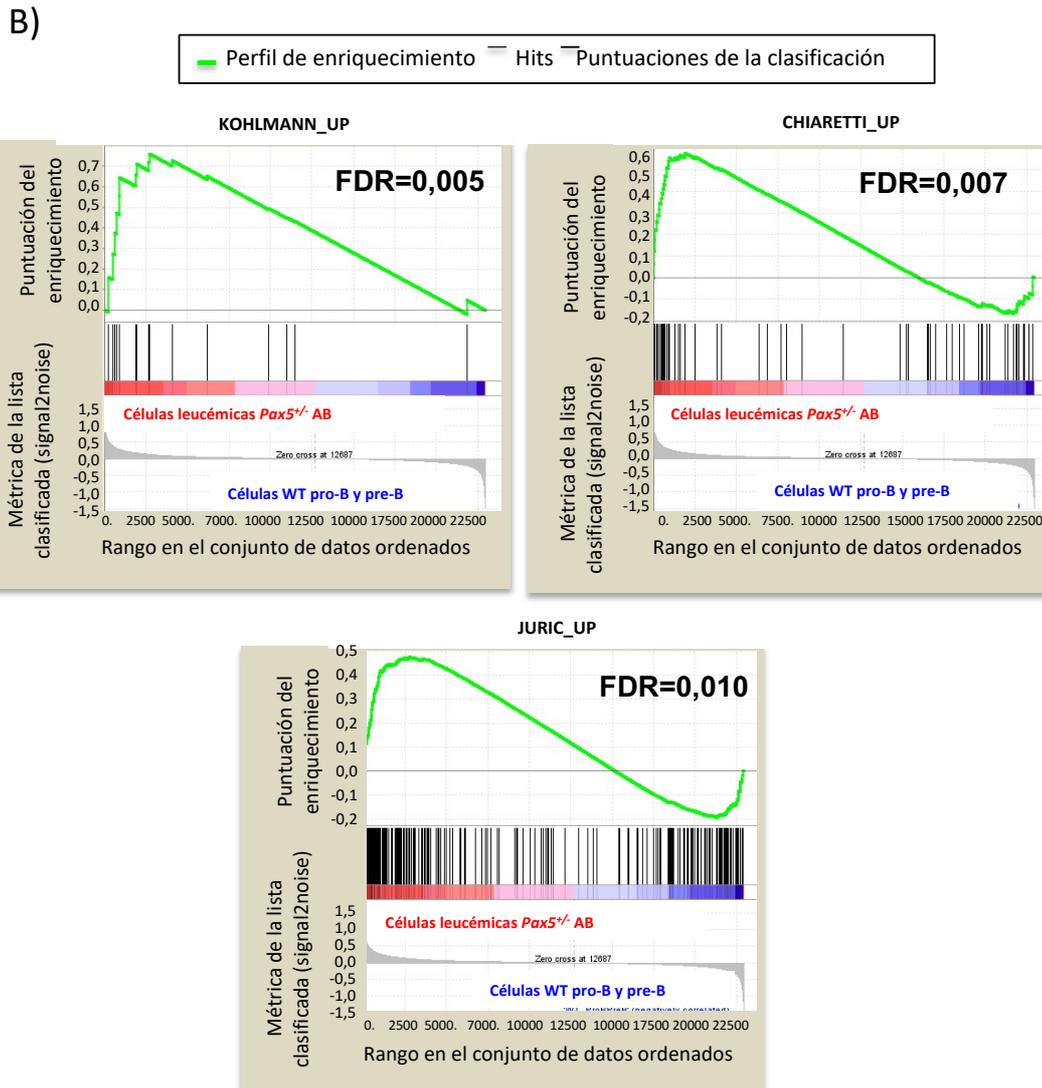


**Figura 23 - Incidencia, fenotipo y expansión de la LLA-B en ratones *Pax5*<sup>+/-</sup> tratados con antibióticos (AB).** **A)** Supervivencia asociada LLA-B de ratones WT tratados (línea azul continua, n=18), ratones *Pax5*<sup>+/-</sup> no tratados (línea verde continua, n=12) y ratones *Pax5*<sup>+/-</sup> tratados con antibióticos (línea verde punteada, n=27). Las líneas negras verticales representan la edad a la que animales fueron sacrificados. Los p-valores se corresponden a los obtenidos por análisis Log-rank (Mantel-cox): p-valor < 0,0001 comparando supervivencia de ratones *Pax5*<sup>+/-</sup> no tratados versus ratones WT tratados, y p-valor: 0,0007 comparando ratones *Pax5*<sup>+/-</sup> tratados con antibióticos versus WT tratados. **B)** Ejemplos representativos del análisis de citometría de flujo de sangre periférica (primera fila) y médula ósea (segunda fila) de un ratón *Pax5*<sup>+/-</sup> leucémico (primera columna de cada grupo) y otro sano de la misma edad (segunda columna de cada grupo) tratados con antibióticos. En los ejes de las figuras se indica el marcador celular analizado. Se observa la presencia de células leucémicas en los ratones enfermos y la ausencia de células con ese mismo fenotipo en los ratones sanos. **C)** Tinción de hematoxilina y eosina de distintos tejidos de ratón WT sano, *Pax5*<sup>+/-</sup> tratados con antibióticos con LLA-B. Se muestran imágenes de las histologías de bazo, intestino, nódulos linfáticos, riñón, hígado y pulmón. Se aprecia la pérdida de arquitectura normal en los tejidos en ratones con LLA-B en comparación con los ratones sanos. En cada caso se indica la ampliación y la escala. **D)** Análisis de la clonalidad BCR de las leucemias de ratones *Pax5*<sup>+/-</sup> tratados con antibióticos. Se analizaron por PCR el reordenamiento de los genes BCR de células leucémicas de la médula ósea. Como control de policlonalidad del BCR, se utilizaron células B (CD19<sup>+</sup> seleccionadas por sorting) del bazo de ratones WT sanos. Como control negativo se utilizaron células T CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> del timo de ratones WT sanos. Se observa un aumento de la clonalidad en los ratones leucémicos.

## RESULTADOS

El análisis de expresión mediante *microarrays* permitió encontrar 7.032 genes diferencialmente expresados (FDR=0,01) en las células leucémicas de la MO de ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* enfermos (n=9) en comparación con células pre-B y pro-B de la MO de ratones WT sanos (n=4) (**Figura 24 A**). El análisis de enriquecimiento de la expresión demostró que en las leucemias murinas había una sobreexpresión de genes típicos de leucemias B humanas (FDR=0,005, FDR=0,007, FDR=0,010) (**Figura 24 B**).



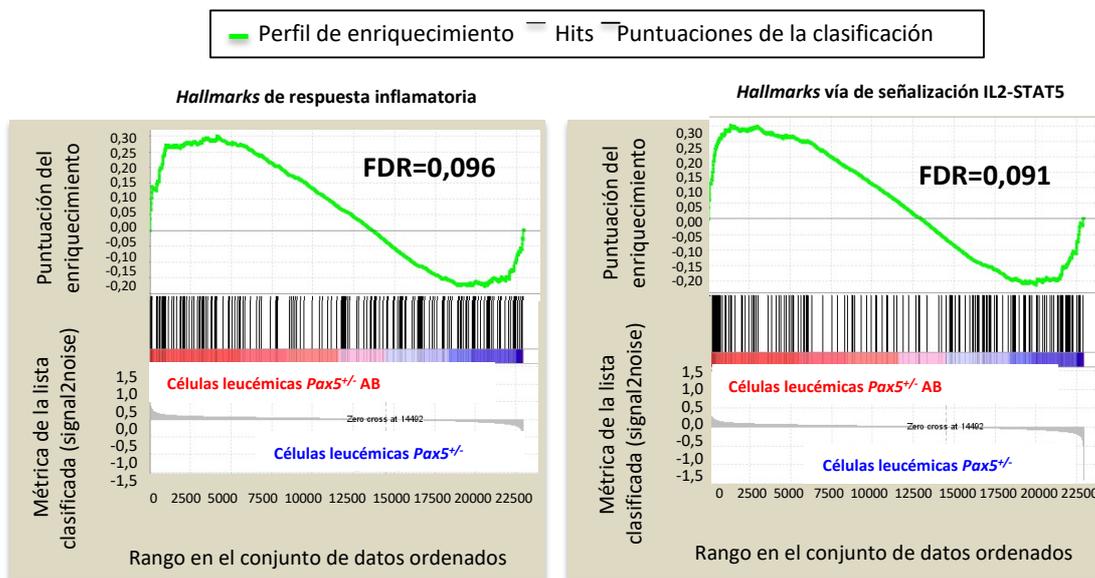


**Figura 24 - Análisis de expresión de células leucémicas de ratones Pax5<sup>+/-</sup> tratados con antibióticos (AB).** A) Heatmap no supervisado que muestra los genes con un patrón de expresión significativamente diferente entre WT sanos (n=4) y Pax5<sup>+/-</sup> tratados con antibióticos con LLA-B (n=9); 7.032 genes mostraron un patrón de expresión diferencial. El análisis de significación de los microarrays se definió por una FDR=0,01%. B) GSEAs mostrando el enriquecimiento de genes típicamente sobreexpresados en leucemias humanas en las LLA-B encontradas en ratones Pax5<sup>+/-</sup> tratados con antibióticos comparado con células WT pro-B y pre-B sanos.

Siguiendo el modelo de dos eventos aceptado para explicar el origen de la LLA-B, la heterocigosidad de *Pax5* no es suficiente para el desarrollo completo de la enfermedad, sino que es necesario una segunda mutación en el clon preleucémico para la aparición de la enfermedad. Con el objetivo de estudiar si las mutaciones secundarias que permitían la aparición de la leucemia en los ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* en los que se había eliminado el microbioma eran similares a las que se observan en ratones del mismo genotipo sin este tratamiento, se llevó a cabo el análisis del exoma completo (WES, del inglés *whole exome sequencing*)

## RESULTADOS

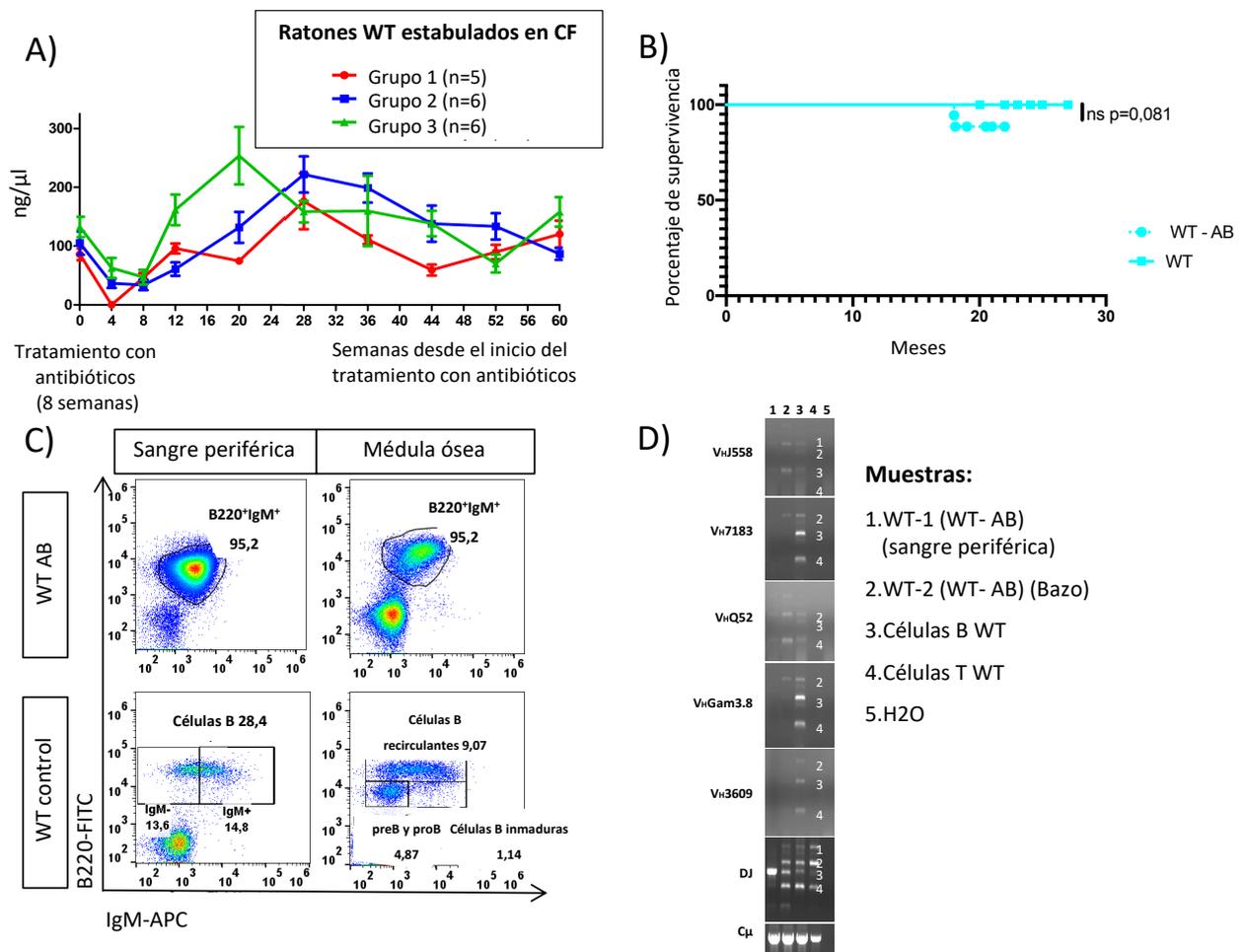
de pares de muestras (una muestra de ADN tumoral extraído del tejido con mayor porcentaje de blastos en el momento del sacrificio, y una muestra de ADN germinal extraído de la cola en estado preleucémico) de 17 ratones *Pax5*<sup>+/-</sup> leucémicos. Se identificaron varias mutaciones recurrentes en LLA-B humanas y mutaciones en los genes *Jak1*, *Jak3* y *Ptpn11* que ya habían sido descritas en ratones *Pax5*<sup>+/-</sup> con leucemia que no habían sido tratados con antibióticos<sup>77,78</sup>. Además, se encontraron mutaciones en genes que no se habían descrito como recurrentes en las leucemias del mismo genotipo sin tratamiento con antibióticos, como las encontradas en los genes *Kit*, *Flt3* y *Cbl*<sup>77,78</sup>. Los datos obtenidos del WES apoyaron los resultados de los análisis de expresión genética, que encontraron 2.119 genes diferencialmente expresados (FDR 0,01), con un aumento de la expresión de genes proinflamatorios y de la vía IL2-STAT5 (**Figura 25**). En general, estos resultados demuestran que el tratamiento con antibióticos no previene el desarrollo de LLA-B en ratones *Pax5*<sup>+/-</sup> en CF, donde los ratones se encuentran expuestos a infecciones comunes.



**Figura 25 - Análisis de enriquecimiento de expresión comparando muestras de ratones *Pax5*<sup>+/-</sup> leucémicos tratados y no tratados con antibióticos (AB). GSEAs mostrando el enriquecimiento de la respuesta inflamatoria y la vía de señalización IL2-STAT5 en ratones *Pax5*<sup>+/-</sup> tratados con antibióticos comparado con ratones del mismo genotipo sin tratamiento con antibióticos.**

Como grupo control, los ratones WT expuestos a infección fueron tratados también con el coctel de antibióticos. La eliminación de las bacterias del microbioma fue confirmada también en estos ratones tras el tratamiento con

antibióticos, como en el caso de los ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* (**Figura 26 A**). Ninguno de los ratones WT estabulados en el CF y tratados con antibióticos durante 8 semanas desarrolló LLA-B, pero 2 de los 18 ratones desarrollaron otros tumores cuando tenían 18 meses (muy cerca de la edad de fin del experimento) (**Figura 26 B**). Los análisis de patología y de inmunofenotipado confirmaron que los tumores eran neoplasias de células B maduras (linfomas), claramente distintas de las LLA-B observadas en los ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* (**Figura 26 C-D**). Estos resultados confirman que la eliminación del microbioma intestinal tiene un papel disparador de la leucemia sólo en ratones con predisposición genética a esta enfermedad.



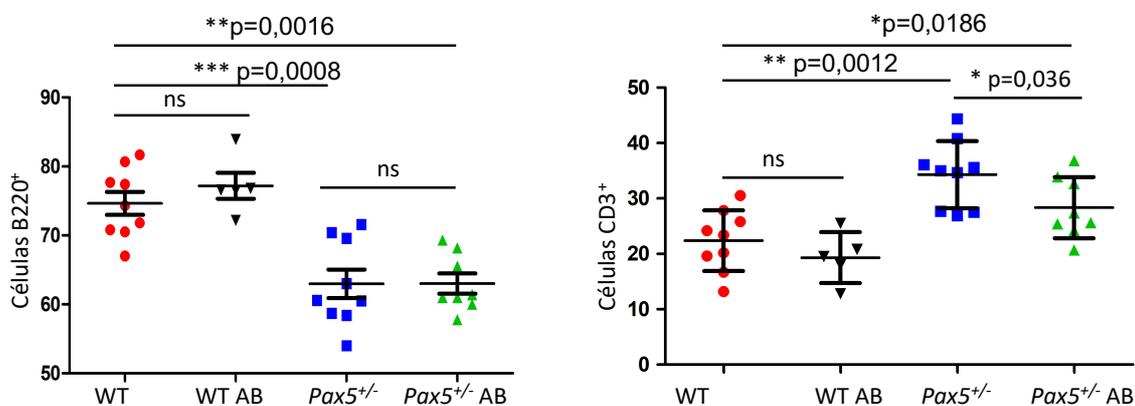
**Figura 26 - Análisis de la enfermedad que la eliminación del microbioma mediada por el uso de antibióticos (AB) provoca en los ratones WT estabulados en CF.** **A)** Representación de la concentración de ADN de las muestras fecales de cada grupo de ratones WT tratados con antibióticos a lo largo del tiempo. Al finalizar el tratamiento con antibióticos (semana 8) la concentración de ADN bacteriano en las heces era prácticamente inexistente. Las concentraciones de ADN bacteriano en las muestras fecales se reestablecieron aproximadamente 1 mes tras finalizar el tratamiento. **B)** Supervivencia asociada al desarrollo de linfomas de ratones WT no tratados (línea azul continua, n=20) y ratones WT tratados con antibióticos (línea azul punteada, n=18). Las figuras representan la edad a la que los animales fueron sacrificados. Los p-valor se corresponden a los obtenidos por análisis Log-rank (Mantel-cox): p-valor 0,081 comparando supervivencia de ratones WT no tratados versus ratones WT tratados. **C)** Ejemplo

## RESULTADOS

representativo del análisis por citometría de flujo de sangre periférica (primera columna) y médula ósea (segunda columna) de un ratón WT tratado con antibiótico (primera fila) y otro sano de la misma edad (segunda fila). En los ejes de las figuras se indica el marcador celular y el fluorocromo conjugado en cada caso. Se observa la presencia de células tumorales en los ratones enfermos y la ausencia de células con ese mismo fenotipo en los ratones sanos. **D)** Análisis de la clonalidad BCR de las células tumorales de ratones WT tratados con antibiótico. Se estudiaron por PCR el reordenamiento de los genes BCR de células tumorales de sangre periférica y bazo de ratón WT enfermo. Como control de policlonalidad del BCR, se utilizaron células B (CD19<sup>+</sup> seleccionadas por sorting) del bazo de ratones WT sanos. Como control negativo se utilizaron células T CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> del timo de ratones WT sanos. No se observa un aumento de la clonalidad en los ratones WT que desarrollaron tumores debido al tratamiento con antibióticos.

### 1.4. El desarrollo de LLA-B asociado a la exposición a patógenos en ratones *Pax5*<sup>+/-</sup> es independiente de la acción o presencia de células T

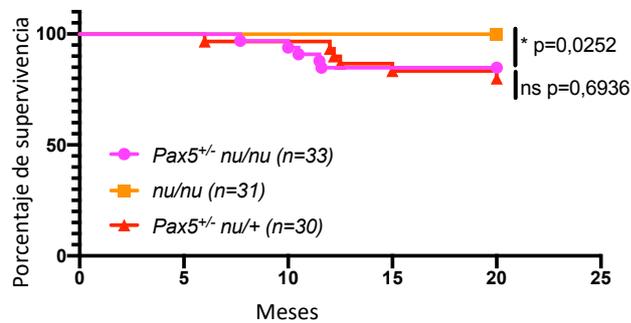
Cuando se analizó la composición hematopoyética de las placas de Peyer en los ratones *Pax5*<sup>+/-</sup> tras el tratamiento con antibióticos, no se observaron cambios significativos en el número de células B, pero sí se observó una disminución significativa del número de células T en comparación con ratones del mismo genotipo sin tratamiento con antibióticos (**Figura 27**). En la bibliografía se han descrito asociaciones de la disminución de células T con una reducción de la inmunidad antitumoral<sup>190</sup>, por lo que en este punto se pensó que el efecto del tratamiento con antibióticos en el desarrollo de la leucemia podría deberse a esta disminución.



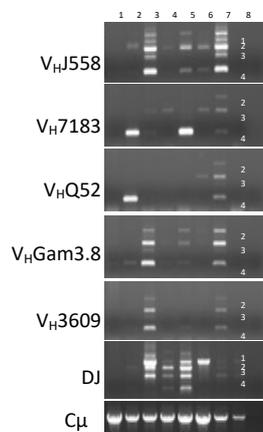
**Figura 27 - Porcentaje de células B (B220<sup>+</sup> IgM<sup>+/-</sup>) y células T (CD3<sup>+</sup>) en las placas de Peyer de ratones *Pax5*<sup>+/-</sup> y ratones WT tratados con antibióticos (AB) de la misma edad.** Análisis estadístico de los porcentajes de células B y T en las placas de Peyer de ratones *Pax5*<sup>+/-</sup> (n=4) y ratones WT (n=5) tratados con antibióticos y ratones *Pax5*<sup>+/-</sup> (n=9) y ratones WT (n=9) no tratados de la misma edad. Se observó una disminución estadísticamente significativa del número de células T en las placas de Peyer de los ratones *Pax5*<sup>+/-</sup> tratados con antibióticos en comparación con ratones del mismo genotipo sin tratamiento (p-valor=0,036). Esta disminución no se observó en ratones WT tratados versus no tratados ni tampoco en las células B comparando con y sin tratamiento con antibióticos en ninguno de los dos genotipos. Las barras horizontales representan la media y la desviación estándar. Los p-valor corresponden a los obtenidos por test t no pareado.

Para demostrar si esto era así, se cruzaron ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* con ratones carentes timo y de células T (ratones *nu/nu*). La descendencia de ese cruce generada en animalario SPF fue mantenida allí hasta su traslado a CF. Como control, se generaron ratones WT *nu/nu*. El 15% (5 de los 33) de los animales *Pax5<sup>+/-</sup> nu/nu* desarrollaron LLA-B, pero ninguno de los WT *nu/nu* (n=31) desarrolló la enfermedad (**Figura 28 A**). La incidencia de leucemia en los ratones *Pax5<sup>+/-</sup> nu/nu* es similar a la que se observa en ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* que sí producen células T (*Pax5<sup>+/-</sup> nu/+*), y en ambos genotipos la leucemia apareció entre los 7 y los 12 meses de edad. En ambos grupos, la LLA-B se diagnosticó por la aparición de blastos en la SP, que se extendían por los tejidos hematopoyéticos (MO, bazo y NL) e infiltraban otros tejidos como el hígado, los riñones y los pulmones (**Figura 28 C**). Las células leucémicas de los ratones *Pax5<sup>+/-</sup> nu/nu* mostraron un fenotipo similar al de las leucemias *Pax5<sup>+/-</sup>*: CD19<sup>+/-</sup> B220<sup>+</sup> IgM<sup>-</sup> cKit<sup>+/-</sup> CD25<sup>+/-</sup>. Todas las LLA-B mostraron un reordenamiento clonal del BCR, consistente con un origen celular B inmaduro (**Figura 28 B**).

A)

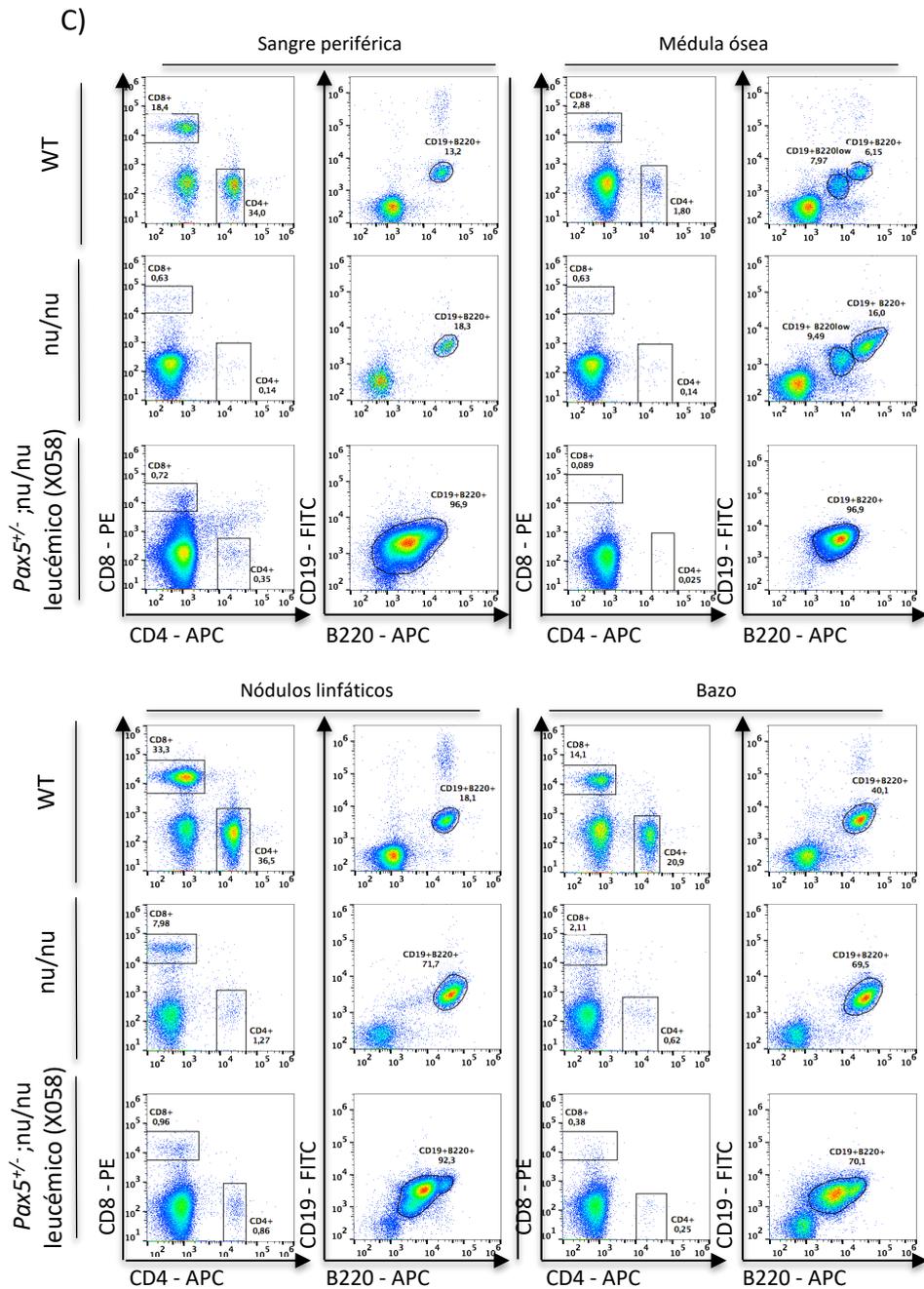


B)



Muestras:

- X057 (MO)
- X058 (MO)
- X644 (LN)
- V680 (MO)
- V480 (MO)
- V389 (MO)
- Células B WT
- Células T WT
- H2O



**Figura 28 – Análisis de la supervivencia y fenotipo de las LLA-B que desarrollaron los ratones Pax5<sup>+/-</sup> con inmunodeficiencia asociada a la ausencia de células T. A)** Supervivencia asociada al desarrollo de LLA-B de ratones Pax5<sup>+/-</sup> nu/nu (línea rosa, n=33), ratones Pax5<sup>+/-</sup> nu/+ (línea roja, n=30) y ratones nu/nu (línea naranja, n=31). Las figuras representan la edad a la que los animales fueron sacrificados. Los p-valores se corresponden a los obtenidos por análisis Log-rank (Mantel-cox): p-valor 0,0252 comparando supervivencia de ratones Pax5<sup>+/-</sup> nu/nu versus ratones nu/nu, y p-valor 0,6936 comparando supervivencia de ratones Pax5<sup>+/-</sup> nu/nu versus ratones Pax5<sup>+/-</sup> nu/+. **B)** Análisis de la clonalidad BCR (del inglés B-cell receptor) de las leucemias de ratones Pax5<sup>+/-</sup> nu/nu (n=3) y ratones Pax5<sup>+/-</sup> nu/+ (n=3). Se estudiaron por análisis de PCR del reordenamiento de los genes BCR de células tumorales de médula ósea y nódulos linfáticos. Como control de policlonalidad del BCR se utilizaron células B (seleccionadas por sorting CD19<sup>+</sup>) del bazo de ratones WT sanos. Como control negativo se utilizaron células T CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> del timo de ratones WT sanos. Se observa un aumento de la clonalidad en los ratones que desarrollaron LLA-B. **C)** Ejemplos representativos de análisis por citometría de flujo de sangre periférica, médula ósea, nódulos linfáticos y bazo de un ratón Pax5<sup>+/-</sup> nu/nu leucémico, un ratón nu/nu sano y un ratón WT sano, de edades similares. En los ejes de las figuras se indica el marcador celular y el fluorocromo conjugado en cada caso. Se observa

*la presencia de células tumorales en los ratones enfermos y la ausencia de células con ese mismo fenotipo en los ratones sanos. Se aprecia también la ausencia de células T en los ratones Pax5<sup>+/-</sup> nu/nu y WT nu/nu.*

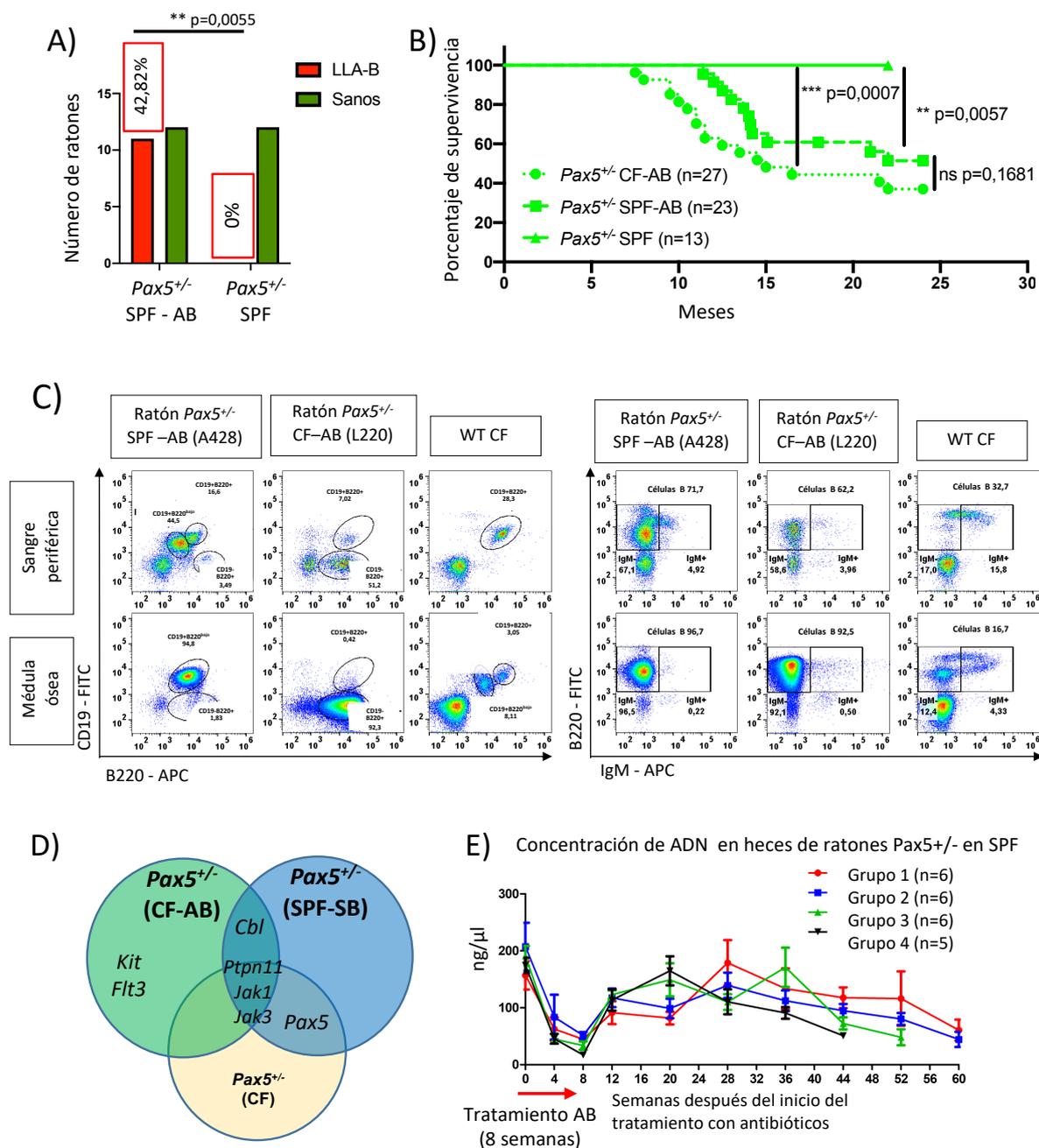
Estos resultados sugieren que el desarrollo de LLA-B asociado a la exposición a infección en los ratones Pax5<sup>+/-</sup> no depende de la presencia de células T.

### 1.5. La eliminación del microbioma intestinal promueve el desarrollo de LLA-B en ratones Pax5<sup>+/-</sup> en ausencia de estímulo infeccioso

Hasta ahora los datos del estudio demostraban que el tratamiento con antibióticos durante 8 semanas no era suficiente para prevenir el desarrollo de LLA-B asociado a la exposición a infecciones comunes. En este punto, se hipotetizó sobre la posibilidad de que la eliminación del microbioma intestinal podría tener un efecto inductor de la enfermedad. Siguiendo esta idea, se pensó que la eliminación del microbioma tras el tratamiento con antibióticos podría también conducir al desarrollo de leucemia en ausencia del estímulo infeccioso.

Para este experimento se generó una nueva cohorte de ratones Pax5<sup>+/-</sup> (n=23) nacidos y mantenidos en el animalario SPF durante todo el experimento. Estos ratones fueron tratados con antibióticos durante 8 semanas. Como grupo control, se generó otra cohorte de ratones del mismo genotipo, mantenidos en las mismas condiciones, pero sin el tratamiento con antibióticos (n=12). De los 23 ratones Pax5<sup>+/-</sup> tratados con antibióticos, 11 desarrollaron la LLA-B (47,82%) entre los 11,4 y los 20,7 meses de edad, pero ninguno de los ratones sin tratamiento con antibióticos desarrolló la enfermedad (**Figura 29 A-B**). Desde un punto de vista fenotípico, histológico, de clonalidad y de características genéticas, estas leucemias eran similares a las que se desarrollaron en ratones Pax5<sup>+/-</sup> expuestos a infecciones comunes (**Figura 29 C-D**).

## RESULTADOS



**Figura 29 - Incidencia, fenotipo y mutaciones secundarias de las LLA-B desarrolladas por los ratones Pax5<sup>+/-</sup> tras la eliminación del microbioma mediante el tratamiento con antibióticos (AB) en el animalario SPF.** **A)** Números de ratones Pax5<sup>+/-</sup> sanos (verde) y enfermos de LLA-B (rojo) tratados y no tratados con antibióticos en el animalario SPF. Se observa un aumento significativo ( $p=0,0055$ ) del porcentaje de casos de leucemia en ratones tratados. En recuadros rojos se indica la incidencia de LLA-B en cada grupo de animales. Los p-valores corresponden a los obtenidos con el test de Fisher. **B)** Supervivencia asociada al desarrollo de LLA-B de ratones Pax5<sup>+/-</sup> mantenidos en animalario SPF sin tratamiento con antibióticos (línea verde continua,  $n=13$ ), ratones Pax5<sup>+/-</sup> tratados con antibióticos y mantenidos en el animalario SPF (línea verde discontinua,  $n=23$ ) y ratones Pax5<sup>+/-</sup> tratados con antibióticos y mantenidos en CF (línea verde punteada,  $n=27$ ). Las figuras representan la edad a la que los animales fueron sacrificados. Los p-valores se corresponden a los obtenidos por análisis Log-rank (Mantel-cox): p-valor 0,0057 comparando supervivencia de ratones Pax5<sup>+/-</sup> tratados con antibióticos en animalario SPF versus no tratados en el mismo animalario, y p-valor 0,0007 comparando supervivencia de ratones Pax5<sup>+/-</sup> tratados con antibióticos en CF versus no tratados en animalario SPF. **C)** Ejemplos representativos de análisis por citometría de flujo de sangre periférica y médula ósea de un ratón Pax5<sup>+/-</sup> leucémico tratado con antibióticos y mantenido en animalario SPF, un ratón Pax5<sup>+/-</sup> leucémico tratado con antibióticos y mantenido en CF y un ratón WT sano, de edades similares. En los ejes de las figuras se indica el marcador celular

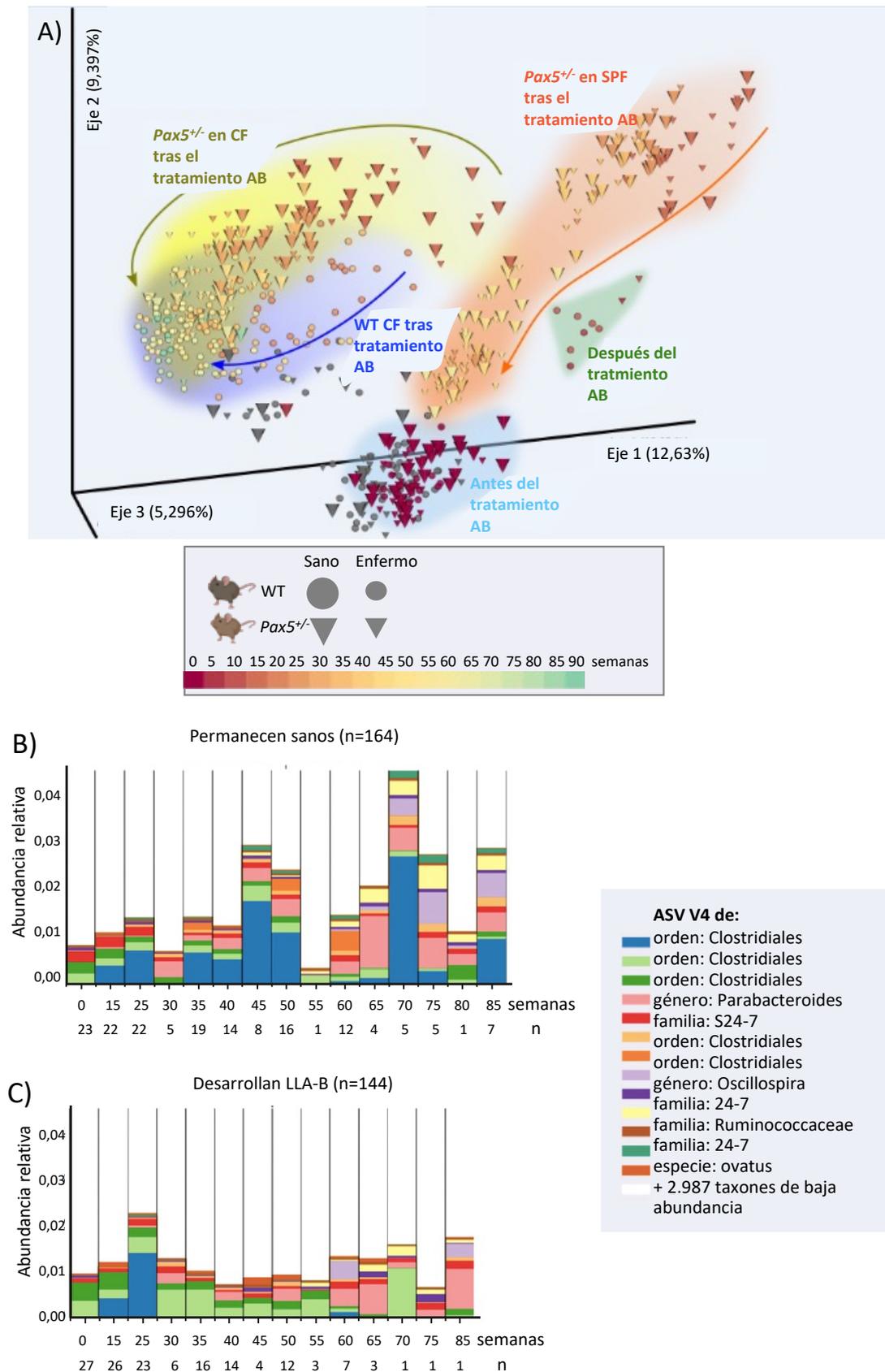
utilizado en cada caso. Se observa la presencia de células tumorales en los ratones enfermos y la ausencia de células con ese mismo fenotipo en los ratones sanos. **D)** Diagrama de Venn ilustrativo de las mutaciones recurrentes encontradas en células leucémicas *Pax5<sup>+/-</sup>* identificadas por secuenciación del exoma completo. Se comparan las mutaciones de las leucémicas desarrolladas por ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* tratados con antibióticos en CF y SPF y con las de ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* sin tratamiento con antibióticos **E)** Representación de la concentración de ADN de las muestras fecales de cada grupo de ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* tratados con antibióticos en el animalario SPF a lo largo del tiempo. Al finalizar el tratamiento con antibióticos (semana 8), la concentración de ADN en las heces era prácticamente inexistente. Las concentraciones de ADN bacteriano en las muestras fecales se reestablecieron aproximadamente 1 mes tras finalizar el tratamiento.

Estos resultados sugieren que un microbioma intestinal intacto protege frente al desarrollo de LLA-B en ratones genéticamente predispuestos, y que, por tanto, la alteración de este microbioma a través del tratamiento con antibióticos puede disparar la incidencia de la leucemia incluso en ausencia del estímulo infeccioso habitualmente necesario para la aparición de la enfermedad en ratones *Pax5<sup>+/-</sup>*.

### 1.6. La composición del microbioma intestinal es diferente en ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* sanos y ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* que desarrollan la leucemia

En este punto se quiso comprobar si el microbioma de los ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* que desarrollaban leucemia era distinto de aquellos del mismo genotipo que se mantenían sanos. Para ello, primero se comprobó que, tras el tratamiento con antibióticos, el microbioma intestinal se regeneraba de manera diferente en los ratones WT y los ratones *Pax5<sup>+/-</sup>*. Después, se comparó el microbioma de los ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* que desarrollaban leucemia (144 muestras fecales) y los que no (164 muestras fecales). Aplicando un FDR discreto a lo largo del tiempo, se identificaron 42 de las 3.983 ASV del V4 identificadas que tenían una abundancia diferencial en la fase preleucémica comparando estos dos escenarios (**Figura 30**).

## RESULTADOS



**Figura 30 – Gráficas representativas de las diferencias en el microbioma debido al tratamiento con antibióticos (AB) y entre ratones que desarrollan leucemia y ratones que permanecen sanos. A) La beta-diversidad del microbioma se reconstituye tras el tratamiento con antibióticos en una dirección u otra en función del genotipo del ratón (WT en azul y *Pax5<sup>+/-</sup>* en amarillo). Las distancias de beta-diversidad en**

términos UniFrac cualitativo por pares se computaron para todas las muestras. La métrica y las distancias se dispusieron en 3D vía análisis de componentes principales utilizando EMPeror. Los ejes indican los porcentajes de variación explicados. Los círculos y los triángulos se utilizaron para representar el microbioma de WT y Pax5<sup>+/-</sup>, respectivamente, y el tamaño de las figuras representa si desarrollaron la enfermedad o permanecieron sanos (grandes y pequeños, respectivamente). Las muestras iniciales (rojo oscuro) tomadas al trasladar los animales a CF, se agruparon en la región azul clara (antes del tratamiento). Tras 8 semanas de tratamiento con antibióticos, las muestras con suficientes lecturas de ADN bacteriano se agruparon en la región verde (región AB). Después, las muestras demostraron una reconstitución del microbioma dependiente del genotipo (WT en azul, Pax5<sup>+/-</sup> en amarillo) a lo largo del tiempo, hacia un punto final cercano, significativamente distinto del que se observaba antes del tratamiento. Sin embargo, este cambio no ocurre así para los ratones que permanecieron en animalario SPF (trayectoria naranja). **B) y C)** Firmas microbianas de ASVs de la región V4 del ARNr 16S, diferentes entre ratones Pax5<sup>+/-</sup> sanos (B) y enfermos (C) Se muestra la media de la composición del microbioma según los 13 rasgos más abundantes que se encuentran en cantidades distintas según el estado de salud de los animales. Se agruparon las muestras por tiempo (eje X) y se representa cada una en una barra acumulativa. Se aplicó un clasificador Bayesiano contra la base de referencia GreenGenes 13.8 para asignar las etiquetas taxonómicas a las ASVs de la V4.

También se contempló la posibilidad de que un solo microorganismo podría ser el que estuviese ocasionando la aparición de la leucemia en los ratones Pax5<sup>+/-</sup>. Sin embargo, el análisis por secuenciación del ARNr 16S completo no pudo identificar ningún microorganismo que estuviese directa y exclusivamente relacionado con el desarrollo de esta enfermedad (**Figura 14**). Tras el análisis se comprobó que es la composición general, y en particular de la ausencia de microorganismos, lo que está significativamente asociado con el desarrollo de la LLA-B (**Figura 29 B y C**).

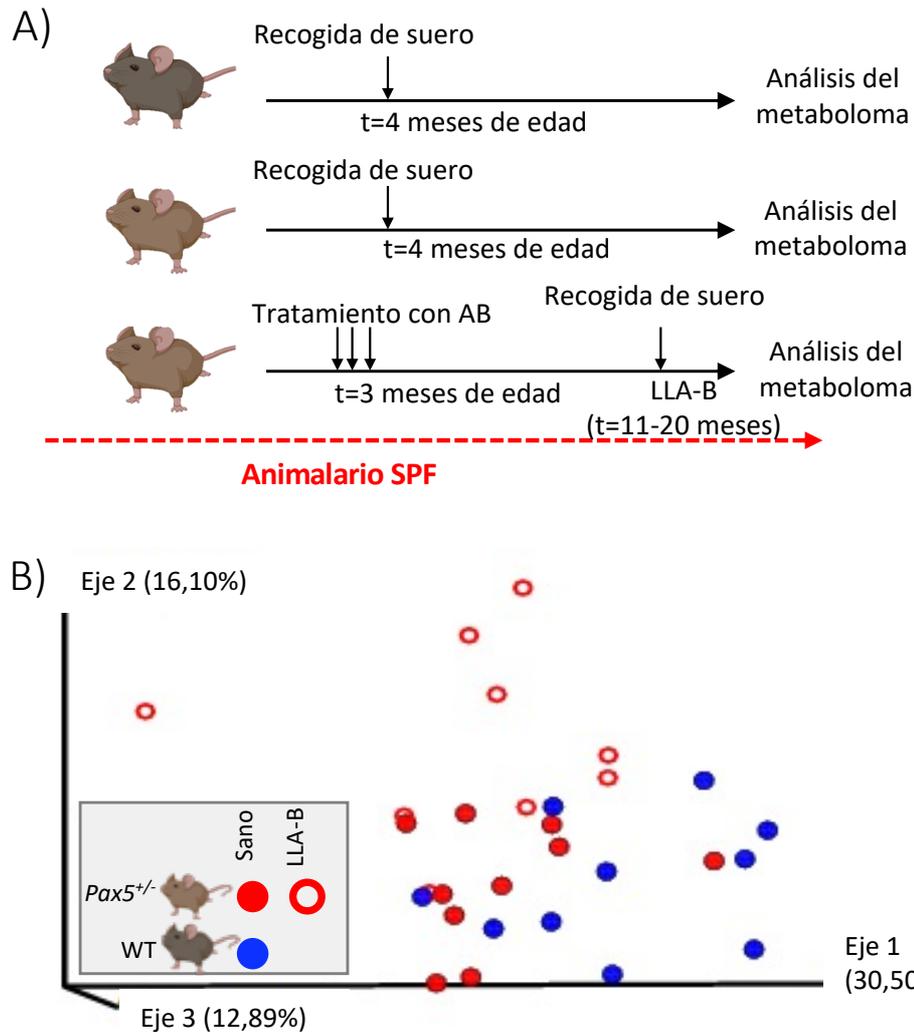
Estos hallazgos relacionan la predisposición genética y la eliminación del microbioma específicamente en los ratones Pax5<sup>+/-</sup> que desarrollan la LLA-B tras la exposición a infecciones. De esta manera, se concluye que el microbioma intestinal podría utilizarse como un marcador temprano para identificar ratones genéticamente predispuestos que estén en riesgo de desarrollar leucemia.

### 1.7. La disbiosis en los ratones Pax5<sup>+/-</sup> se traduce en un metaboloma distinto

A continuación, se investigó si la composición del metaboloma en el suero de los ratones podría permitirnos identificar la predisposición genética a la LLA-B. Para comprobarlo, se analizó el metaboloma de 10 ratones WT, 10 ratones Pax5<sup>+/-</sup> sanos (preleucémicos) y 10 ratones Pax5<sup>+/-</sup> con leucemia, todos mantenidos en animalario SPF. El análisis se llevó a cabo usando cromatografía de gas y espectrometría de masas (GC-MS, del inglés *gas chromatography and mass spectrometry*) midiéndose 56 compuestos diferentes en el suero (**Figura**

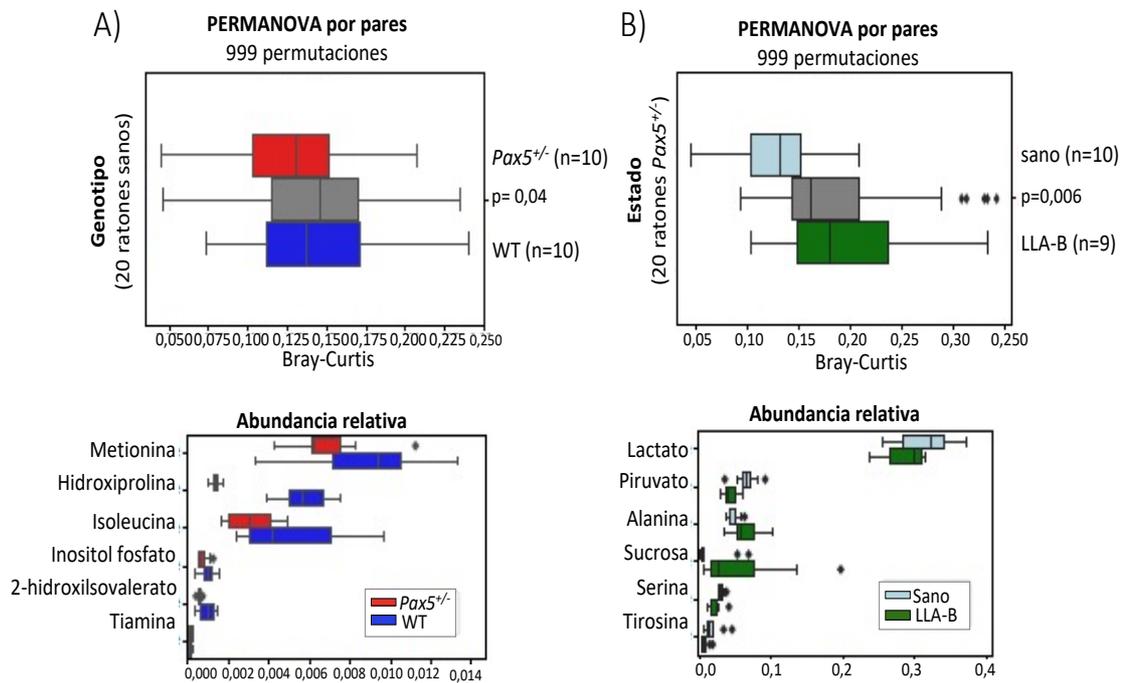
## RESULTADOS

31). Para el análisis final se eliminaron 4 picos que eran imprecisos y los valores relativos de los otros 52 picos de cromatografía de gas se utilizaron para crear una tabla de características. Usando la disimilitud de Bray-Curtis, se computó la matriz de distancia de beta-diversidad con el programa Qiime2 versión 2020.2. El análisis de componentes principales de la matriz resultante indicó un agrupamiento por genotipo y estado de salud.



**Figura 31 – Diseño experimental y análisis de componentes principales de los 52 picos de cromatografía de gases de alta calidad para el análisis de metabolitos en suero. A)** Diseño experimental. Las muestras de suero se recogieron de ratones WT no tratados ( $n=10$ ), Pax5<sup>+/-</sup> no tratados ( $n=10$ ) y de ratones Pax5<sup>+/-</sup> tratados con antibióticos que desarrollaron LLA-B (aproximadamente a los 15 meses,  $n=10$ ), todos mantenidos en el animalario SPF. **B)** Análisis de componentes principales definido con EMPeRor de la matriz de distancias de beta-diversidad, computadas con Qiime2 versión 2020.2 (estadístico Bray-Curtis). Se utilizaron los valores de los 52 picos de GC con suficiente calidad para crear la tabla de características. Los círculos abiertos representan los ratones leucémicos, y los rellenos los ratones sanos. La agrupación que se observa indica una diferenciación por genotipo en las medidas de los 52 metabolitos en sangre.

El test estadístico (test bilateral PERMANOVA con 999 permutaciones) mostró diferencias significativas en la beta diversidad comparando el metaboloma de ratones WT y ratones *Pax5<sup>+/-</sup>*. Aplicando la FDR discreta en la tabla de metabolitos, se encontró que 6 de los 52 compuestos tenían una abundancia significativamente distinta entre los ratones WT y los *Pax5<sup>+/-</sup>* preleucémicos. Otros 16 compuestos presentaban diferencias en el suero de ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* sanos en comparación con ratones del mismo genotipo con leucemia (Figura 32).



**Figura 32 - Análisis estadístico PERMANOVA con 999 permutaciones de las diferencias en la composición del metaboloma en los distintos genotipos y estado de salud.** **A)** El panel superior muestra el análisis estadístico PERMANOVA bilateral con 999 permutaciones con resultado significativo de diferencias en las distancias de la beta-diversidad entre muestras sanguíneas de ratones WT (azul) y *Pax5<sup>+/-</sup>* (rojo). El panel inferior muestra los 6 compuestos de entre los 52 analizados que por aplicación del FDR discreto mostraron una abundancia diferencial en los dos genotipos. **B)** El panel superior muestra el análisis estadístico PERMANOVA bilateral con 999 permutaciones con resultado significativo de diferencias en las distancias de la beta-diversidad entre muestras sanguíneas de ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* sanos (azul claro) y enfermos (verde). El panel inferior muestra los 6 compuestos con mayores diferencias de entre los 16 que por aplicación del FDR discreto a los 52 metabolitos analizados mostraron una abundancia diferencial en los dos estados. Las cajas muestran los cuartiles, y las barras de error el resto de la distribución, excepto por los puntos exteriores denominados outliers, usando un rango intercuartil de 1,5. Los p-valores son los obtenidos por aplicación del test PERMANOVA.

Estos resultados demuestran que el metaboloma de ratones preleucémicos es distinto al de ratones leucémicos, y además está definido por varios factores más que por un simple metabolito o especie bacteriana.

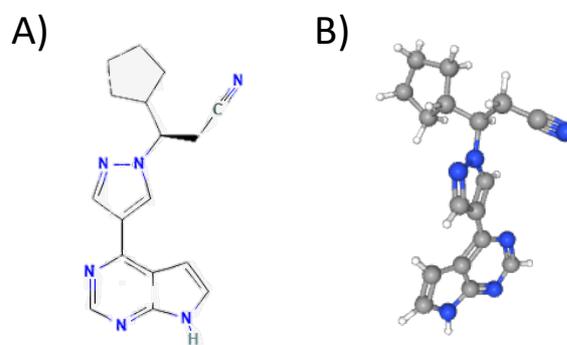
## RESULTADOS

---

En vista de estos resultados, finalmente se concluyó que la alteración de la composición del microbioma mediante el uso de antibióticos dispara la aparición de la leucemia, incluso en ausencia de infección. Los resultados del análisis del microbioma demuestran que una predisposición genética a la LLA-B define un microbioma distinto. Este hallazgo podría permitir establecer el microbioma como un biomarcador para identificar sujetos con riesgo de desarrollar LLA-B.

## 2. La inhibición transitoria de la vía JAK/STAT previene el desarrollo de la leucemia linfoblástica de células B en ratones con predisposición genética

Estudios previos habían demostrado que en un gran número de casos las LLA-B *Pax5<sup>+/-</sup>* se desarrollan tras la acumulación de mutaciones en la vía JAK/STAT en las células preleucémicas bajo la presión selectiva de la exposición a infección<sup>78</sup>. En estudios *in vitro* se demostró que las células *Pax5<sup>+/-</sup>* son más sensibles a la ausencia de IL-7 que las células WT, y solo mediante la adquisición de mutaciones en la vía JAK/STAT consiguen sobreponerse a esa carencia y volverse IL-7-independientes. Por otro lado, también se demostró que la aplicación de inhibidores JAK incrementaba la muerte celular en esas células *Pax5<sup>+/-</sup>*<sup>78</sup>. Teniendo en cuenta estos resultados *in vitro*, se propuso que la LLA-B podría ser el resultado de la aparición de un compartimento B inmaduro aberrante que es sensible a la IL-7 y además susceptible a la transformación maligna gracias a la acumulación de mutaciones en la vía JAK/STAT. De esta manera, se planteó el uso de inhibidores esta vía en el modelo de ratón, para comprobar si la inhibición de la ruta tiene efectos preventivos *in vivo* al actuar específicamente contra el compartimento preleucémico, que es el compartimento sensible a la IL-7. Con el fin de inhibir la vía de JAK/STAT, ruxolitinib fue el fármaco seleccionado, ya que su uso está aprobado para varios desórdenes hematológicos y, por consiguiente, su seguridad y efectividad están parcialmente demostradas<sup>114,117,119</sup> (**Figura 33**).



**Figura 33 – Estructura química de ruxolitinib. A) Estructura 2D. B) Estructura 3D.**

## RESULTADOS

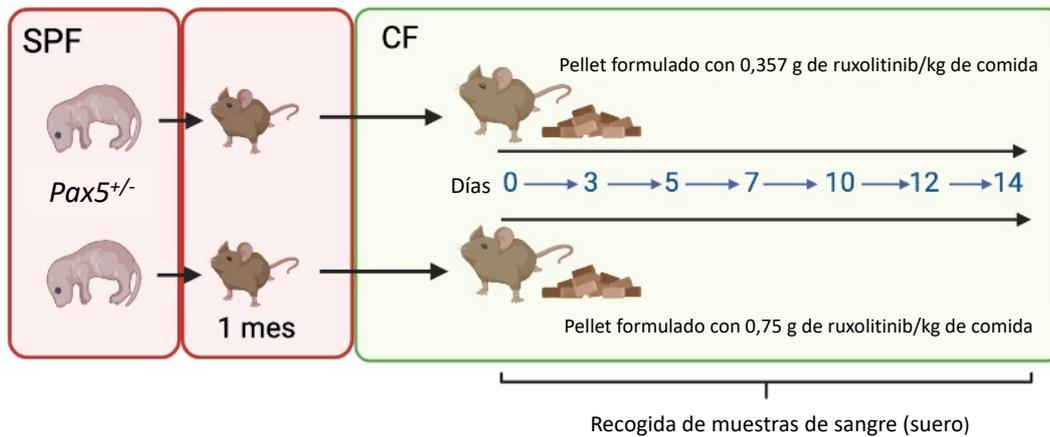
---

### 2.1. Estudio piloto para la determinación de la concentración de ruxolitinib

El primer paso fue determinar la concentración de fármaco que se debería utilizar, para lo que se llevó a cabo un estudio piloto de farmacocinética. Se buscaba alcanzar una concentración de ruxolitinib suficiente como para que inhibiese la vía JAK/STAT pero que no alcanzase los niveles de toxicidad que provocasen una intensa inmunosupresión, que podría provocar defectos en la hematopoyesis e infecciones graves en los ratones. Gracias a las propiedades de farmacocinética y químicas del ruxolitinib <sup>195</sup>, el fármaco reúne las condiciones óptimas para ser formulado junto con la comida. Así, gracias a una formulación de la empresa Novartis, el fármaco se incluyó en el pienso de los ratones y se suministró *ad libitum*. De esta manera, no se realizó un procedimiento invasivo para la administración del medicamento, reduciendo el estrés al que pudieron estar sometidos los animales.

Basándose en la bibliografía publicada del uso de ruxolitinib en humanos y en ratones, la concentración útil en sangre debería ser superior a 1  $\mu\text{M}$  en la fase activa de los ratones (la fase de oscuridad). Revisiones de la bibliografía señalaban que el uso de CHZ868 (un inhibidor de JAK2) es tolerado por ratones inmunodeficientes (NGS del inglés, *NOD scid gamma mouse*) en una dosis de 30 mg/kg/día hasta 25 días, y en ratones inmunocompetentes hasta 44 días sin que haya efectos secundarios visibles en el recuento de células en la sangre<sup>196</sup>. Respecto al uso concreto de ruxolitinib, ratones C57BL/6 trasplantados con células con una mutación activadora de JAK2 resistieron dosis de 90 mg/kg bid (del latín "*bid in die*", dos veces al día) durante 30 días sin tener efectos secundarios asociados al uso de este fármaco ni disminución de peso por el tratamiento<sup>197,198</sup>. En humanos, ruxolitinib se ha usado en el tratamiento de la mielofibrosis durante más de 5 años sin efectos graves, y cuando estos aparecen (en especial citopenias) son manejables haciendo ajustes de dosis<sup>114</sup>. Se ha utilizado también en rechazo de trasplantes en adultos y adolescentes durante más de un año sin efectos secundarios <sup>199</sup>.

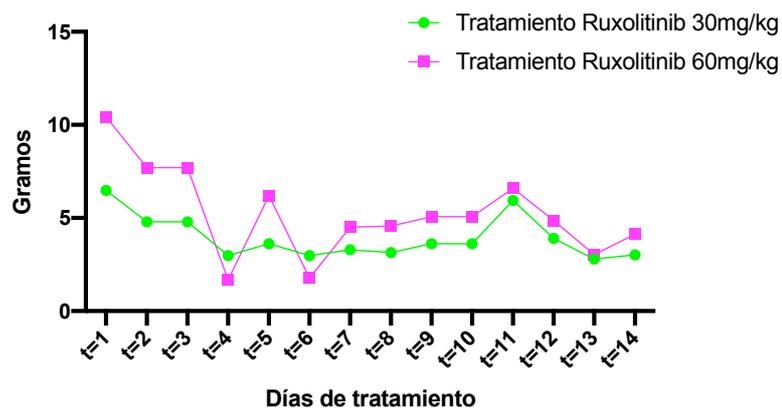
Con estos datos, se inició un estudio piloto (**Figura 34**) para comprobar qué cantidad de fármaco debería formularse en el pienso de los animales. En base a datos de la literatura, se testaron inicialmente dos dosis del fármaco que habían demostrado ser bien toleradas en ratones. Inicialmente se trataron 5 ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* con 0,375 gramos de ruxolitinib por kilogramo de comida durante 14 días y otros 5 ratones de las mismas características con 0,75 gramos por kilogramo de comida de comida.



**Figura 34 – Esquema del diseño experimental para el estudio piloto: 10 ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* nacieron en SPF y fueron mantenidos ahí hasta el primer mes de edad, momento en el que se trasladaron a CF. Se trataron con ruxolitinib mediante la alimentación con pienso que incluía el fármaco (formulado por Novartis). Cinco ratones fueron tratados con cada dosis de ruxolitinib: 0,375g de ruxolitinib/kg de comida o 0,75g de ruxolitinib/kg de comida.**

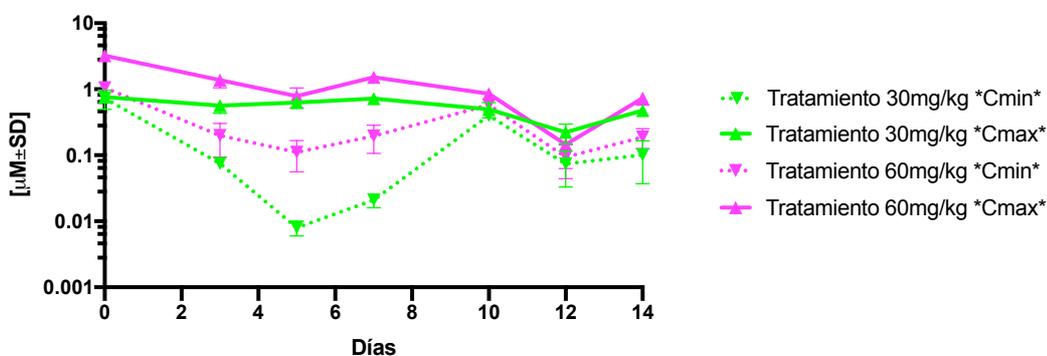
La disposición *ad libitum* de comida que tienen los ratones exigió pesar cada día la cantidad de comida sobrante para calcular el consumo diario por jaula y por ratón, lo que permitiría calcular cual era el consumo medio de comida por cada ratón (sabiendo que en cada jaula había 5 ratones). De esta manera, se determinó que el consumo medio fue de 4 gramos de pienso por ratón y día (**Figura 35**). Así, la formulación de 0,375 mg/kg supone, en un ratón medio de 25 gramos de peso, una administración de 60 mg de ruxolitinib por kilogramo de ratón por día o 30 mg/kg/bid (referida de ahora en adelante como dosis de 30 mg/kg). La concentración de 0,75 mg de ruxolitinib/kg de comida supone 120 mg/kg/día o 60 mg/kg/bid (referida en adelante como dosis de 60 mg/kg).

## RESULTADOS



**Figura 35 - Gráfica del consumo de comida en gramos por ratón en las distintas dosis de tratamiento.** Cada día se puso la misma cantidad de comida y al final del día se pesó la comida sobrante. Después se extrapoló el consumo de comida de jaula a consumo por animal, teniendo en cuenta que había 5 animales por jaula.

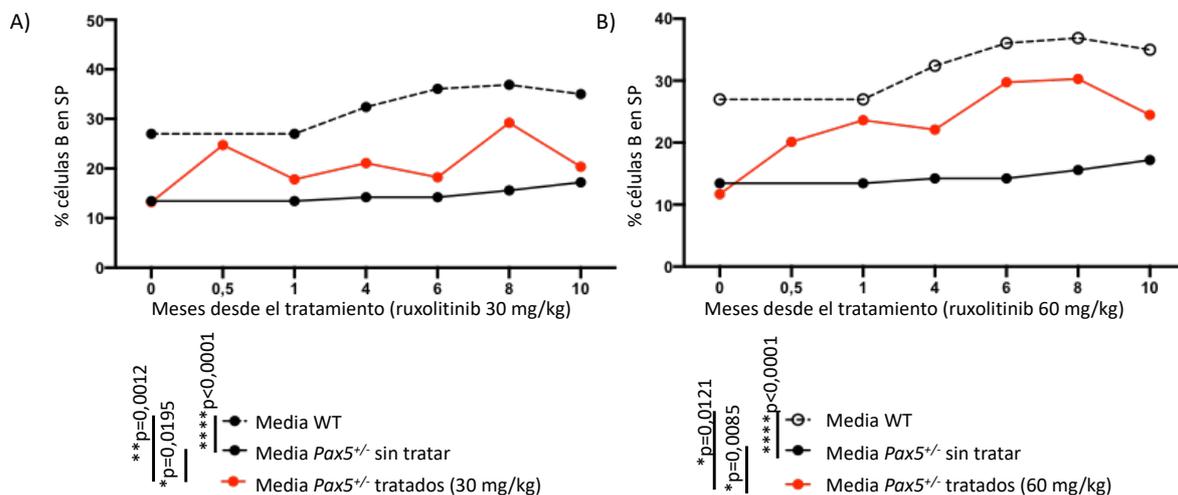
Durante estos 14 días se recogieron muestras sanguíneas de cada ratón tres veces a la semana dos veces al día: dos horas después del inicio de la fase activa o fase oscura, cuando se alcanza la concentración máxima de fármaco en sangre ( $C_{\max}$ ) y dos horas antes del inicio de la fase activa ( $C_{\min}$ ). Estas muestras se utilizaron para determinar la concentración sanguínea del fármaco mediante cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem. El análisis de concentración reveló que, con la dosis de 60 mg/kg, en el momento de concentración máxima los valores estaban entre 1 y 3  $\mu\text{M}$  en sangre, aproximándose a los valores de la bibliografía y estando cerca de lo esperado en comparación con otros fármacos utilizados por vía oral. Sin embargo, con la concentración de 30 mg/kg los valores en sangre eran menores, en torno a 0,5  $\mu\text{M}$  en el momento máximo, siendo una concentración insuficiente de fármaco para que hubiese un efecto inmunomodulador (**Figura 36**).



**Figura 36 – Gráfica representativa de la media de concentración de ruxolitinib en sangre periférica ( $\mu\text{M} \pm \text{SD}$ ) los distintos días.** Se obtuvieron muestras sanguíneas 2 veces al día, para obtener datos de la concentración máxima ( $C_{\max}$ ) y la mínima ( $C_{\min}$ ) diarias del fármaco. Se midió la concentración de fármaco

en cada momento a cada ratón. En la gráfica se representa cada punto como la media  $\pm$  desviación estándar de los 5 ratones de cada grupo.

Además, también se llevó a cabo un estudio del efecto que el fármaco tenía a nivel inmunitario para intentar demostrar su efecto sobre la inhibición de la vía JAK/STAT. Los ratones *Pax5*<sup>+/-</sup> sufren un bloqueo en la maduración de células B, teniendo un compartimento B inmaduro en MO más numeroso de lo habitual y un porcentaje de células B circulante en SP menor comparado con ratones WT<sup>78</sup>. La inhibición de la vía JAK/STAT provocó un aumento en el número de células B circulantes comparando los ratones *Pax5*<sup>+/-</sup> tratados frente a los no tratados (**Figura 37**). El aumento fue mayor en los ratones tratados con la dosis más alta, pero en ningún caso llegaron a alcanzar los niveles de los ratones WT.

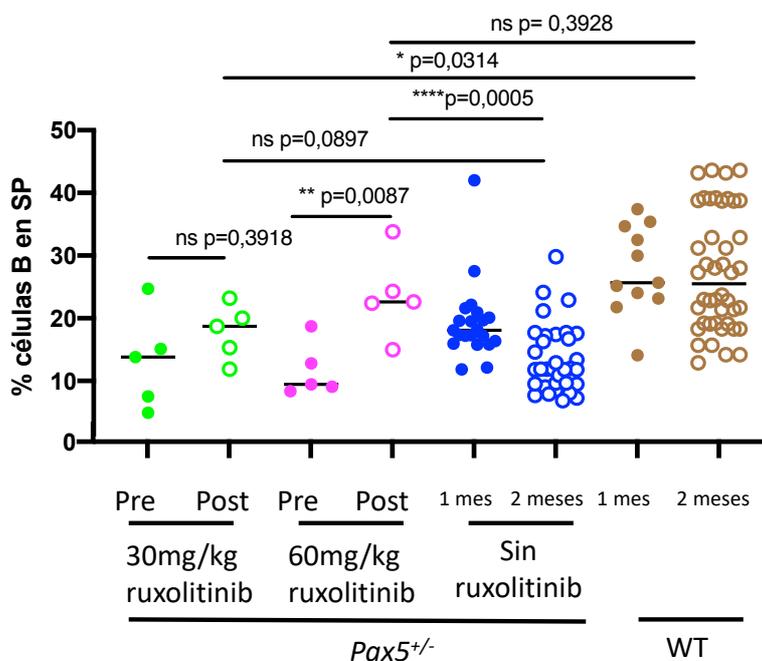


**Figura 37 - Porcentajes de células B en sangre periférica en ratones *Pax5*<sup>+/-</sup> tratados con dosis de 30mg/kg ruxolitinib (A) y dosis de 60mg/kg (B), en comparación con la media de ratones WT y *Pax5*<sup>+/-</sup> sin tratar.** Se observa un aumento de células B en sangre en ratones *Pax5*<sup>+/-</sup> tratados, sin llegar a alcanzar los niveles de un ratón WT. Los p-valores corresponden a los obtenidos por análisis t-test no pareado.

Para confirmar el efecto sobre las poblaciones hematopoyéticas, se compararon los porcentajes de células B en SP de los ratones tratados con cada una de las dosis con los datos de ratones *Pax5*<sup>+/-</sup> no tratados y WT no tratados aproximadamente de la misma edad (**Figura 38**). Se pudo observar un aumento de células B en las dos dosis con respecto a ratones del mismo genotipo no tratados, siendo estadísticamente significativo solo con la dosis superior. Con la dosis inferior, los niveles de células B tras el tratamiento no fueron significativamente superiores que en ratones del mismo genotipo sin tratar (p=0,0897). Además, seguían siendo significativamente menores que los niveles

## RESULTADOS

de ratones WT de la misma edad ( $p=0,0314$ ). Sin embargo, con la dosis de 60 mg/kg se observó un aumento significativo respecto a los ratones no tratados del mismo genotipo ( $p=0,0005$ ). Con esta dosis, los niveles de células B aumentaron incluso a niveles en los que no se diferenciaron estadísticamente de los porcentajes de los ratones WT ( $p=0,3928$ ).



**Figura 38 - Porcentajes de células B en sangre periférica de ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* tratados con las dos dosis de ruxolitinib comparados con ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* y WT no tratados de la misma edad. Los valores de significación estadísticas ( $p$ -valor) corresponden a los obtenidos por análisis  $t$ -test apareado.**

También se analizó el porcentaje de células B y de otras células inmunitarias para comprobar si el tratamiento con ruxolitinib estaba presentando toxicidad en los ratones. La inhibición de la vía JAK/STAT puede producir deficiencias importantes en la hematopoyesis, sin embargo la presencia de niveles normales de células inmunes en SP de los ratones tratados con el fármaco demostró que las dosis testadas no alcanzaban niveles de toxicidad importantes.

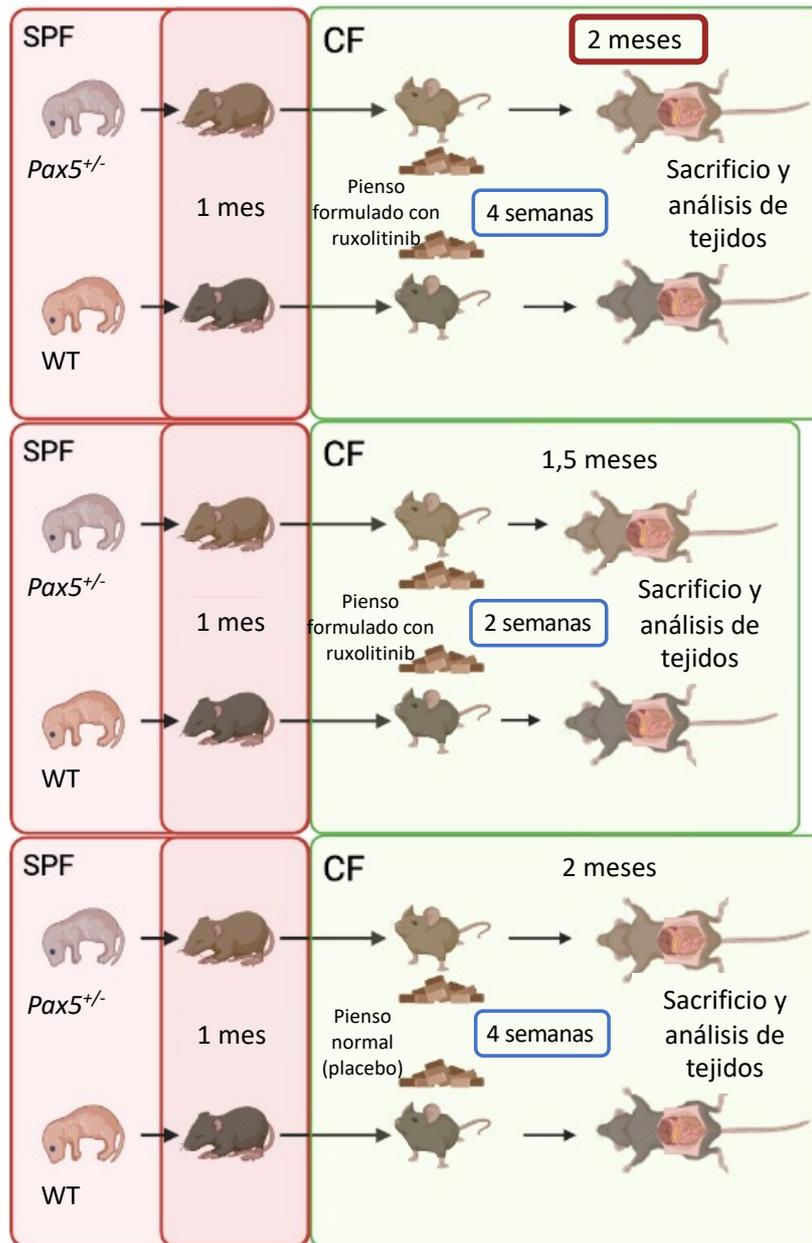
Teniendo en cuenta que solo con la dosis más alta de ruxolitinib se alcanzaba la concentración necesaria para una inhibición eficiente de la vía JAK/STAT y que esta dosis no tenía toxicidad elevada, se decidió emplear la concentración de 120 mg de ruxolitinib por kilogramo de ratón al día (60 mg/kg/bid) para el estudio de prevención.

### 2.2. La inhibición de la vía JAK/STAT se dirige específicamente a las células B susceptibles de transformación maligna in vivo

Los ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* tienen un compartimento B inmaduro anormal, resultante del bloqueo en la diferenciación de estas células como consecuencia de la falta de actividad del gen. En estos ratones, el compartimento B inmaduro es especialmente dependiente de la IL-7, y en ocasiones estas células acumulan mutaciones en la vía JAK/STAT para intentar sobreponerse a esta sensibilidad y expandirse clonalmente<sup>78</sup>. De esta manera, el compartimento sensible a la IL-7 sería el compartimento preleucémico, que tras la adquisición de esas mutaciones secundarias maligniza y da lugar a la leucemia. Con la inhibición de la vía JAK/STAT se buscaría impedir la adquisición de estas mutaciones malignas para así impedir la transformación del clon preleucémico a clon leucémico. Por tanto, el primer paso era comprobar si la inhibición de esta vía con ruxolitinib se dirigía específicamente a estas células sensibles a IL-7.

Las células sensibles a la IL-7 se corresponden con las células del compartimento pre-B y pro-B de MO en los ratones. Para comprobar si el tratamiento con ruxolitinib se estaba dirigiendo a esta población, se trataron ratones WT y ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* con ruxolitinib y con placebo (pellet de comida sin fármaco). Se analizó la población diana en dos puntos: tras 14 días de tratamiento con el fármaco, y tras 28 días de tratamiento (**Figura 39**). Cuando los ratones alcanzaron el tiempo de tratamiento, fueron sacrificados y se extrajo la MO para analizarla por citometría de flujo. Como grupo control se utilizaron ratones WT y *Pax5<sup>+/-</sup>* tratados con el placebo y sacrificados a la misma edad.

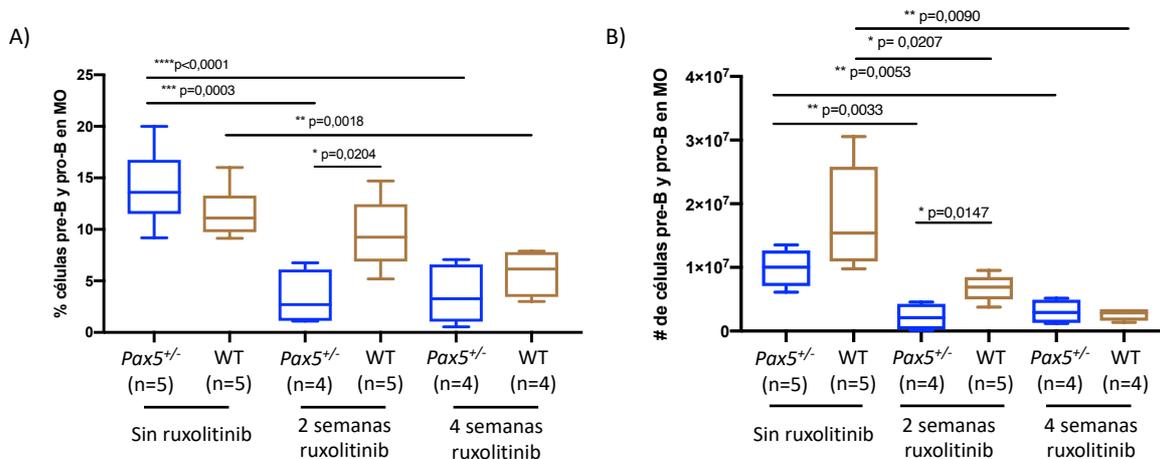
## RESULTADOS



**Figura 39 - Diseño experimental del análisis de las poblaciones hematopoyéticas en médula ósea tras el tratamiento con ruxolitinib.** Ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* y WT nacieron en SPF y cuando tuvieron un mes se trasladaron a CF. 4 ratones de cada genotipo fueron tratados con la dosis escogida de ruxolitinib durante 4 semanas. 4 ratones de cada genotipo fueron tratados con la dosis escogida de ruxolitinib durante 2 semanas. 4 ratones de cada genotipo fueron alimentados con pienso normal (grupo placebo) para usar como control. Tras finalizar el tiempo de tratamiento, los animales fueron sacrificados y se procedió al análisis de la población pre-B y pro-B en la médula ósea.

En la **Figura 40** se muestran los porcentajes de células pre-B y pro-B ( $B220^{\text{low}}\text{IgM}^-$ ) de MO de estos animales. Los ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* tratados con ruxolitinib mostraron una reducción en el compartimento pre-B y pro-B cuando se compararon con ratones del mismo genotipo no tratados. Esta reducción es estadísticamente significativa a las 2 semanas de tratamiento ( $p=0,0003$ ) pero

se hace más evidente a las 4 semanas ( $p < 0,0001$ ). A los 28 días de tratamiento incluso los ratones WT mostraron una disminución en el compartimento B inmaduro comparando con ratones WT sin tratar ( $p = 0,0018$ ). Estos resultados fueron acorde a lo esperado según estudios anteriores que demostraban que el tratamiento *in vitro* con inhibidores de la vía JAK/STAT de células pro-B dependientes de IL-7 tenían un aumento significativo de la muerte celular, más pronunciado aún en células *Pax5<sup>+/-</sup>* que en células WT<sup>78</sup>. Estas diferencias también se observaron en términos de número absoluto de células en lugar de porcentaje (**Figura 40**).

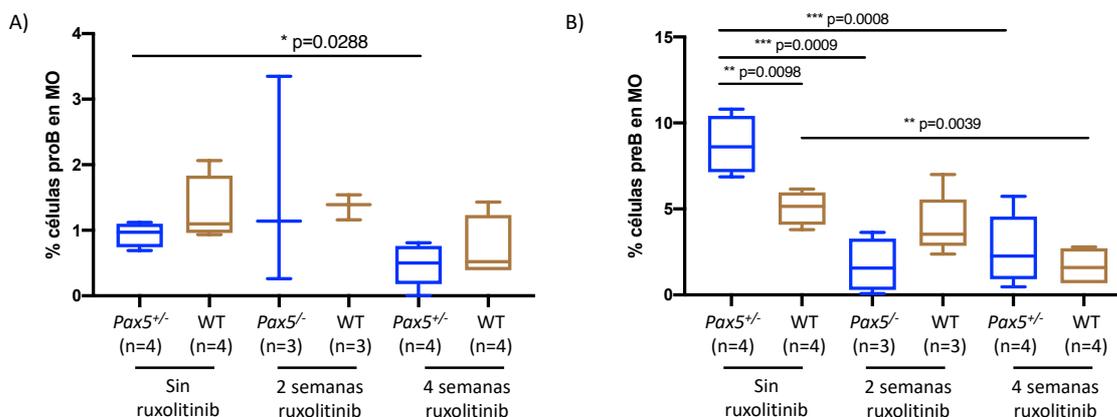


**Figura 40 – Cambios en el compartimento de células pre-B y pro-B en la médula ósea debido al tratamiento con ruxolitinib. A)** Porcentajes de células pre-B y pro-B en médula ósea en ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* y WT sin tratamiento, a los 14 días de tratamiento con ruxolitinib y a los 28 días de tratamiento. Las cajas representan el espacio donde se incluyen los valores; las barras horizontales de las cajas representan la media  $\pm$  desviación estándar. Los p-valores corresponden a los obtenidos por análisis t-test no pareado. **B)** Número absoluto de células del compartimento pre-B y pro-B de la médula ósea en ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* y WT no tratados, tratados durante dos semanas y cuatro semanas con ruxolitinib. Los p-valores corresponden a los obtenidos por análisis t-test apareado.

Se quiso observar si el tratamiento con ruxolitinib tenía algún efecto en concreto sobre las células pre-B o pro-B, para lo que se analizó si había cambios estadísticamente significativos en estos porcentajes (**Figura 41**). Considerando las poblaciones B inmaduras en MO por separado, el tratamiento con ruxolitinib redujo su porcentaje en ambos genotipos, aunque en el caso de las células pro-B no fue significativo. Esto sugirió que el tratamiento tiene un efecto conjunto

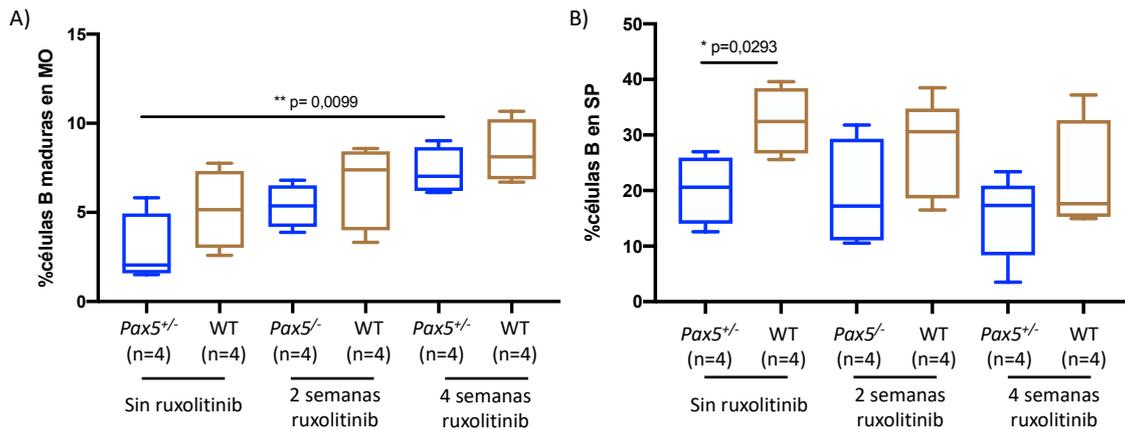
## RESULTADOS

sobre todo el compartimento B inmaduro, reduciendo por completo la población B inmadura.



**Figura 41 - Porcentaje de células pre-B en médula ósea (MO) (A) y pro-B en MO (B) en ratones *Pax5*<sup>+/-</sup> y WT sin tratar, a los 14 días de tratamiento con ruxolitinib y a los 28 días de tratamiento. Las cajas representan el espacio donde se incluyen los valores; las barras horizontales de las cajas representan la media  $\pm$  desviación estándar. Los p-valores corresponden a los obtenidos por análisis t-test no apareado.**

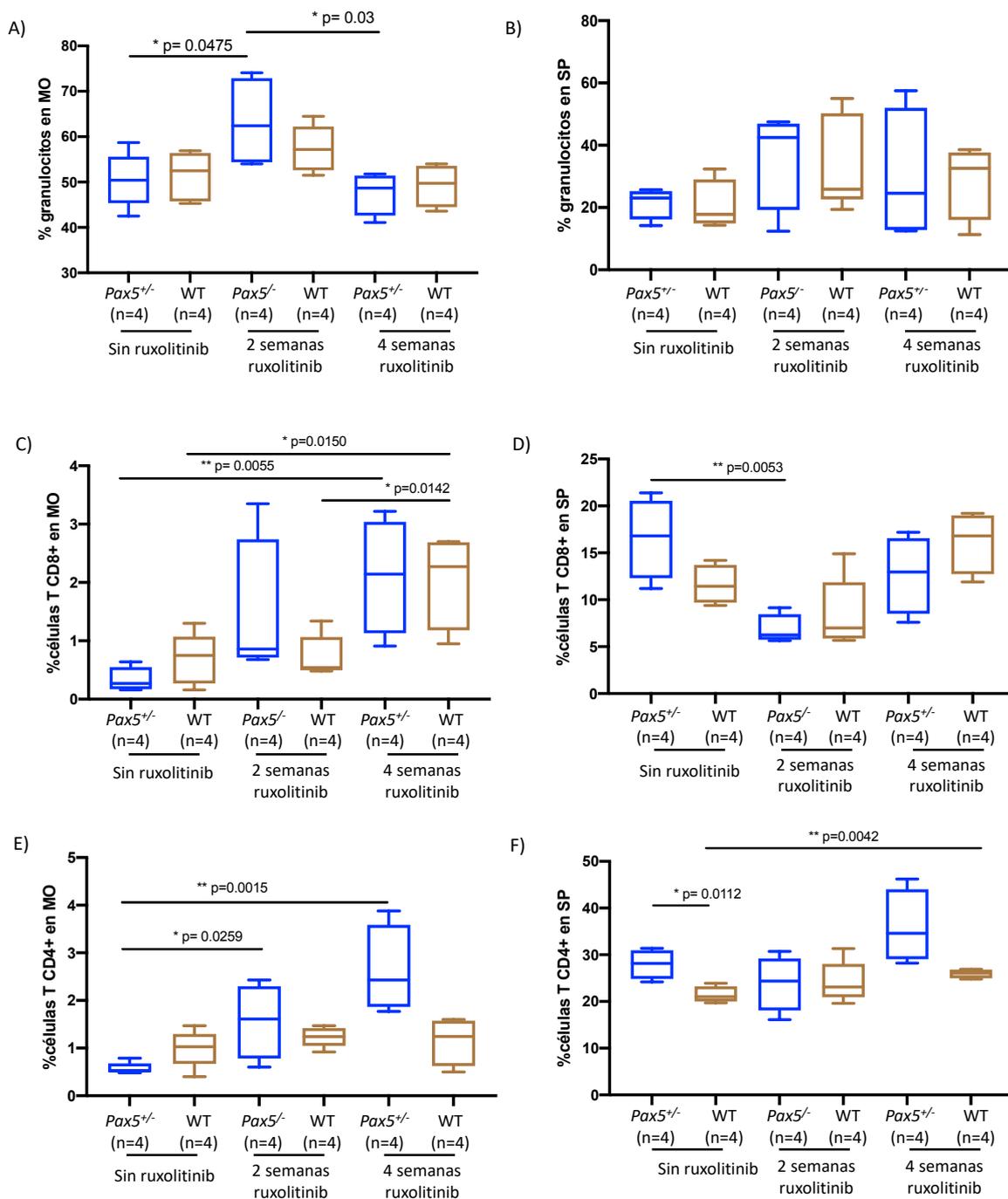
Una vez se observó que el tratamiento con ruxolitinib estaba provocando una disminución en este compartimento celular, se quiso ver si esto era un efecto específico sobre las células B inmaduras o era más bien un efecto de la toxicidad del fármaco. Para comprobarlo, se analizó la población B madura en MO y SP de esos ratones. Como se observa en la **Figura 42**, los niveles de células B maduras en MO sufrieron un aumento, aunque no significativo, con el tratamiento con ruxolitinib. Los ratones *Pax5*<sup>+/-</sup> tratados con ruxolitinib presentaron unos niveles de células B circulantes en SP ligeramente superiores a los ratones del mismo genotipo sin tratamiento. Estos resultados coinciden con lo que se había visto en el estudio piloto en SP e indican la ausencia de toxicidad generalizada debido al tratamiento. Así, se pudo concluir que el fármaco estaba afectado específicamente las células pre-B y -pro-B en la MO.



**Figura 42 - Porcentajes de células B maduras en médula ósea (MO) (A) y en sangre periférica (SP) (B), en ratones WT y Pax5<sup>+/-</sup> sin tratar, a los 14 días de tratamiento con ruxolitinib y a los 28 días de tratamiento.** Las cajas representan el espacio donde se incluyen los valores; las barras horizontales de las cajas representan la media  $\pm$  desviación estándar. Los p-valores corresponden a los obtenidos por análisis t-test no pareado.

El tratamiento con ruxolitinib provocó cambios en otras poblaciones hematopoyéticas, tanto en ratones *Pax5*<sup>+/-</sup> como en ratones WT (**Figura 43**). En la MO, a las dos semanas de tratamiento con ruxolitinib, se observó un aumento en la población mieloide (granulocitos) que se normalizó transcurridas 4 semanas de tratamiento. En la población T, la variabilidad fue tan grande que no permite discriminar si hubo cambios realmente significativos en MO. Las alteraciones en los porcentajes de células en SP no fueron significativas en su mayoría, aunque sí se observó un ligero aumento de la población mieloide junto con una disminución de las células T CD8<sup>+</sup> a las dos semanas de tratamiento con el fármaco. Los porcentajes de células que se habían visto alterados durante las 2 primeras semanas de tratamiento volvieron a los niveles habituales a las 4 semanas. Todos estos resultados sugirieron que la inhibición de la vía JAK/STAT tuvo un efecto específico sobre las células B inmaduras, y que esto repercutió en otras poblaciones inmunitarias.

## RESULTADOS

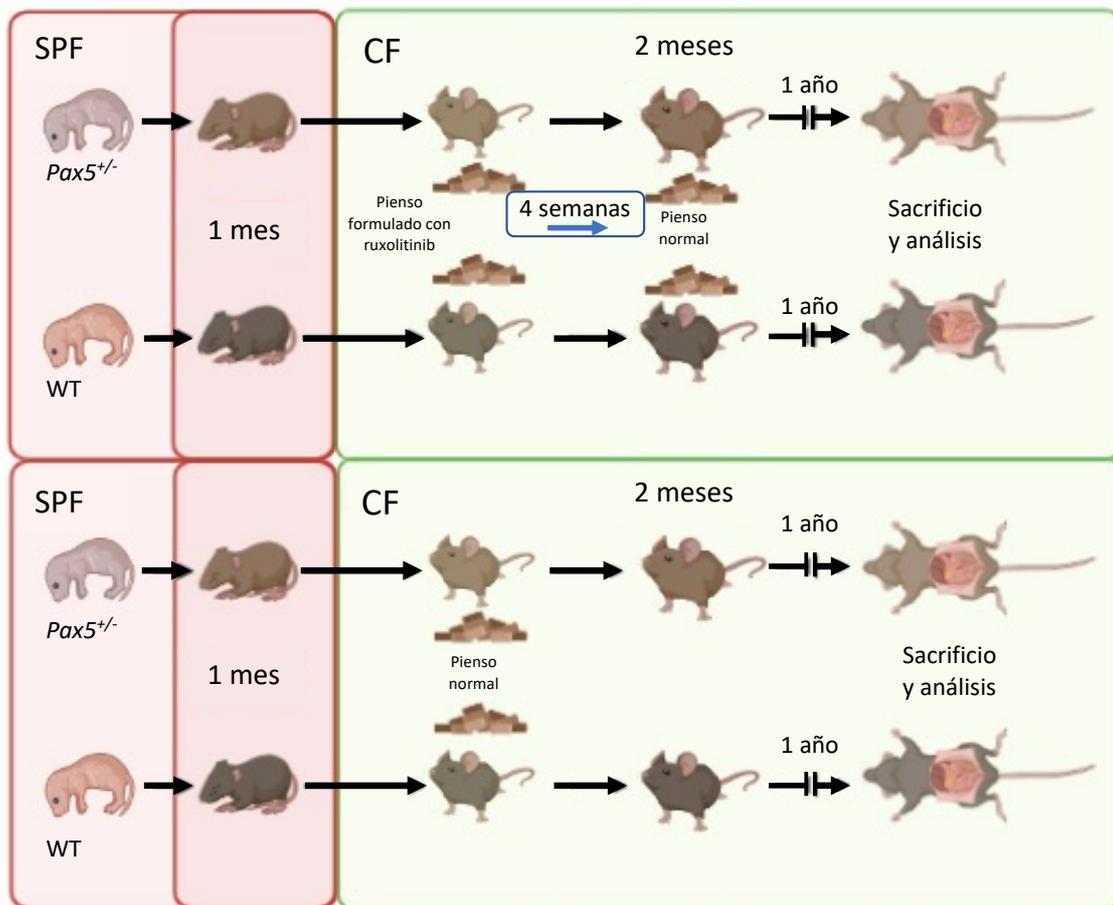


**Figura 43 - Porcentajes de granulocitos en médula ósea (MO) (A) y en sangre periférica (SP) (B), células T CD8+ en MO (C) y SP (D) y células T CD4+ en MO (E) y en SP (F) en ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* y WT sin tratar, a los 14 días de tratamiento con ruxolitinib y a los 28 días de tratamiento. Las cajas representan el espacio donde se incluyen los valores; las barras horizontales de las cajas representan la media  $\pm$  desviación estándar. Los p-valores corresponden a los obtenidos por análisis t-test apareado.**

Además, estos resultados sugerían que el efecto que ruxolitinib tiene sobre las poblaciones de la MO era un efecto dependiente del tiempo de tratamiento. Se estableció que el tratamiento con ruxolitinib se aplicaría durante 4 semanas,

ya que no existen efectos secundarios relacionados con inmunosupresión y así se aseguró un tiempo suficiente para erradicar las células susceptibles de transformación maligna. Después del tratamiento, el pienso con el fármaco fue retirado y sustituido por pienso normal.

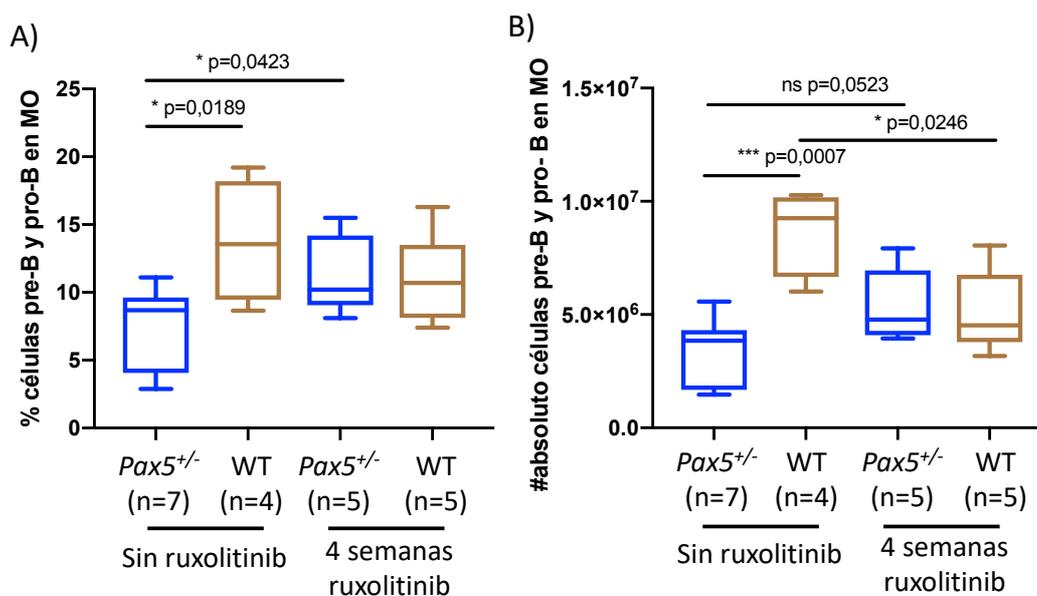
El siguiente paso fue comprobar si la reducción del compartimento B inmaduro en la MO era un efecto transitorio o permanente. Para ello, se trataron con ruxolitinib durante 4 semanas ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* y WT y se mantuvieron hasta el año de edad. Los datos se compararon con ratones de los mismos genotipos mantenidos en las mismas condiciones, pero no tratados con ruxolitinib (**Figura 44**).



**Figura 44 - Diseño experimental para el análisis de la composición hematopoyética en ratones de 12 meses tras el tratamiento con ruxolitinib.** Ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* y WT nacieron en SPF y cuando tuvieron un mes de edad se trasladaron a CF. 4 ratones de cada genotipo fueron tratados con la dosis escogida de ruxolitinib durante 4 semanas. En paralelo, 4 ratones de cada genotipo fueron alimentados siempre con pienso normal (placebo) como grupo control. Cuando los ratones alcanzaron el año de edad, los animales fueron sacrificados y se procedió al análisis de la composición hematopoyética.

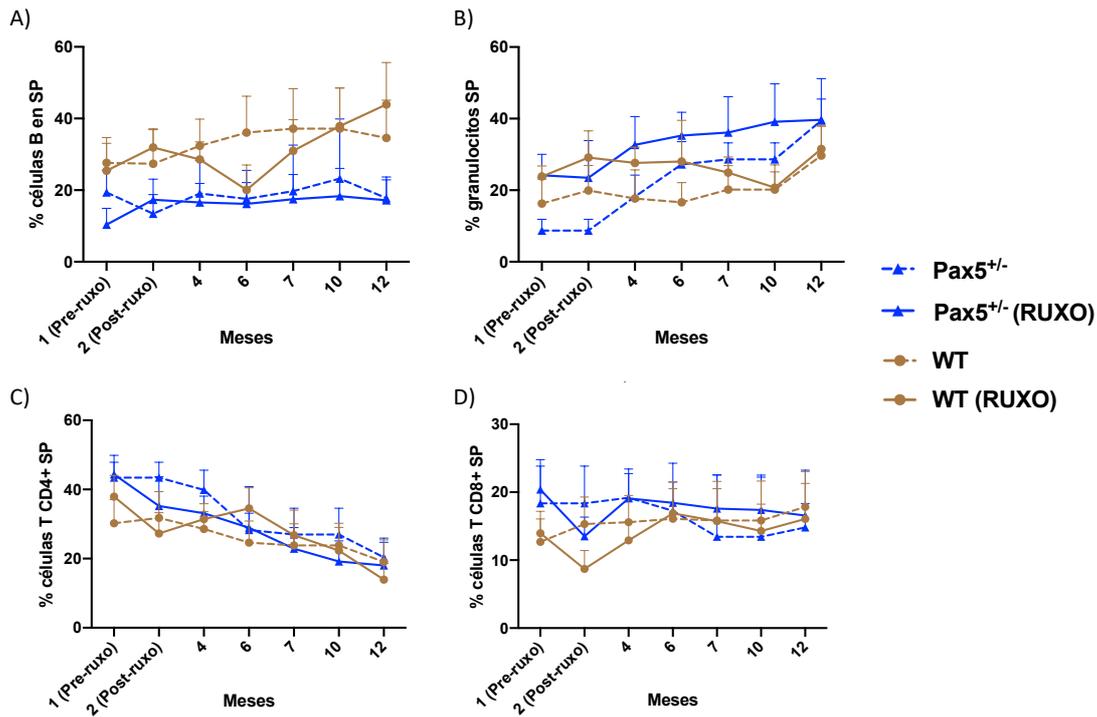
## RESULTADOS

Al año de edad se les sacrificó y se analizaron las poblaciones de interés por citometría de flujo (**Figura 45**). Tras el tratamiento con ruxolitinib los ratones de 1 año de edad de ambos genotipos presentaban un compartimento de células pre-B y pro-B similar al de los ratones alimentados con pienso normal. Estos datos indicaron que los cambios observados tras el tratamiento con ruxolitinib eran transitorios.



**Figura 45 – Porcentaje (A) y número absoluto (B) de células pre-B y pro-B en médula ósea (MO) en ratones WT y Pax5<sup>+/-</sup> de 1 año de edad no tratados y ratones de los mismos genotipos tratados con ruxolitinib durante cuatro semanas. Los p-valores corresponden a los obtenidos por análisis t-test no pareado.**

Durante todo el año de vida de esos ratones, desde antes de iniciar el tratamiento con ruxolitinib hasta el sacrificio, se analizó la composición hematopoyética de los ratones en SP. Se observó que la tendencia en ratones tratados y no tratados del mismo genotipo (Pax5<sup>+/-</sup> o WT) eran similares (**Figura 46**). Tras el aumento de células B y granulocitos y la disminución de células T al finalizar el tratamiento, las poblaciones recuperaban valores similares a los encontrados en ratones del mismo genotipo no tratados.



**Figura 46 - Análisis por citometría de flujo de células B (A), granulocitos (B), células T CD4+ (C) y células T CD8+ (D) en sangre periférica (SP).** Se muestran los datos de ratones WT y Pax5<sup>+/-</sup> no tratados y tratados con ruxolitinib durante 4 semanas. Las figuras geométricas representan la media del valor de células de cada tipo en cada punto de edad, y las barras la desviación estándar. En líneas discontinuas se muestran los valores de ratones no tratados (n=23 para los WT no tratados, y n=10 para los ratones Pax5<sup>+/-</sup> no tratados), y en líneas continuas los valores de ratones tratados con ruxolitinib durante 4 semanas (n=14 en el grupo de WT tratados y n=35 en el grupo de Pax5<sup>+/-</sup> tratados). En color azul se representan los ratones Pax5<sup>+/-</sup> y en color marrón los ratones WT. La edad de los ratones se representa en meses en el eje horizontal.

Todos estos datos permitieron demostrar que el tratamiento con ruxolitinib tenía un efecto específico y transitorio sobre el compartimento de células B inmaduras de la MO, aunque también producía cambios no significativos en otras poblaciones de células inmunitarias.

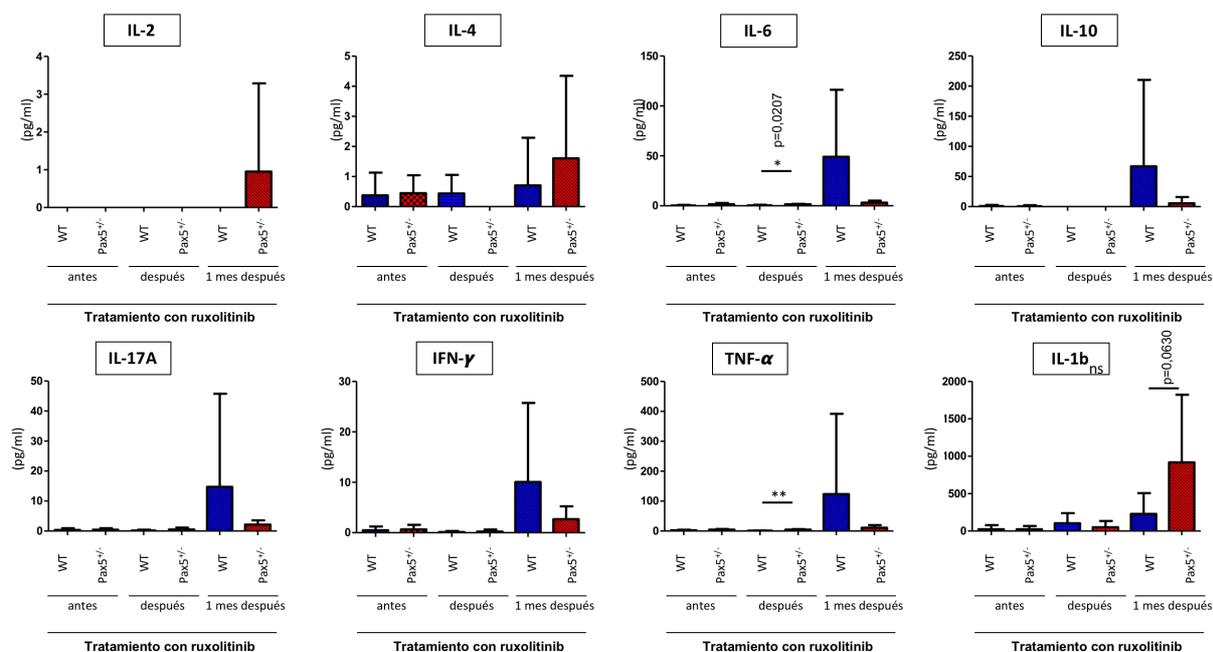
### 2.3. La inhibición transitoria de la vía JAK/STAT se dirige a las células preleucémicas a través de un mecanismo celular autónomo

El siguiente paso fue intentar descubrir cuál es el mecanismo por el que la inhibición transitoria de la vía JAK/STAT produce una disminución del compartimento preleucémico en los ratones Pax5<sup>+/-</sup>. Estudios realizados con muestras sanguíneas de niños neonatos han demostrado ampliamente que los pacientes que en un futuro desarrollan LLA-B cuentan con un perfil de citoquinas y marcadores inflamatorios alterados incluso antes del desarrollo de

## RESULTADOS

la enfermedad <sup>200</sup>. Como los inhibidores de JAK1/2 son comúnmente utilizados para disminuir la sobreactivación inmunitaria en la clínica, la inhibición de dicha vía podría tener un efecto protector de la leucemia al regular este perfil inflamatorio en neonatos. De esta manera, la reducción del compartimento pre-B y pro-B podría ser consecuencia de un efecto sistémico debido la expresión de citoquinas inflamatorias tras el tratamiento con ruxolitinib.

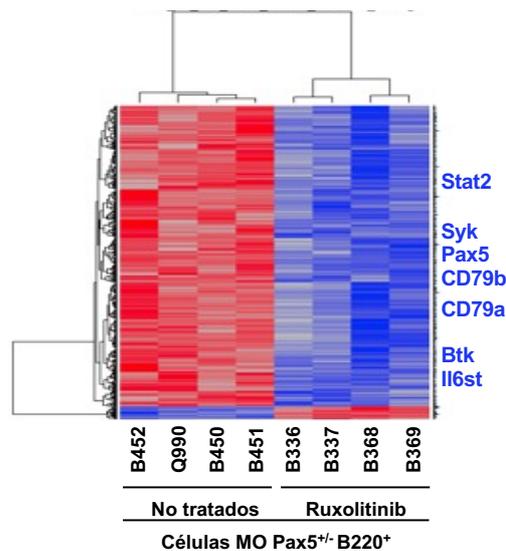
Para comprobarlo, se analizó la concentración sanguínea de varias citoquinas inflamatorias: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17a, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL-1b. El análisis se realizó con muestras de plasma de ratones *Pax5*<sup>+/-</sup> y WT tratados con el fármaco. Las muestras de plasma se recogieron antes del tratamiento, justo después del tratamiento y un mes después del tratamiento. El análisis de la concentración de citoquinas mostró que ambos genotipos de ratones tienen un perfil inflamatorio similar antes y después del tratamiento (**Figura 47**). Esto demostró que la disminución del compartimento B inmaduro en ratones *Pax5*<sup>+/-</sup> (que sería el compartimento preleucémico) no se asocia con un cambio sistémico del perfil inflamatorio, sino que más bien ha de ser un mecanismo autónomo, un mecanismo más específico del propio compartimento inmaduro.



**Figura 47 - Análisis de las citoquinas inflamatorias IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17a, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL-1b en el suero de ratones WT y *Pax5*<sup>+/-</sup> antes y después del tratamiento con ruxolitinib. Se representa en cada caso la concentración de cada citoquina. Las barras representan la media y la desviación**

estándar. Los valores de significación (*p*-valores) corresponden a los obtenidos por test *t* apareado. Solo se indican valores significativos y los no significativos que pudiesen dar lugar a confusión.

Para descubrir cuál era este mecanismo autónomo de las células preleucémicas, se llevó a cabo un análisis de expresión de células B220<sup>+</sup> de MO de ratones *Pax5*<sup>+/-</sup> tras 2 semanas de tratamiento con ruxolitinib. Se comparó este patrón con el mismo compartimento de ratones *Pax5*<sup>+/-</sup> sin tratar (**Figura 48**). Este análisis reveló cambios en la expresión genética tras el tratamiento con ruxolitinib: se encontraron 1504 genes diferencialmente expresados en ratones *Pax5*<sup>+/-</sup> tratados con el fármaco en comparación con el mismo genotipo sin tratar (los datos del análisis de expresión se pueden descargar en línea en este [enlace](#)). En la mayoría de estos genes (1443) se encontró disminuida su expresión y algunos estaban implicados en el desarrollo de células B y en la señalización del receptor celular B. Son ejemplos de genes diferencialmente expresados implicados en desarrollo B los mostrados en la figura: *Syk*, *Pax5*, *CD79a*, *CD79b*, *Btk* o *IL6st*.

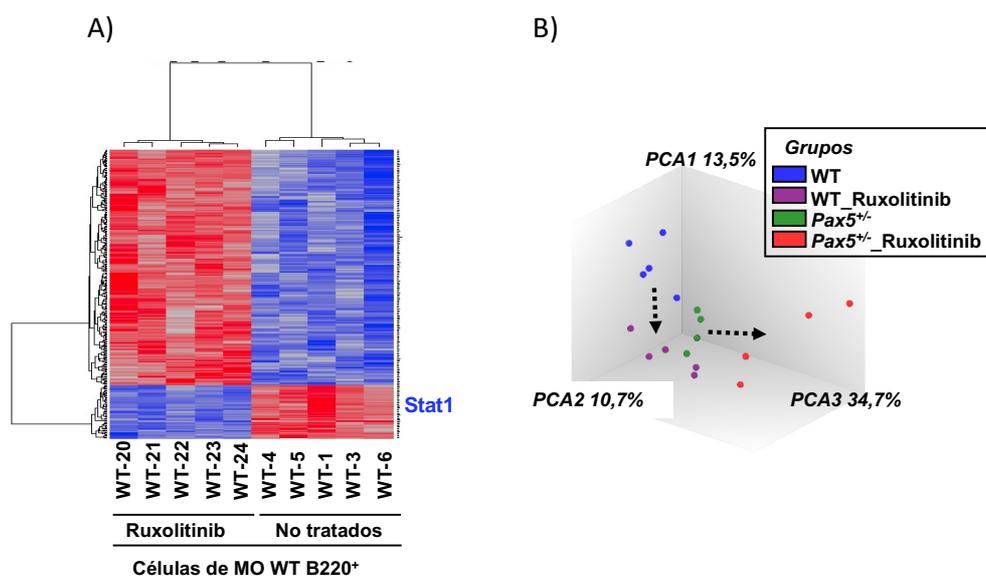


**Figura 48** – Heatmap no supervisado que muestra los genes (1504) con un patrón de expresión significativamente diferente entre *Pax5*<sup>+/-</sup> tratados con ruxolitinib (*n*=4) y no tratados (*n*=4). El análisis de significación de los microarrays se definió por una FDR=0,015% (FDR del inglés false discovery rate, tasa de detección de falsos positivos).

Para comprobar si este cambio en la expresión era específico de ratones *Pax5*<sup>+/-</sup>, se llevó a cabo el mismo análisis de expresión en ratones WT tratados con ruxolitinib y no tratados (**Figura 49 A**). Frente a los 1504 genes diferencialmente expresados en ratones *Pax5*<sup>+/-</sup> tratados versus no tratados, en

## RESULTADOS

ratones WT con el mismo régimen de tratamiento solo se alteró la expresión de 294 genes (los datos del análisis de expresión se pueden descargar en línea en este [enlace](#)). El análisis de componentes principales elaborado a partir de estos datos de expresión mostró que los cambios que sufría la expresión genética de ratones WT eran distintos a los observados en los ratones *Pax5*<sup>+/-</sup> (**Figura 49 B**). Esto indica que la alteración de la expresión genética producida por ruxolitinib era específica del genotipo del ratón.



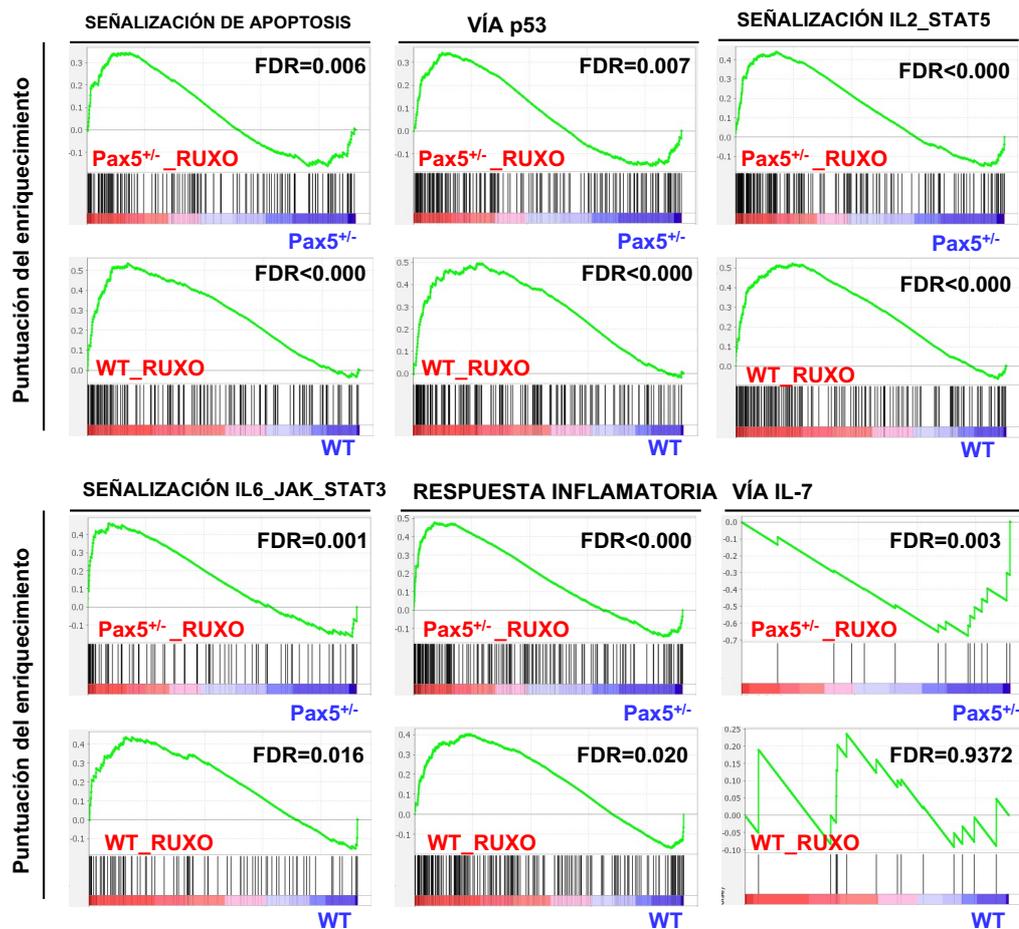
**Figura 49 – Cambios en la expresión genética de ratones WT tratados con ruxolitinib durante 4 semanas.** **A)** Heatmap no supervisado que muestra los genes (294) con un patrón de expresión significativamente diferente entre WT tratados con ruxolitinib (n=5) y no tratados (n=5). El análisis de significación de los microarrays se definió por una FDR=0,015%. **B)** Análisis de componentes principales (PCA, del inglés principal component analysis): muestra las diferencias de expresión génica en ratones *Pax5*<sup>+/-</sup> (rojo) y WT (morado) tratados con ruxolitinib (rojo) y ratones *Pax5*<sup>+/-</sup> (verde) y WT (azul) no tratados; las flechas representan el cambio que produce el tratamiento con ruxolitinib en la expresión génica en cada genotipo.

Quedó así demostrado que el tratamiento con ruxolitinib producía cambios específicos en la expresión génica en el compartimento preleucémico de los ratones *Pax5*<sup>+/-</sup>, que debían ser los responsables de la disminución en este compartimento susceptible de transformación maligna. Para comprobar en qué rutas o vías estaban implicados los genes diferencialmente expresados en los dos escenarios, se compararon con la colección de “*hallmarks*” (sellos distintivos, se refiere a genes o patrón de expresión distintivos) de la base de datos “*Molecular signatures database 7.1 (MSigDB)*<sup>201</sup>. Se llevó a cabo un análisis del enriquecimiento de grupos de genes (GSEA, de las siglas en inglés *gene set*



## RESULTADOS

Los GSEAs mostraron un enriquecimiento de las firmas genéticas de la vía de apoptosis y de la vía de p53 en los ratones tratados con ruxolitinib, consistente con la muerte celular que el tratamiento induce en las células pre-B y pro-B de MO (**Figura 51**). Se observó también un enriquecimiento de la expresión de genes relacionados con la vía de la IL-2, la IL-6 y la respuesta inflamatoria en ratones tratados con ruxolitinib, algo esperable como consecuencia del aumento de la muerte celular. Este enriquecimiento fue más significativo en los ratones *Pax5<sup>+/-</sup>*, lo cual se explica como consecuencia de la asociación entre la heterocigosidad de *Pax5* y la alteración en la producción de citoquinas inflamatorias como es la IL-6<sup>202</sup>. Resultó interesante el hallazgo de una disminución de la expresión en la vía de señalización de la IL-7 que se observó en los ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* tras el tratamiento con ruxolitinib, pero no en ratones WT (**Figura 51**).



**Figura 51 – Análisis del enriquecimiento de la expresión de genes de distintas vías de señalización.** Se muestran los análisis GSEAs que representan el enriquecimiento de la vía de apoptosis, vía p53, vía de señalización IL2-STAT5, vía de señalización IL6-JAK-STAT3 y vía de respuesta inflamatoria en ratones

*Pax5<sup>+/-</sup> y WT tratados con ruxolitinib y el enriquecimiento de la vía de la IL7 en ratones Pax5<sup>+/-</sup> tratados con ruxolitinib.*

Estos resultados demostraron que el tratamiento con ruxolitinib tenía efectos distintos en ratones WT y en ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* al alterar de forma diferencial la expresión génica en las células B220<sup>+</sup> de la MO en los dos genotipos. La alteración transcripcional diferencial se observa en vías de la ontogenia B, la señalización BCR, la inducción de la apoptosis y la señalización con citoquinas (**Figura 51**).

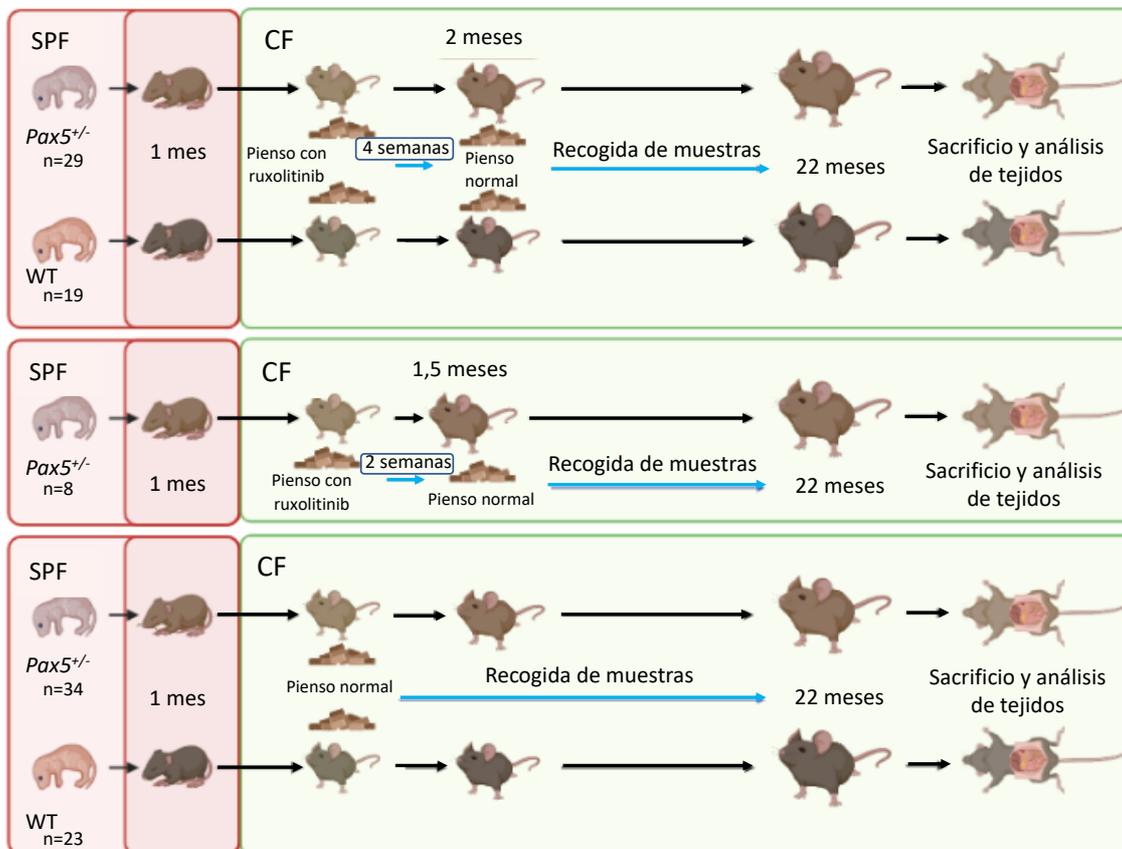
### 2.4. La inhibición transitoria de la vía JAK/STAT previene el desarrollo de LLA-B en ratones *Pax5<sup>+/-</sup>*

Una vez se comprendió cómo el tratamiento con ruxolitinib afectaba específicamente las células pre-B y pro-B de los ratones *Pax5<sup>+/-</sup>*, se quiso ver si la disminución en este compartimento tiene en realidad efectos preventivos en la leucemia. Se partió siempre de la hipótesis de que este compartimento se correspondía con el compartimento preleucémico de estos ratones, por tanto el tratamiento con ruxolitinib estaría atacando selectivamente las células susceptibles de transformación maligna.

Para el estudio de prevención, se generó una nueva cohorte de ratones (*Pax5<sup>+/-</sup>* y WT) que se trató durante 4 semanas con ruxolitinib. Estos ratones fueron monitorizados durante 2 años para comprobar si el tratamiento impedía la transformación maligna (**Figura 52**). Se usaron un total de 71 ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* y 42 ratones WT. Todos los animales nacieron y fueron mantenidos en un animalario SPF hasta que alcanzaron el mes de edad, después se trasladaron al animalario convencional y se comenzó el tratamiento con ruxolitinib utilizando como vía de administración el pienso que incluía el fármaco a una dosis de 60 mg/kg/bid. 29 ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* y 19 ratones WT fueron tratados con ruxolitinib durante 4 semanas y 8 ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* fueron tratados durante 2 semanas con el fármaco. Tras el tiempo establecido, este pienso fue sustituido por pienso normal y los animales se mantuvieron en los mismos grupos. Como control, 23

## RESULTADOS

WT y 34 *Pax5<sup>+/-</sup>* se alimentaron con pienso normal (grupo placebo) durante todo el experimento.

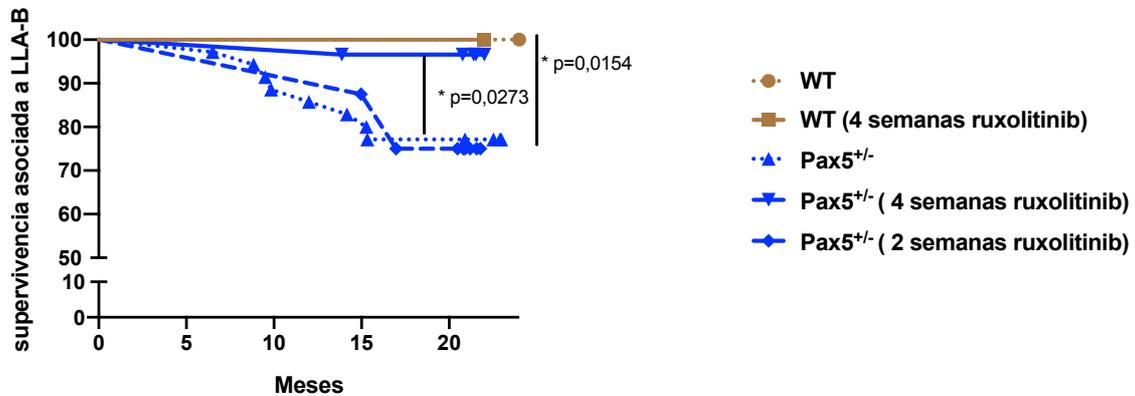


**Figura 52 - Diseño experimental del estudio de prevención de la LLA-B.** Ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* y WT nacieron en SPF y cuando tuvieron 1 mes de edad se trasladaron a CF. 29 ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* y 19 ratones WT fueron tratados con la dosis escogida de ruxolitinib durante 4 semanas. 8 ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* fueron tratados con la dosis de 60 mg/kg de ruxolitinib durante 2 semanas. 34 ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* y 23 ratones WT fueron alimentados con pienso normal (grupo placebo) para usar como control. Tras finalizar el tiempo de tratamiento, el pienso de ratones tratados fue retirado y sustituido por pienso normal. Cuando alcanzaron 2 años de edad (22-24 meses) o cuando mostraron signos de enfermedad (signos clínicos o presencia de blastos en sangre periférica), los animales fueron sacrificados y se procedió al análisis de los tejidos hematopoyéticos y no hematopoyéticos.

El estado microbiológico de los animales fue monitorizado durante el experimento, para comprobar que en animalario convencional todos los ratones estaban expuestos a infecciones comunes. No se encontraron diferencias de infección entre ratones de distinto genotipo (**Tabla 10** – en anexo).

Durante el experimento, 8 de los 34 ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* no tratados desarrollaron LLA-B (23,52%) y fueron sacrificados por la enfermedad. Esta incidencia en la leucemia coincide con la de otras cohortes similares en experimentos anteriores de ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* expuestos a infecciones comunes

mediante su estabulación en un animalario CF<sup>78</sup>. Es una supervivencia asociada a leucemia significativamente inferior a la de ratones WT no tratados, que nunca desarrollaron leucemia en CF (p=0,0154) (**Figura 53**).



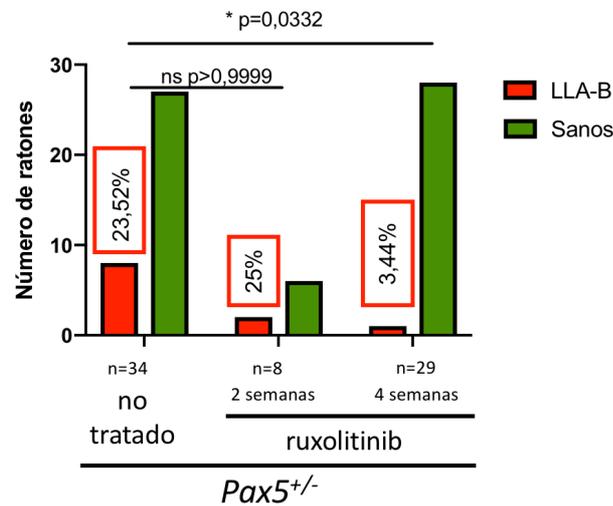
**Figura 53 - Supervivencia asociada a leucemia B (LLA-B).** Supervivencia de ratones WT tratados con ruxolitinib (línea marrón continua, n=19) y no tratados (línea marrón punteada, n=23), ratones Pax5<sup>+/-</sup> no tratados (línea azul punteada, n=34), ratones Pax5<sup>+/-</sup> tratados durante 2 semanas con ruxolitinib (línea azul discontinua, n=8) y tratados durante 4 semanas con ruxolitinib (línea azul continua, n=29). Las figuras representan la edad a la que animales fueron sacrificados. Los p-valores se corresponden a los obtenidos por análisis Log-rank (Mantel-cox): p-valor: 0,0273 comparando supervivencia específica asociada a LLA-B de ratones Pax5<sup>+/-</sup> no tratados versus tratados durante 4 semanas, y p-valor: 0,0154 comparando ratones WT y Pax5<sup>+/-</sup> no tratados. Del resto de las comparaciones no se muestra el p-valor al no ser estadísticamente significativas

En el grupo de ratones Pax5<sup>+/-</sup> tratados con ruxolitinib durante 4 semanas solo 1 de los 29 ratones de esta cohorte desarrolló LLA-B y murió por la enfermedad (3,4%), lo que supuso una reducción significativa de la muerte asociada a leucemia (p=0,0273) (**Figura 53**). Sin embargo, de la cohorte de ratones Pax5<sup>+/-</sup> tratados durante solo 2 semanas con el fármaco, 2 de los 8 ratones desarrollaron leucemia B (25%), siendo una incidencia muy similar a la del grupo sin tratar (no significativa, p=0,9976). La supervivencia asociada a leucemia de los WT tratados y no tratados fue del 100%. Los ratones Pax5<sup>+/-</sup> con tratamiento de 4 semanas no presentaron una reducción significativa de la supervivencia asociada a leucemia comparado con los WT no tratados (p=0,3732) ni tratados con el mismo régimen (p=0,4183). De los ratones WT tratados con ruxolitinib, ninguno desarrolló ni leucemia ni ninguna otra enfermedad hematológica.

Con estos resultados se concluyó que el tratamiento con ruxolitinib durante 28 días reducía significativamente el riesgo de sufrir la enfermedad (**Figura 54**).

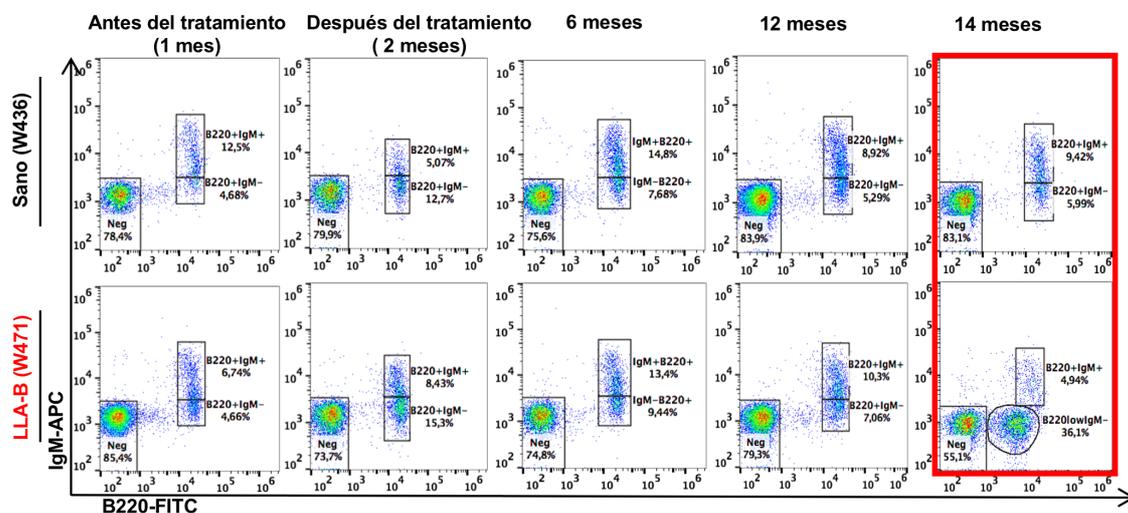
## RESULTADOS

Además, este efecto era dependiente del tiempo, ya que el tratamiento durante solo 2 semanas no conseguía acabar con suficiente número de células susceptibles de transformación maligna y por ello no prevenía el desarrollo de la enfermedad.



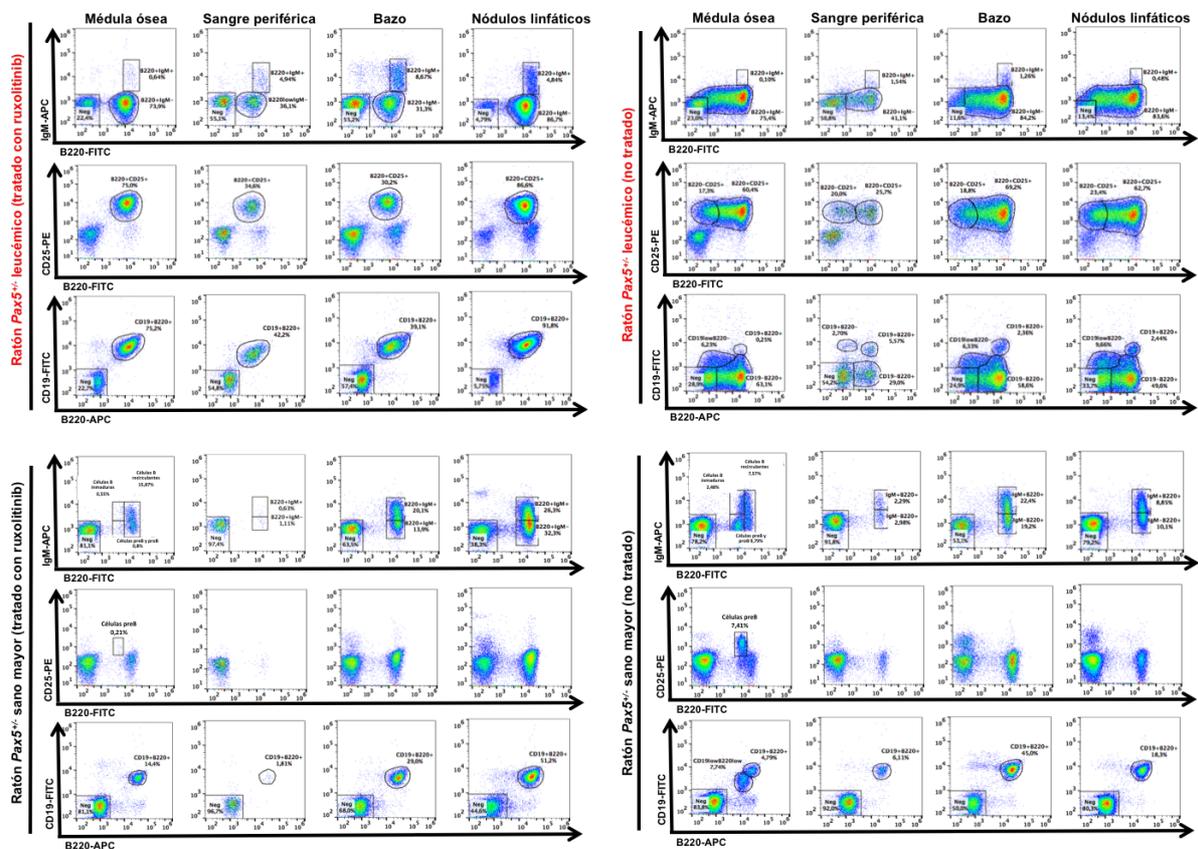
**Figura 54 – Análisis de contingencia con estadístico test de Fisher.** Se muestran los números de ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* sanos (verde) y enfermos de LLA-B (rojo), no tratados, tratados durante 2 semanas y tratados durante 4 semanas con ruxolitinib. Se observa una reducción significativa ( $p=0,0332$ ) del porcentaje de casos de leucemia en ratones tratados durante 4 semanas. En recuadros rojos se indica la incidencia de LLA-B en cada grupo de animales. Los p-valores corresponden a los obtenidos con el test de Fisher.

En el grupo de ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* tratados con placebo, la LLA-B apareció entre los 7 y 15 meses de edad y se diagnosticó tras la aparición de células leucémicas en SP. En el ratón que desarrolló leucemia y había sido tratado con ruxolitinib, las células leucémicas aparecieron en SP a los 14 meses de edad, 12 meses después del tratamiento con ruxolitinib (**Figura 55**).



**Figura 55 - Análisis de citometría de flujo de muestra de sangre periférica.** El análisis muestra la progresión de las células B en sangre periférica en dos ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* tratados con ruxolitinib y mantenidos en las mismas condiciones, un ratón sano (W436) y el ratón leucémico tratado con ruxolitinib (W471). A los 14 meses se observó la aparición de células leucémicas en la SP del ratón W471 (esta población no es detectable en el ratón sano). El ratón W471 no desarrolló la LLA-B hasta los 14 meses, 12 meses después del tratamiento con ruxolitinib.

Se analizó el fenotipo de las células leucémicas mediante citometría de flujo, tanto en los ratones leucémicos no tratados los casos tratados con ruxolitinib. En todos los casos las células leucémicas tenían marcadores de membrana CD19<sup>+/-</sup> B220<sup>low</sup> IgM<sup>-</sup> CD25<sup>+</sup> (**Figura 56**). En ningún ratón *Pax5<sup>+/-</sup>* sano se encontraron células de ese mismo fenotipo.

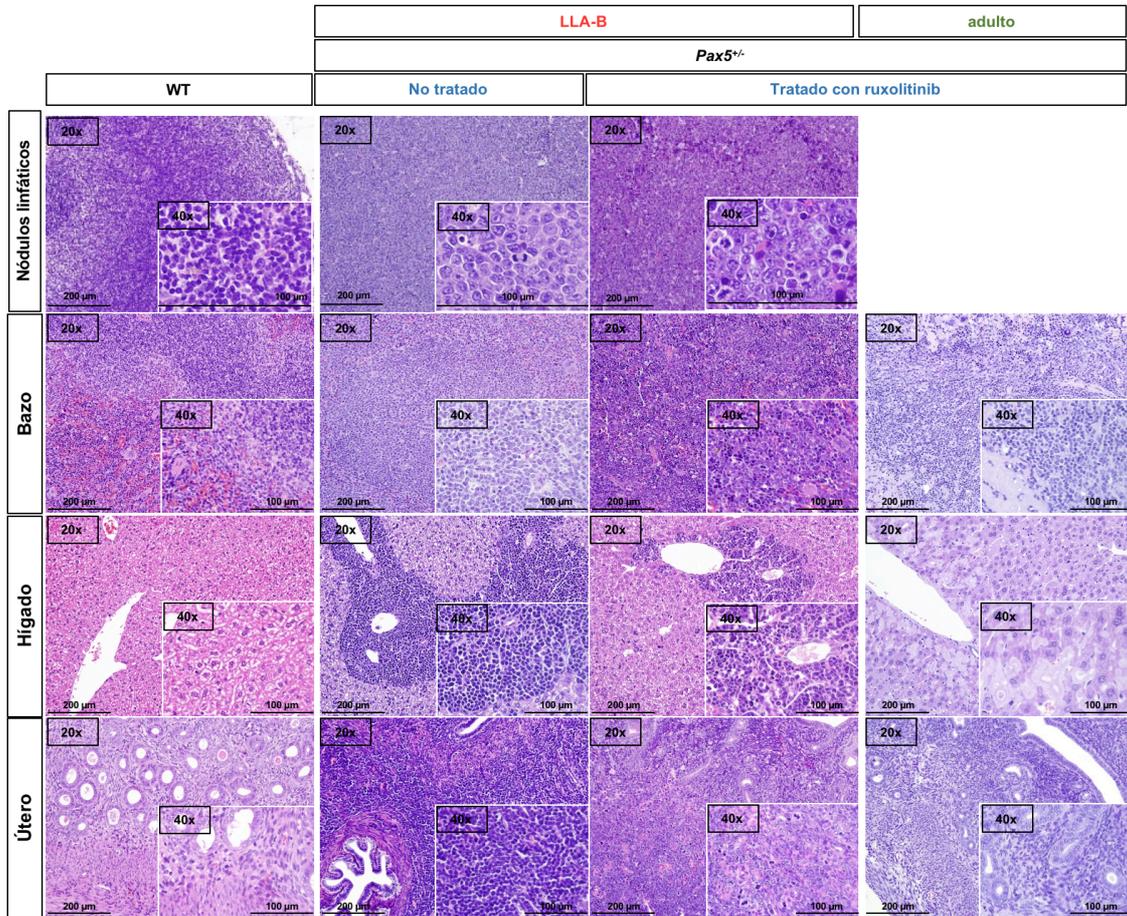


**Figura 56 – Imágenes representativas de análisis de citometría de flujo de médula ósea, bazo y nódulos linfáticos de ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* leucémicos (fila superior) y sanos adultos (fila inferior).** La primera columna corresponde a ratones tratados con ruxolitinib, la segunda a ratones no tratados. En los ejes de las figuras se indica el marcador y el fluorocromo conjugado en cada caso. Se observa la presencia de células leucémicas en los ratones enfermos y la ausencia de células con ese mismo fenotipo en los ratones sanos.

Tanto en los ratones no tratados como en el ratón tratado con ruxolitinib durante cuatro semanas, las células leucémicas habían surgido en la MO pero habían infiltrado órganos hematopoyéticos (bazo y nódulos linfáticos) y otros órganos no hematopoyéticos, como el hígado y el útero. Debido a la acumulación

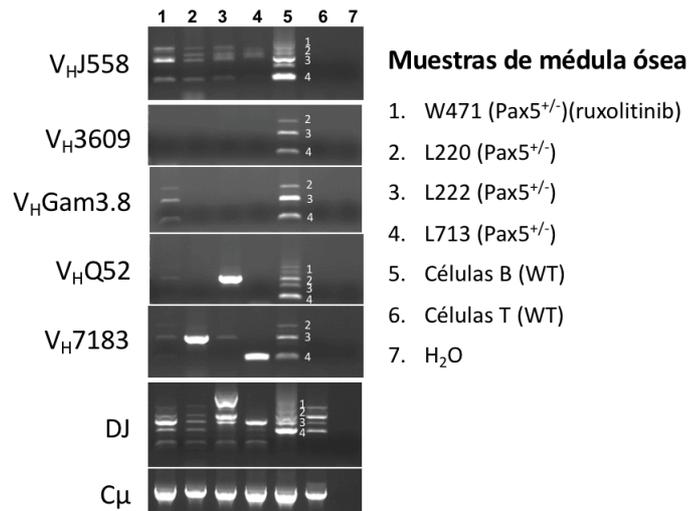
## RESULTADOS

de estas células tumorales, los tejidos perdieron su arquitectura normal (**Figura 57**).



**Figura 57 –Infiltración de las células leucémicas en tejidos hematopoyéticos y no hematopoyéticos.** Tinción de hematoxilina y eosina de distintos tejidos de un ratón WT sano, un  $Pax5^{+/-}$  no tratados y tratados con ruxolitinib con LLA-B y ratón  $Pax5^{+/-}$  tratado con ruxolitinib adulto sin leucemia. Se muestran imágenes de las histologías de nódulos linfáticos, bazo, hígado y útero. Se aprecia la pérdida de arquitectura normal en los tejidos en ratones con LLA-B en comparación con los ratones sanos. En cada caso se indica la ampliación y la escala empleados.

Con el fin de determinar la clonalidad de las células tumorales, se estudió el estado de reordenamiento de las cadenas pesadas V, D y J ( $V_H$ ,  $D_H$  y  $J_H$ , H del inglés *heavy*) de los genes de inmunoglobulinas (**Figura 58**). En todos los casos analizados las células leucémicas mostraron un patrón clonal.



**Figura 58 - Análisis de la clonalidad BCR (del inglés B-cell receptor) de las leucemias mostradas en la leyenda (1- del ratón con LLA-B tratado con ruxolitinib cuatro semanas, y 2-3-4 LLA-B de ratones Pax5<sup>+/-</sup> no tratados).** Se estudiaron por análisis de PCR del reordenamiento de los genes BCR de células leucémicas de la médula ósea. Como control de policlonalidad del BCR se utilizaron células B (seleccionadas por sorting CD19<sup>+</sup>) del bazo de ratones WT sanos. Como control negativo se utilizaron células T CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> del timo de ratones WT sanos. Se observa un aumento de la clonalidad en los ratones leucémicos.

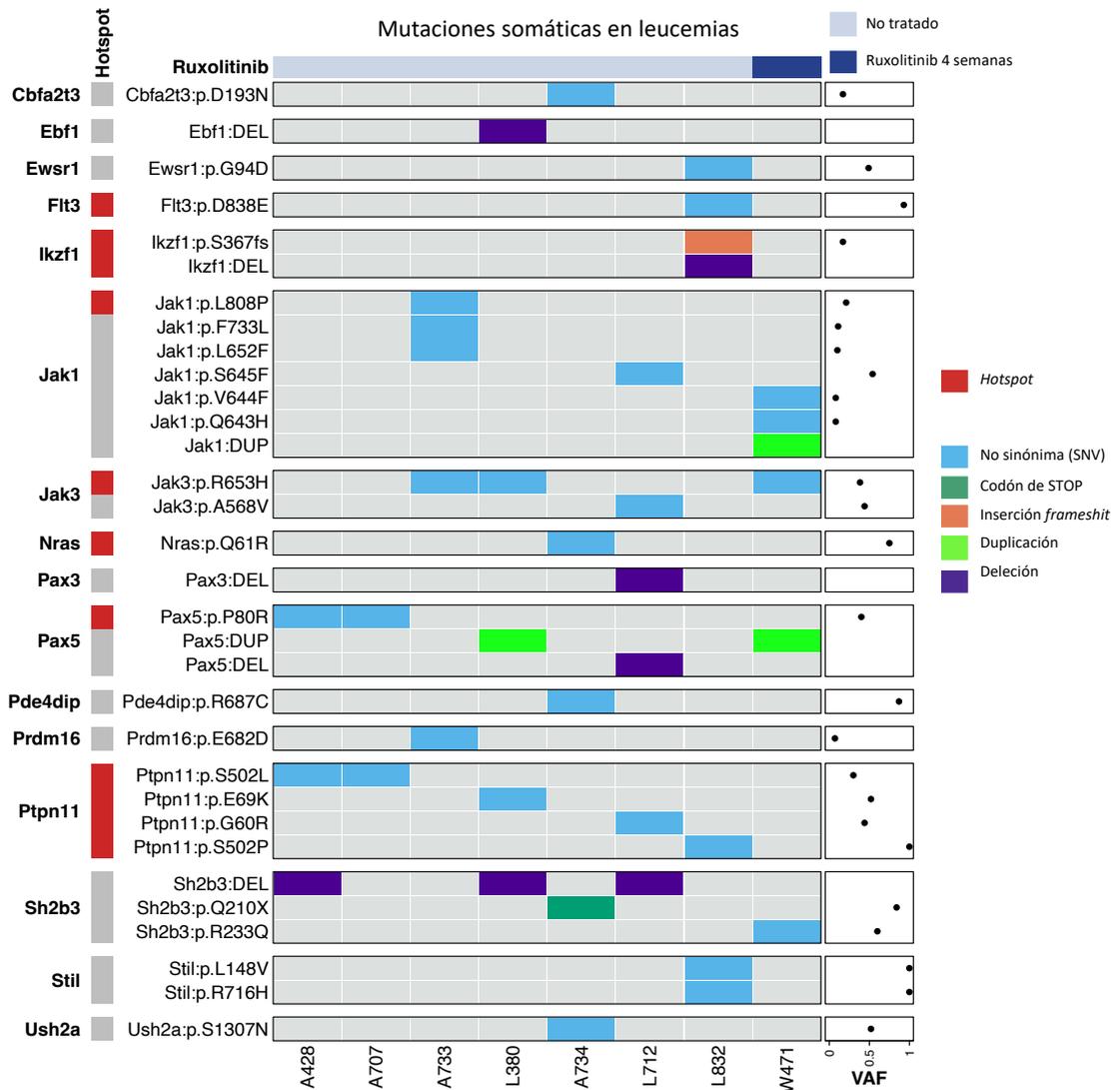
Las LLA-B se originan en base al modelo dos eventos tal como se explicó en la introducción. De esta manera, en los ratones Pax5<sup>+/-</sup> ha de producirse un segundo evento para que la leucemia aparezca. Para identificar cual fue ese segundo evento adquirido de forma somática y comprobar si es el mismo en las leucemias no tratadas que en la tratada con ruxolitinib, se llevó a cabo la secuenciación del genoma completo (WGS, de las siglas en inglés *whole genome sequencing*) de 8 ratones Pax5<sup>+/-</sup> que habían desarrollado leucemia: 7 no tratados y 1 tratado con ruxolitinib. Se analizaron de cada ratón dos muestras, una de ADN de la cola (muestra germinal, usado como ADN control de referencia) y otra de ADN extraído del tejido que en el momento del sacrificio mostró un mayor porcentaje de células leucémicas (**Tabla 2**). Una vez secuenciadas las muestras, se comparó el perfil genético de cada ratón entre una muestra de ADN de la cola y la muestra tumoral.

## RESULTADOS

**Tabla 2 – Relación de tejidos que en cada ratón mostraron mayor número de células leucémicas en el momento del sacrificio, y el porcentaje de estas en el tejido seleccionado. Las siete primeras filas corresponden a los ratones Pax5<sup>+/-</sup> no tratados. La última corresponde al ratón tratado con ruxolitinib.**

Tratamiento	Identificador del ratón	Tejido con el porcentaje más alto de células leucémicas	Porcentaje de células leucémicas (%)
No tratamiento	A428	MO	95
	A707	MO	94
	A773	MO	70
	L832	MO	91
	L380	MO	95
	A734	NL	80
	L712	MO	85
Ruxolitinib	W471	NL	90

En los ratones tratados con el placebo, se identificaron varias mutaciones somáticas recurrentes y algunas alteraciones en el número de copias de factores de transcripción relacionados con rutas específicas de células B (por ejemplo, en *Ikzf1*, *Pax5* y *Ebf1*), que además son similares a las que aparecen en leucemias humanas (**Figura 59**, **Figura suplementaria 1**). También se encontraron varias mutaciones recurrentes en genes de la vía JAK/STAT y en la vía de señalización RAS. En el caso particular de la LLA-B del ratón tratado con ruxolitinib, se encontraron mutaciones en la vía JAK/STAT similares a aquellas en los ratones no tratados, lo que sugirió que, en este caso particular, el tratamiento falló al intentar erradicar todas las células susceptibles.



**Figura 59 – OncoPrint de las mutaciones de un solo nucleótido y alteraciones del número de copias encontradas en el WGS de las 8 leucemias analizadas.** Se muestran en la parte inferior el código identificativo de cada columna; en la parte superior se indica con azul claro los ratones no tratados con ruxolitinib y en azul oscuro el ratón tratado con ruxolitinib durante 4 semanas. Se muestran las alteraciones ordenadas por gen, ordenados por nombre en la parte izquierda de la figura; de cada gen se pueden visualizar las mutaciones encontradas. En la columna de la izquierda se muestran los genes que se han descrito como mutaciones secundarias en leucemias humanas, y coloreados de rojo los hotspot (del inglés, puntos calientes, los sitios del gen más frecuentemente mutados) de los distintos genes. En la columna de la derecha se muestra un mapa de puntos que representa la media de la fracción de alelos con la variante tumoral de cada mutación encontrada (VAF, de las siglas en inglés variant allele fraction). En la leyenda se muestra el color que identifica cada tipo de mutación encontrada; SNV se refiere a mutaciones de nucleótido único (del inglés, single nucleotide variation), y frameshit se refiere al cambio en el marco de lectura del gen resultante de una mutación.

## RESULTADOS

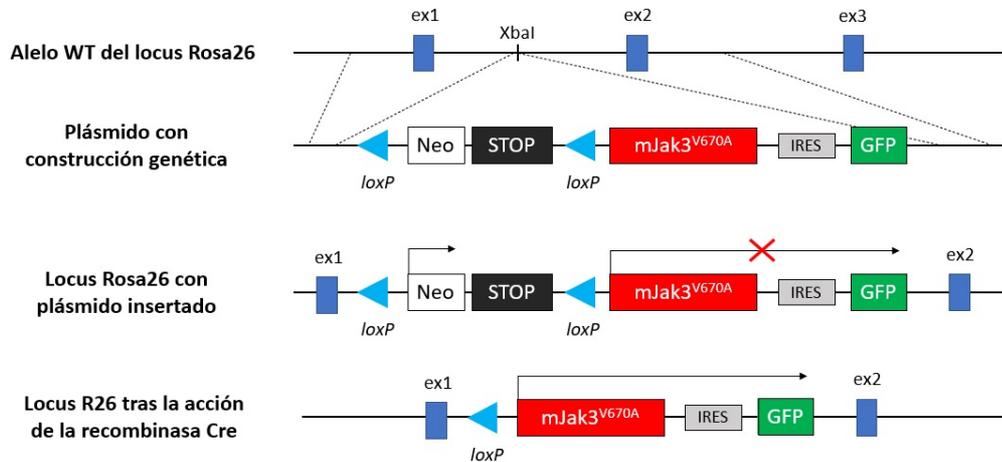
---

### 2.5. La expresión de la mutación $Jak3^{V670A}$ restringida al linaje B causa LLA-B en ratones con una latencia muy corta

Hasta este punto, se ha demostrado el efecto preventivo del tratamiento con ruxolitinib en el desarrollo de la leucemia, y se ha establecido que el caso particular del ratón tratado con ruxolitinib que sucumbió a la enfermedad se debió a una erradicación incompleta de las células susceptibles a transformación maligna. El paso siguiente fue preguntarse, si esta hipótesis era cierta, o si bien el tratamiento lo que hacía era matar las células ya leucémicas o que adquiriesen la mutación en la vía de JAK/STAT en el momento del tratamiento. En ese caso, el tratamiento con ruxolitinib estaría matando las células leucémicas, y no las susceptibles a malignizar. Sin embargo, esta posibilidad no parecía muy real, ya que se realizó una secuenciación en ratones  $Pax5^{+/-}$  (con una profundidad de 600.000 -  $2,5 \times 10^6$  lecturas) y se vio que estas mutaciones en *Jak* solo aparecían cuando los ratones manifestaban la leucemia. Por tanto, la reducción de los casos de leucemia ha de deberse a que el tratamiento con ruxolitinib eliminó, por completo o parcialmente, las células B inmaduras que son susceptibles de adquirir las mutaciones secundarias (células  $Pax5^{+/-}$ ) que las transforman en células leucémicas, como pueden ser estas mutaciones en *Jak*. Esta segunda hipótesis parecía más plausible.

Con el fin de demostrar que esta era la hipótesis correcta, se generó un modelo de ratón transgénico con un fondo genético  $Pax5^{+/-}$  y que además expresase la mutación  $Jak3^{V670A}$ , que ha sido descrita como segundo evento en leucemias humanas, solo en células B. Se generó un modelo de ratón transgénico mediante la inclusión de un constructo genético en el locus ubicuo *Rosa26*. Este constructo contenía el gen *Jak3* con la mutación *V670A*, precedida por un codón de STOP, flanqueado por sitios *loxP* para evitar la expresión de esta mutación en todas las células, y con un gen reportero aguas abajo (GFP, del inglés *green fluorescence protein*) para poder comprobar cuándo se expresaba el transgén con la mutación (**Figura 60**). Este ratón se cruzó con ratones  $Pax5^{+/-}$  para obtener ratones con ese fondo genético y que incluyesen el constructo. Para activar la expresión de la mutación, estos ratones *Rosa26-*

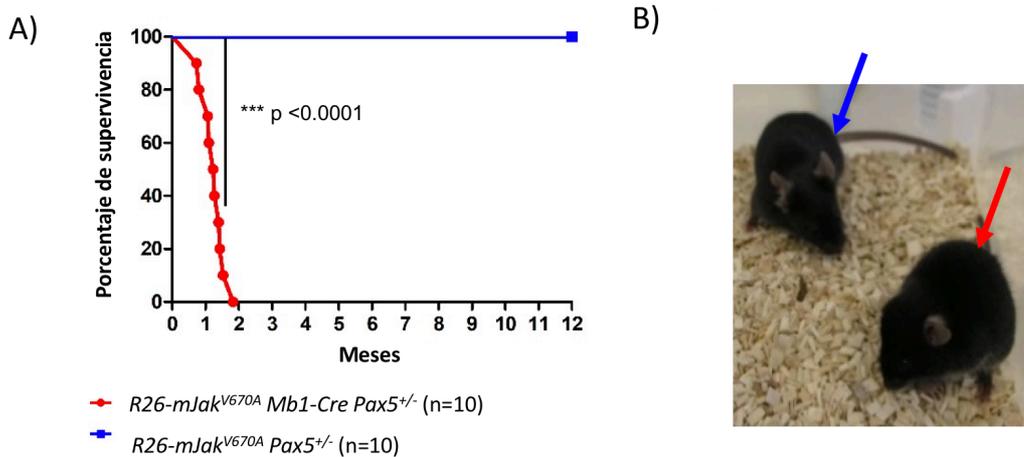
*mJak3<sup>V670A</sup>; Pax5<sup>+/-</sup>* se cruzaron con ratones *Mb1-Cre<sup>203(p1)</sup>*. Los animales *Mb1-Cre* activan la expresión de la recombinasa Cre en estado pro-B, lo que conduce a la escisión del codón de STOP y por tanto a la expresión de *Jak3<sup>V670A</sup>* únicamente en células B (**Figura 60**).



**Figura 60 - Imagen del constructo utilizado para la generación de los ratones transgénicos *Rosa26-mJak3<sup>V670A</sup>; Mb1-Cre; Pax5<sup>+/-</sup>*.** Se insertó el vector con el constructo de interés en el alelo WT del locus *Rosa26* gracias al proceso de recombinación homóloga. Se seleccionaron las células que insertaron el vector gracias al gen de resistencia a la neomicina, y se utilizaron para la generación del ratón transgénico *Rosa26-mJak3<sup>V670A</sup>*. Cuando el plásmido se inserta en el locus *Rosa26*, estas células adquieren la resistencia a la neomicina que permite su selección. Tras la acción de la recombinasa Cre, el cassette de resistencia a la neomicina y el codón de STOP se escinden y se inicia la expresión de la mutación de *Jak3* y la proteína GFP.

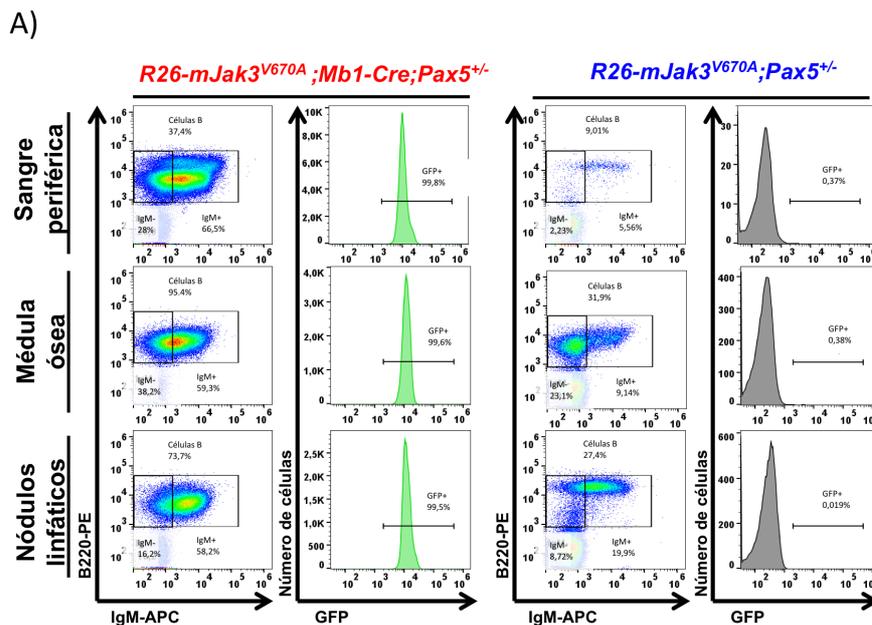
Estos ratones se mantuvieron siempre en SPF, ya que en este modelo se quiso demostrar que la mutación en JAK3 puede actuar de segundo evento, y por tanto se necesitaba de la exposición a infección para propiciar la aparición del segundo evento en el clon preleucémico *Pax5<sup>+/-</sup>*. Todos los ratones *Rosa26-mJak3<sup>V670A</sup>; Mb1-Cre<sup>+</sup>; Pax5<sup>+/-</sup>* desarrollaron LLA-B en tan solo 4 semanas tras el nacimiento en ambiente libre de infecciones (**Figura 61 A**). Ratones de la misma edad que eran *Mb1-Cre<sup>-</sup>* nunca desarrollaron LLA-B en condiciones SPF. Estos resultados estaban en línea con la teoría de que los ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* desarrollan leucemia en CF gracias a que la infección dispara la aparición del segundo evento, pero en este nuevo modelo este segundo evento está incorporado en el linaje B, provocando una aceleración en la aparición de la leucemia. Por tanto, con este modelo se demostró que la mutación en *Jak3* permite la transformación maligna de células *Pax5<sup>+/-</sup>* en un periodo de tiempo muy corto, por lo que las mutaciones secundarias parecen surgir justo antes de la explosión de la leucemia y no en el desarrollo temprano.

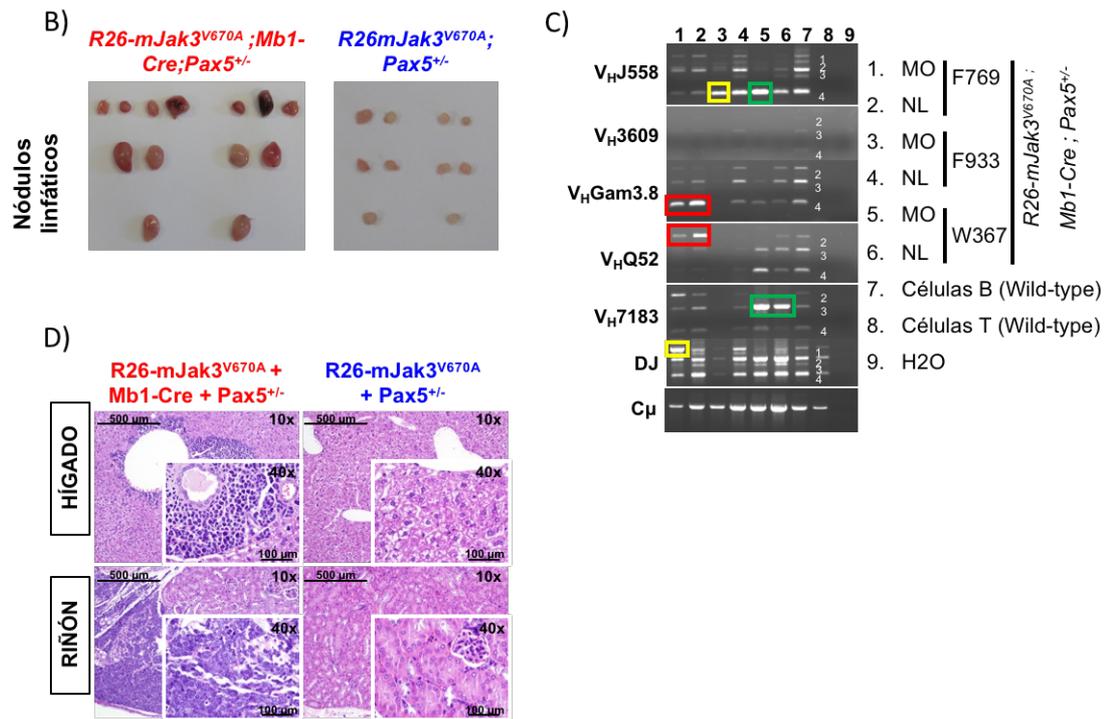
## RESULTADOS



**Figura 61 – La mutación en Jak3 permite la aparición de LLA-B con una latencia muy corta en animalario SPF. A)** Supervivencia asociada a LLA-B de ratones  $Rosa26^{mJak3\_V670A}; Mb1\text{-}Cre+; Pax5^{+/-}$  y ratones  $Rosa26^{mJak3\_V670A}; Pax5^{+/-}$  que no tenían activada la expresión de  $Jak3^{V670A}$  (nunca desarrollaron leucemia en SPF). Las figuras representan la edad a la que los animales fueron sacrificados. Los p-valoros se corresponden a los obtenidos por análisis Log-rank (Mantel-cox): p-valor < 0,0001 **B)** Imagen de un ratón  $Rosa26^{mJak3\_V670A}; Pax5^{+/-}$  (flecha azul) y otro  $Rosa26^{mJak3\_V670A}; Mb1\text{-}Cre+; Pax5^{+/-}$  (flecha roja) de la misma edad. Se observa el deterioro del ratón  $Rosa26^{mJak3\_V670A}; Mb1\text{-}Cre+; Pax5^{+/-}$  como consecuencia de la enfermedad.

Las células leucémicas tenían un fenotipo  $B220^+ IgM^{+/-} CD25^+ CD19^+$  y se podían observar en SP, MO, bazo y NL, que se encontraron aumentados en tamaño en el momento del sacrificio debido a la acumulación de estas células (**Figura 62 A-B**). Además, las células leucémicas mostraron un reordenamiento BCR clonal inmaduro e infiltraban otros tejidos como el hígado y los riñones (**Figura 62 C-D**).



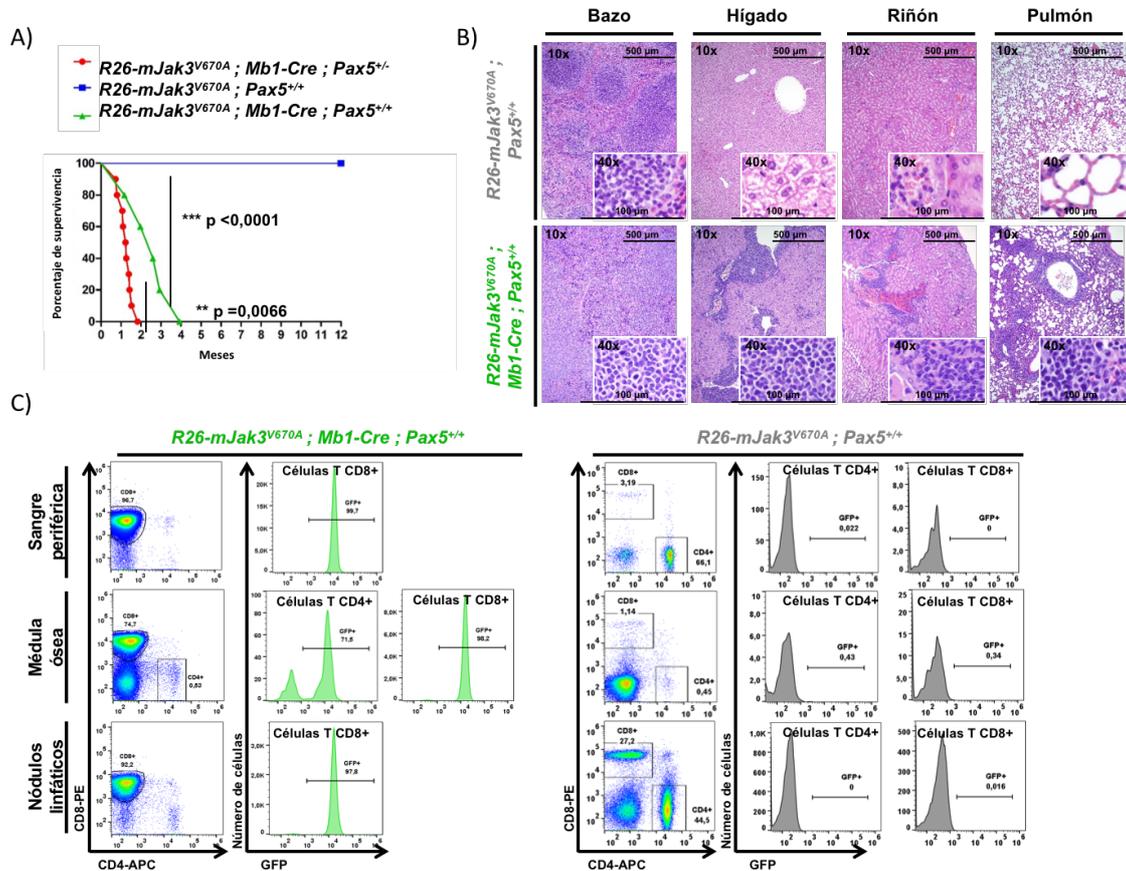


**Figura 62 – Análisis representativo de las LLA-B que se diagnosticaron en los ratones *Rosa26<sup>mJak3\_V670A</sup>; Mb1-Cre+; Pax5<sup>+/-</sup>*. A)** Análisis de citometría de flujo de la población B en un ratón enfermo *Rosa26<sup>mJak3\_V670A</sup>; Mb1-Cre+; Pax5<sup>+/-</sup>* y en un ratón *Rosa26<sup>mJak3\_V670A</sup>; Pax5<sup>+/-</sup>* de la misma edad. Se muestran las poblaciones de sangre periférica (SP), médula ósea (MO) y nódulos linfáticos (NL). Se muestra el número de células GFP+ como marcador de la expresión del transgén *mJak3<sup>V670A</sup>* en las células leucémicas (el 100% de células leucémicas son GFP+, indicando la expresión del transgén en esas células). **B)** Imágenes de los NL de un ratón *Rosa26<sup>mJak3\_V670A</sup>; Mb1-Cre+; Pax5<sup>+/-</sup>* enfermo y un ratón sano *Rosa26<sup>mJak3\_V670A</sup>; Pax5<sup>+/-</sup>*. Se observa un aumento de tamaño en los nódulos del ratón enfermo como consecuencia de la acumulación de células leucémicas. **C)** Análisis de la clonalidad del BCR en células leucémicas de MO y NL de ratones *Rosa26<sup>mJak3\_V670A</sup>; Mb1-Cre+; Pax5<sup>+/-</sup>*. La PCR del reordenamiento de los genes del BCR confirmó el aumento de la clonalidad en las células leucémicas (recuadros de colores). Como control de policlonalidad del BCR se utilizaron células CD19+ de bazo de ratones WT sanos. Como control negativo se utilizaron células T dobles positivas (CD4+ CD8+) del timo de ratones WT sanos. **D)** Imágenes representativas del análisis anatomopatológico con tinción de hematoxilina y eosina del hígado y el riñón de ratón enfermo *Rosa26<sup>mJak3\_V670A</sup>; Mb1-Cre+; Pax5<sup>+/-</sup>* y ratón sano *Rosa26<sup>mJak3\_V670A</sup>; Pax5<sup>+/-</sup>* de la misma edad. En el ratón enfermo se observa la pérdida de la arquitectura normal de los tejidos como resultado de la infiltración de células linfoides leucémicas. La ampliación y la escala se indican en cada caso

Para confirmar que existía una cooperación entre la heterocigosidad de *Pax5<sup>+/-</sup>* y esta mutación de *Jak3* en el desarrollo de leucemia, se quiso comprobar si ratones con la mutación, pero sin la susceptibilidad que aporta la pérdida de un alelo de *Pax5*, desarrollaban leucemia en las mismas condiciones. Con este fin se generó un modelo similar pero sin la pérdida de un alelo *Pax5*: *Rosa26-mJak3<sup>V670A</sup>; Mb1-Cre+; Pax5<sup>+/+</sup>*. Estos ratones desarrollaron, aunque con una latencia mayor, leucemias. Sin embargo, en este caso las células leucémicas mostraron un fenotipo T (LLA-T) (**Figura 63**). Esto demostró que la

## RESULTADOS

haploinsuficiencia en *Pax5* es necesaria para establecer la identidad de células B en el desarrollo de la LLA-B<sup>29</sup>.



**Figura 63 – Análisis representativos del fenotipo que se observó en los ratones *Rosa26<sup>mJak3\_V670A</sup>; Mb1-Cre<sup>+</sup>; Pax5<sup>+/-</sup>*** **A)** Supervivencia global de los ratones *Rosa26<sup>mJak3\_V670A</sup>; Mb1-Cre<sup>+</sup>; Pax5<sup>+/-</sup>* (rojo), *Rosa26<sup>mJak3\_V670A</sup>; Mb1-Cre<sup>+</sup>; Pax5<sup>+/+</sup>* (verde) y ratones *Rosa26<sup>mJak3\_V670A</sup>; Pax5<sup>+/-</sup>* (azul). Las figuras representan la edad a la que los animales fueron sacrificados. Los p-valores se corresponden a los obtenidos por análisis Log-rank (Mantel-cox).  $p < 0,0001$  comparando la supervivencia de *Rosa26<sup>mJak3\_V670A</sup>; Mb1-Cre<sup>+</sup>; Pax5<sup>+/-</sup>* versus *Rosa26<sup>mJak3\_V670A</sup>; Pax5<sup>+/-</sup>*;  $p = 0,0066$  comparando *Rosa26<sup>mJak3\_V670A</sup>; Mb1-Cre<sup>+</sup>; Pax5<sup>+/-</sup>* versus *Rosa26<sup>mJak3\_V670A</sup>; Mb1-Cre<sup>+</sup>; Pax5<sup>+/+</sup>*. **B)** Imágenes representativas de análisis anatómopatológico con tinción de hematoxilina y eosina del bazo, hígado, riñón y pulmón de ratón enfermo *Rosa26<sup>mJak3\_V670A</sup>; Mb1-Cre<sup>+</sup>; Pax5<sup>+/-</sup>* y ratón sano *Rosa26<sup>mJak3\_V670A</sup>; Pax5<sup>+/+</sup>* de la misma edad. En el ratón enfermo se observa la pérdida de la arquitectura normal de los tejidos como resultado de la infiltración de células leucémicas. La ampliación y la escala se indican en cada caso **C)** Análisis representativos de citometría de la población B en ratón enfermo *Rosa26<sup>mJak3\_V670A</sup>; Mb1-Cre<sup>+</sup>; Pax5<sup>+/-</sup>* y ratón sano *Rosa26<sup>mJak3\_V670A</sup>; Pax5<sup>+/+</sup>* de la misma edad. Se muestran las poblaciones de sangre periférica, médula ósea y nódulos linfáticos. Se muestra el número de células GFP+ como marcador de la expresión del transgén *mJak3<sup>V670A</sup>* en las células leucémicas (el 100% de células leucémicas son GFP+, indicando la expresión del transgén en esas células).

Estos modelos transgénicos demuestran la cooperación fundamental de *Pax5* y mutaciones en la vía JAK/STAT en el desarrollo de la LLA-B. Cuando estas mutaciones aparecen a la vez en una célula B desde el inicio del linaje,

como en el caso del ratón *Rosa26-mJak3<sup>V670A</sup>; Mb1-Cre<sup>+</sup>; Pax5<sup>+/-</sup>*, la aparición de la LLA-B es muy rápida. Estos resultados demostrarían que en ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* las mutaciones en los genes *Jak* no estarían presentes en unas pocas células preleucémicas ya en el momento del nacimiento, sino que deben adquirirse más adelante.

De esta manera, se concluyó que el tratamiento con ruxolitinib conseguiría disminuir la incidencia de la leucemia al reducir el número de células inmaduras B que son susceptibles de sufrir transformación maligna al adquirir estas mutaciones más adelante. Esto demuestra que la inhibición transitoria de la vía JAK/STAT en células *Pax5<sup>+/-</sup>* preleucémicas podría convertirse en una herramienta de prevención de la LLA-B al matar selectivamente las células preleucémicas y no atacar otras células *Pax5<sup>+/-</sup>* que, en definitiva, son células sanas. Se demuestra así la realidad de la prevención de la leucemia, lo que supone una nueva puerta de investigación para el tratamiento de esta y otras enfermedades.

### 3. El tratamiento con poly(I:C) no mitiga el defecto inmunológico inducido por la deficiencia de *Pax5* en los ratones ni disminuye la incidencia de leucemia

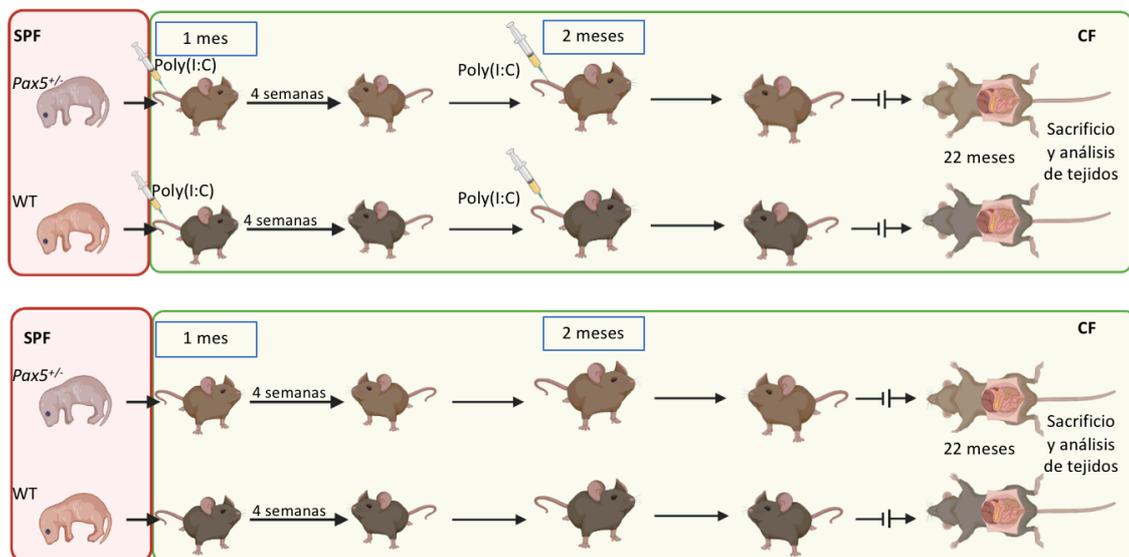
Como se ha introducido anteriormente, la deficiencia de *Pax5* conduce a una inmunodeficiencia caracterizada por una disminución del número de células B maduras recirculantes, consecuencia del bloqueo de la maduración de dichas células en la médula ósea<sup>125,126</sup>. Además, esta alteración genética también hace que estos ratones sean susceptibles a sufrir LLA-B cuando se exponen a infecciones comunes<sup>78</sup> o cuando se altera su microbiota intestinal, como se ha demostrado en apartados anteriores.

Por lo tanto, el defecto inmunológico que la deficiencia de *Pax5* produce en estos ratones aumenta la probabilidad de que estos desarrollen LLA-B. Partiendo de esta hipótesis, se planteó mitigar el defecto inmunológico que tienen estos ratones mediante la estimulación del sistema inmunitario innato. Para ello se empleó el poly(I:C) (*Polyinosinic:polycytidylic acid*), un análogo del ARN de doble cadena frecuentemente usado como inmunoestimulador, como adyuvante en vacunas y vacunación antitumoral y como activador de la respuesta antiviral<sup>132,165–173</sup>. Por su estructura, el compuesto poly(I:C) debería ser detectado por vía del TLR3, por tanto Myd88-independiente, pero tanto en modelos de ratón *knockout* para TLR3 y para Myd88 (*Tlr3*<sup>-/-</sup> y *Myd88*<sup>-/-</sup> respectivamente) se observa una activación de la respuesta inflamatoria y antiviral tras la administración del compuesto, por lo que ninguna de las dos vías debe ser indispensable para la señalización<sup>163,164</sup>.

#### 3.1 La administración de poly(I:C) tiene un efecto activador de la respuesta inmunitaria.

Para conseguir mitigar el defecto inmunológico de los ratones *Pax5*<sup>+/-</sup>, la estimulación del sistema inmunitario innato debería realizarse en edades tempranas. En este enfoque experimental, se decidió tratar a los ratones con dos dosis de poly(I:C) con una separación de un mes entre ambas para potenciar el

efecto de la primera inoculación con la segunda dosis. La primera dosis se administró a los animales en el momento de ser expuestos al inmunoestrés: cuando fueron trasladados a CF (tenían aproximadamente 1 mes de edad). La segunda dosis se les administró 4 semanas después. A cada animal se le administraron 200  $\mu$ g del compuesto poly(I:C) disuelto en PBS estéril a través de la vena de la cola (**Figura 64**). Se utilizaron 31 ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* para el tratamiento con poly(I:C). Como grupos controles, se utilizaron ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* no tratados con poly(I:C) (n=35), ratones WT tratados con poly(I:C) (n=14) y ratones WT no tratados (n=20).

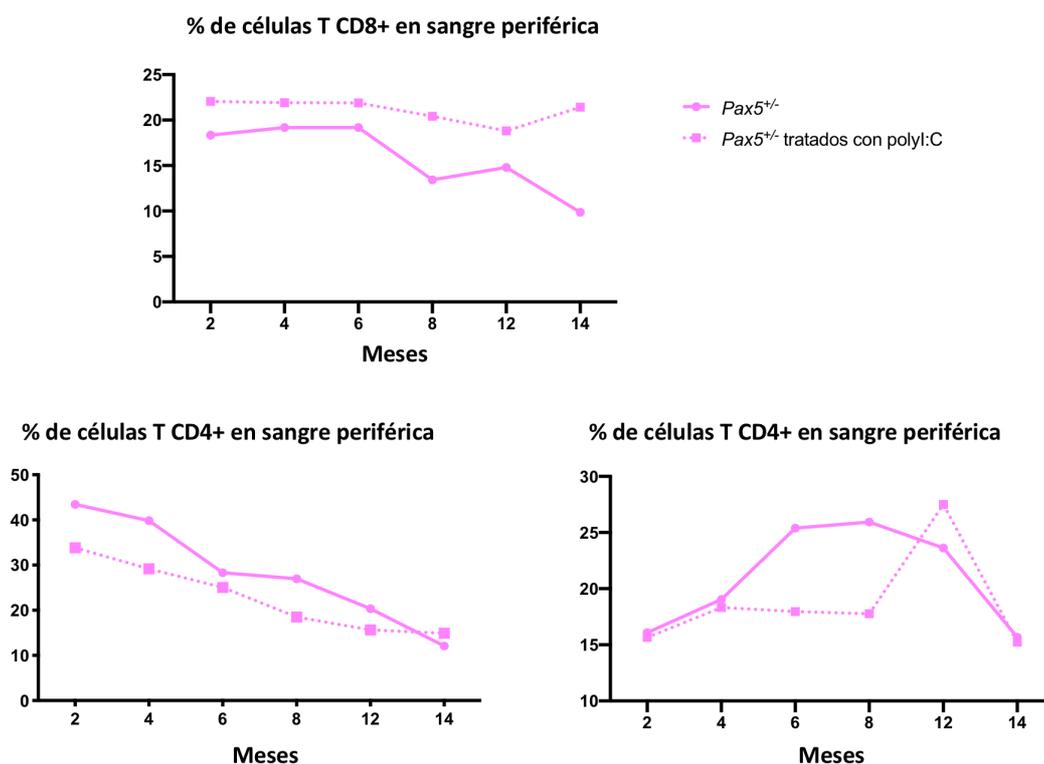


**Figura 64- Diseño experimental.** Los ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* y WT nacieron en el animalario SPF y fueron mantenidos allí hasta alcanzar 1 mes de edad. En ese momento se trasladaron a CF y se les administró la primera dosis con 200  $\mu$ g de poly(I:C) a 34 ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* y 14 ratones WT. Como grupo control, el resto de ratones de cada genotipo se mantuvo en las mismas condiciones. A las 4 semanas se administró la segunda dosis de 200  $\mu$ g de poly(I:C) a los animales previamente tratados. Los ratones fueron monitorizados periódicamente. Cuando alcanzaron 2 años de edad (22-24 meses) o cuando mostraron signos de enfermedad (signos clínicos o presencia de blastos en sangre periférica), los animales fueron sacrificados y se procedió al análisis de los tejidos hematopoyéticos y no hematopoyéticos.

Los animales se monitorizaron periódicamente durante toda su vida mediante análisis de citometría de flujo a partir de muestras de SP. Con estos controles rutinarios, además de determinar la aparición de células leucémicas en los ratones enfermos, se pudo estudiar si el poly(I:C) alteraba la composición hematopoyética.

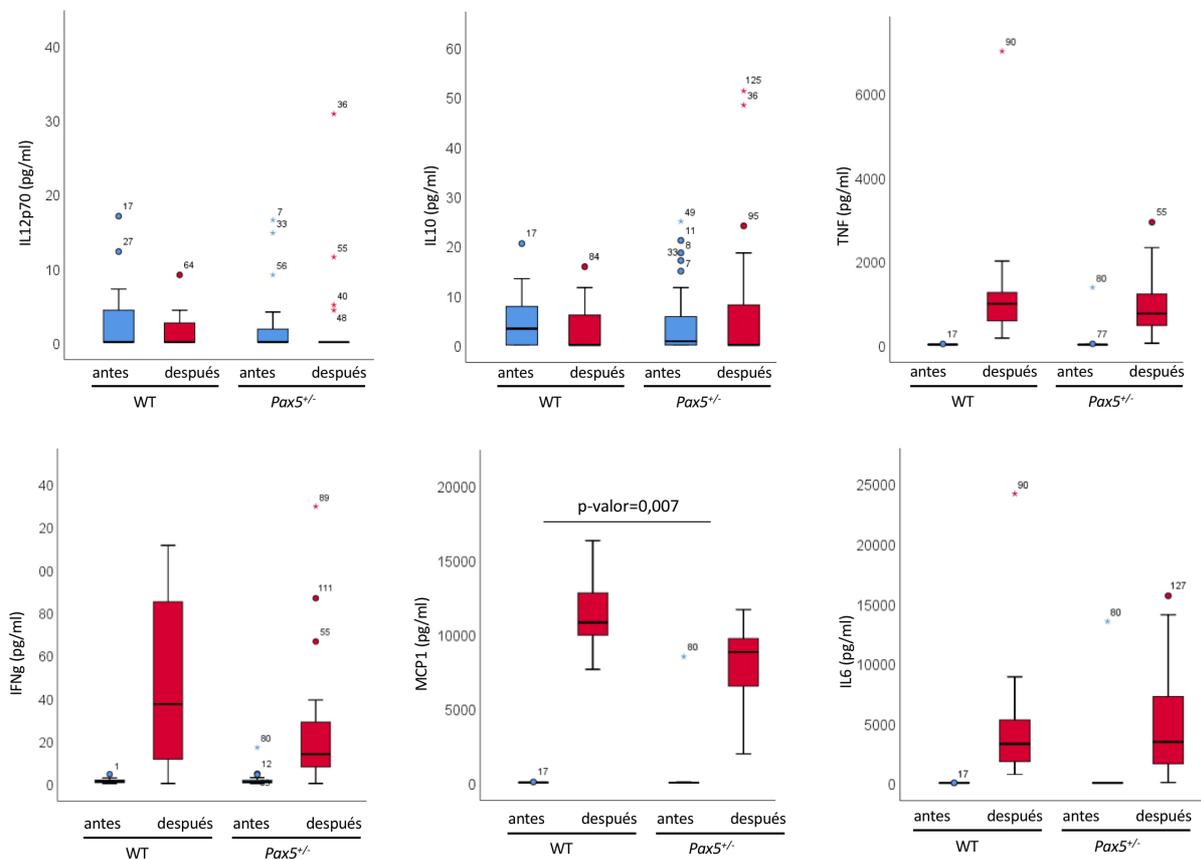
## RESULTADOS

Para comprobar que la estimulación con poly(I:C) estaba teniendo el efecto deseado de estimulación del sistema inmunitario, se emplearon dos aproximaciones. Por un lado, se analizaron los cambios que la administración de poly(I:C) produce en la composición hematopoyética de estos ratones. De esta manera, en los análisis rutinarios se estudiaron los cambios de las distintas poblaciones de células inmunitarias en la sangre para poder observar si el poly(I:C) estaba teniendo un efecto activador de la respuesta inmunitaria. Así, se observó el aumento de células T CD8<sup>+</sup> circulantes en SP (y no de otros linajes celulares como T CD4<sup>+</sup> o células B) como una confirmación de la activación de la respuesta antiviral, un efecto descrito tras la administración de poly(I:C)<sup>162,170</sup> (**Figura 65**). Se observó un aumento del porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> en la SP de los ratones *Pax5*<sup>+/-</sup> tratados con poly(I:C) en comparación con ratones del mismo genotipo sin tratamiento con poly(I:C) (aumento evidente y mantenido a lo largo del tiempo, aunque no alcanzó significación estadística).



**Figura 65 - Porcentajes de células T CD8<sup>+</sup>, T CD4<sup>+</sup> y B en sangre periférica en ratones *Pax5*<sup>+/-</sup> tratados poly(I:C) en comparación con ratones *Pax5*<sup>+/-</sup> sin tratar.** Se observa un aumento de células T CD8<sup>+</sup> en sangre en ratones *Pax5*<sup>+/-</sup> tratados, sin llegar a ser un incremento estadísticamente significativo. En la gráfica se representa cada punto como la media de los niveles de las distintas poblaciones en todos los ratones de cada grupo (n=31 para los ratones tratados con poly(I:C) y n=8 para los ratones no tratados).

Por otro lado, se analizó el perfil inflamatorio en los ratones tratados con poly(I:C) para comprobar si había una respuesta inflamatoria a la administración del compuesto. Para este análisis se recogieron muestras sanguíneas de cada ratón antes y después de la administración del poly(I:C). A partir del suero obtenido con esta recogida de muestras, y utilizando el kit *CBA Inflammation Kit* que analiza simultáneamente IL6, IL10, MCP1, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL12p70, se estudiaron los cambios producidos por el tratamiento. El análisis de citoquinas mostró un aumento de la concentración de las citoquinas relacionadas con la inflamación tras el tratamiento con poly(I:C), tanto en ratones WT como en ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* (**Figura 66**).



**Figura 66 - Análisis de las citoquinas inflamatorias IL-12p70, IL-10, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , MCP1 e IL-6 en el suero de ratones WT y *Pax5<sup>+/-</sup>* antes y después del tratamiento con poly(I:C).** Se representa en cada caso la concentración de cada citoquina. Las barras representan la media y la desviación estándar. Los valores de significación (p-valores) corresponden a los obtenidos por test t apareado. Solo se indican valores significativos.

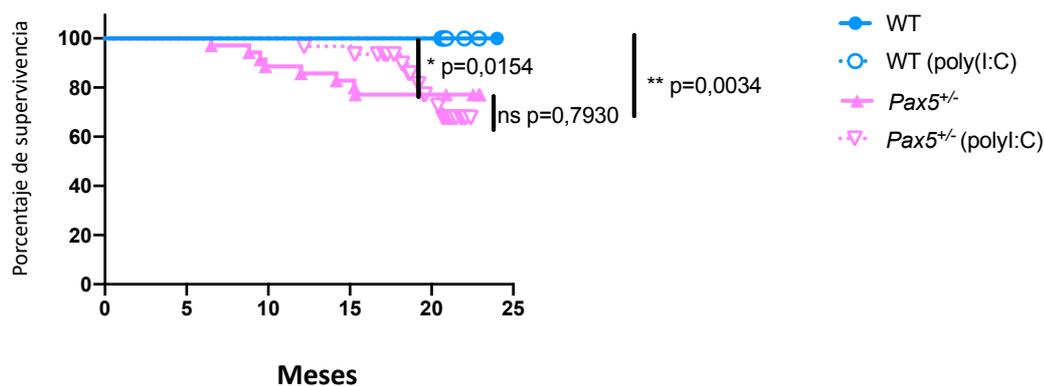
Con estos datos, concluimos que la administración de poly(I:C) estaba teniendo un efecto activador del sistema inmunitario similar en los ratones WT y los ratones *Pax5<sup>+/-</sup>*.

## RESULTADOS

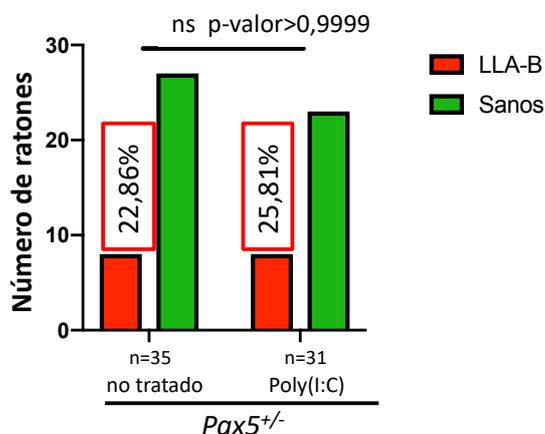
### 3.2 La administración de poly(I:C) en edades tempranas no previene el desarrollo de LLA-B en ratones *Pax5<sup>+/-</sup>*

Cuando finalizó el tiempo del experimento y se analizó la supervivencia de estos ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* se determinó que la administración de poly(I:C) no disminuía la incidencia de LLA-B en ratones con esta susceptibilidad genética (**Figura 67 A**). Un 25,81% (8 de 31) de los ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* tratados con poly(I:C) desarrolló la enfermedad bajo condiciones de exposición a infección, una incidencia similar a la observada en el grupo de ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* no tratados (22,86%) (p-valor=0,7930) (**Figura 67 B**). Sin embargo, sí se observa una disminución significativa de la supervivencia asociada a la LLA-B en ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* tratados con poly(I:C) si se compara con ratones WT tratados o no tratados estabulados en el mismo animalario (p-valor=0,0034).

A)



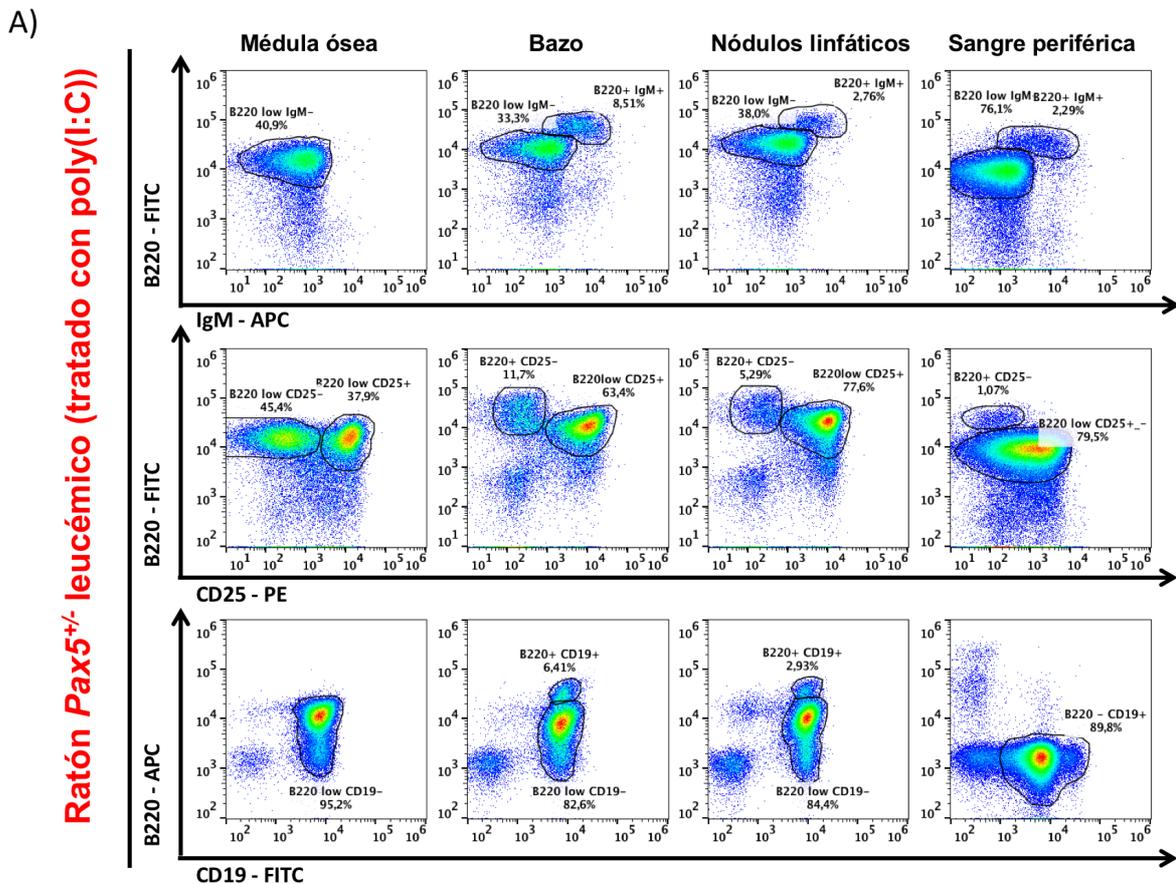
B)

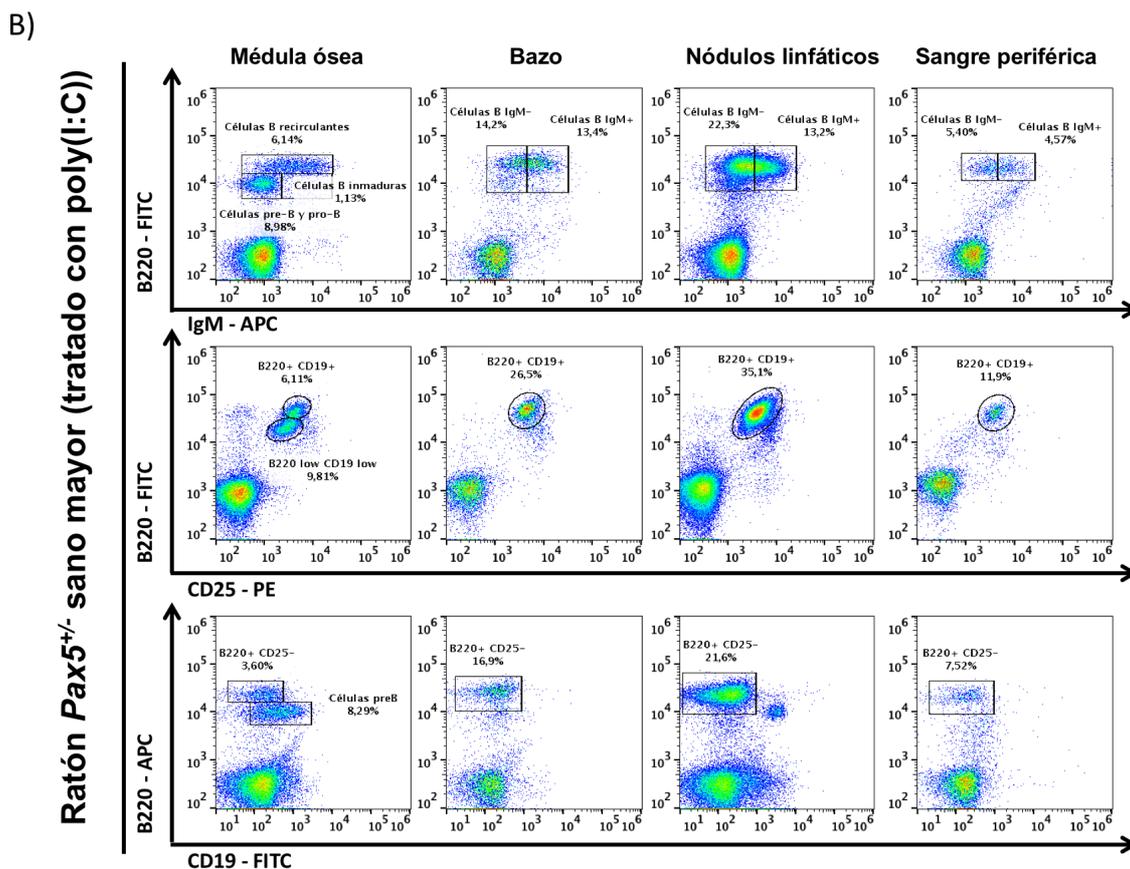


**Figura 67 - Supervivencia asociada a leucemia B (LLA-B).** **A)** Supervivencia de ratones WT no tratados (línea azul continua, n=19) y tratados con poly(I:C) (línea azul punteada, n=14), ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* no tratados

(línea rosa continua, n=35) y ratones Pax5<sup>+/-</sup> tratados con poly(I:C) (línea rosa punteada, n=31). Las figuras representan la edad a la que animales fueron sacrificados. Los p-valores se corresponden a los obtenidos por análisis Log-rank (Mantel-cox): p-valor: 0,0154 comparando supervivencia específica asociada a LLA-B de ratones Pax5<sup>+/-</sup> no tratados versus ratones WT tratados o no tratados, p-valor: 0,0034 comparando ratones Pax5<sup>+/-</sup> tratados con poly(I:C) versus ratones WT tratados o no tratados, y p-valor: 0,7930 comparando la supervivencia asociada a LLA-B de ratones Pax5<sup>+/-</sup> no tratados versus ratones Pax5<sup>+/-</sup> tratados. Del resto de las comparaciones no se muestra el p-valor al no ser estadísticamente significativas. **B)** Se muestran los números de ratones Pax5<sup>+/-</sup> sanos (verde) y enfermos con LLA-B (rojo), no tratados y tratados con poly(I:C). No se observan cambios significativos en la incidencia de LLA-B (p>0,9999). En recuadros rojos se indica la incidencia de LLA-B en cada grupo de animales. Los valores de significación (p-valores) corresponden a los obtenidos con el test de Fisher.

Las leucemias diagnosticadas en los ratones Pax5<sup>+/-</sup> tratados con poly(I:C) se diagnosticaron entre los 12 y los 21 meses de edad (11 y 20 meses después del tratamiento con poly(I:C), respectivamente) (**Figura 67 A**). Por citometría de flujo, se determinó el fenotipo de las células leucémicas: B220<sup>low</sup> IgM<sup>-</sup> CD19<sup>+/-</sup> cKit<sup>+/-</sup> CD25<sup>+/-</sup> (**Figura 68 A**). Las células leucémicas infiltraron otros órganos como los nódulos linfáticos y el bazo. En ningún ratón Pax5<sup>+/-</sup> sano tratado con poly(I:C) se encontraron células de ese mismo fenotipo (**Figura 68 B**).





**Figura 68** – Imágenes representativas del análisis de citometría de flujo de las leucémicas diagnosticadas en los ratones tratados con poly(I:C). A) Se muestra el análisis de citometría de flujo de un ratón Pax5<sup>-/-</sup> leucémico tratado con poly(I:C). Se observa la presencia de células leucémicas en sangre, médula ósea y nódulos linfáticos. B) Se muestra el análisis de citometría de flujo de un ratón Pax5<sup>+/+</sup> sano tratado con poly(I:C). En los ejes de las figuras se indica el marcador celular analizado. Se observa la presencia de células leucémicas en los ratones enfermos y la ausencia de células con ese mismo fenotipo en los ratones sanos.

Ninguno de los ratones WT tratados con poly(I:C) desarrolló leucemia, aunque uno de ellos desarrolló un linfoma B. Las células de este ratón mostraron un fenotipo claramente distinto del observado en las células leucémicas (en este caso las células malignas mostraron un fenotipo B220<sup>low</sup> IgM<sup>+</sup> CD19<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup>) (**Figura 69 A**). En ningún ratón WT sano de edad similar ni en ratones de 22 meses (edad de fin del experimento) se observó la presencia de células con este fenotipo (**Figura 69 B**).

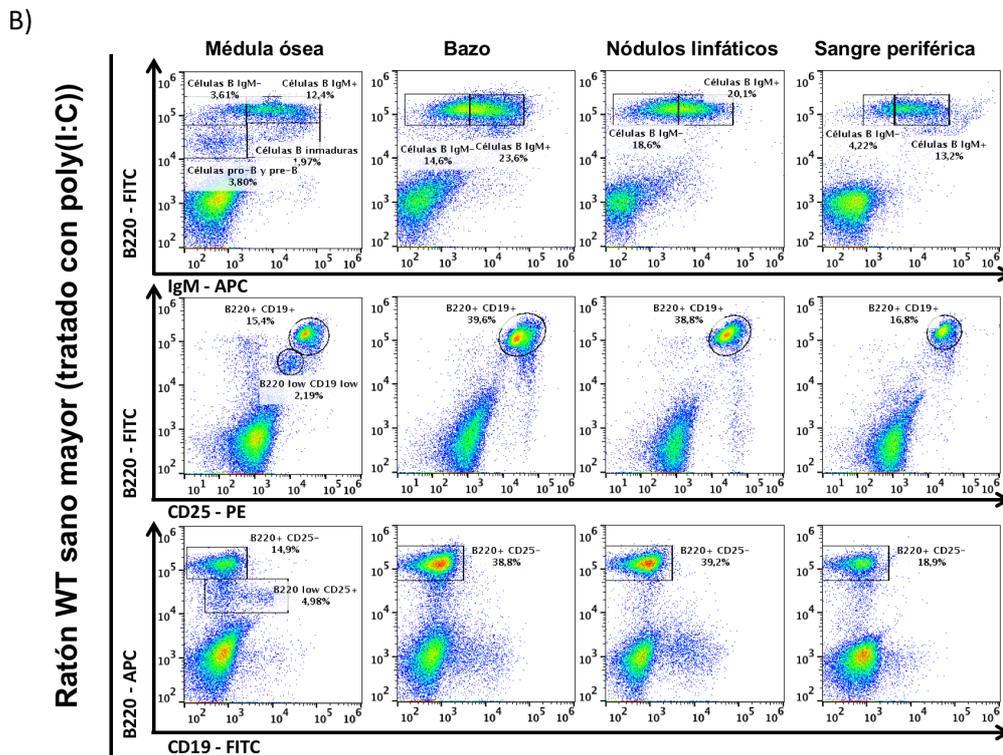
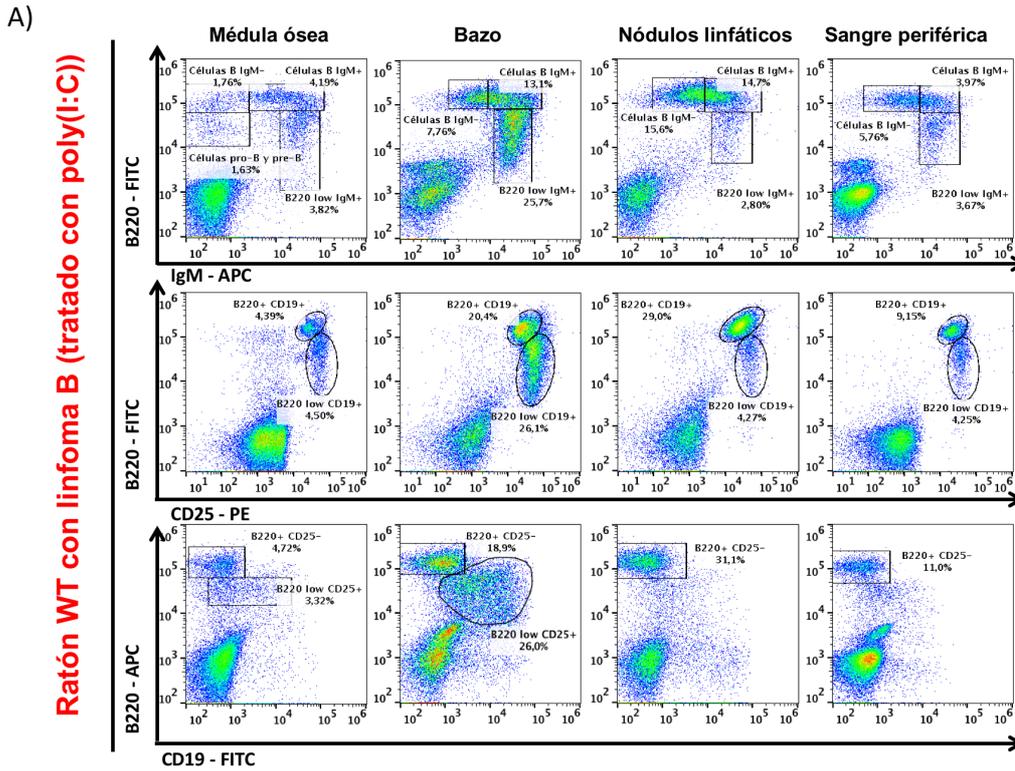
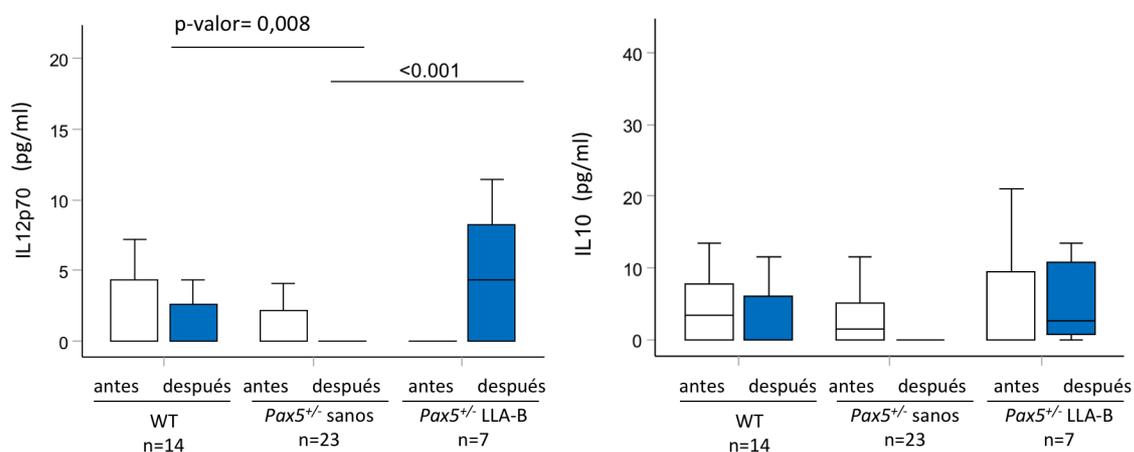
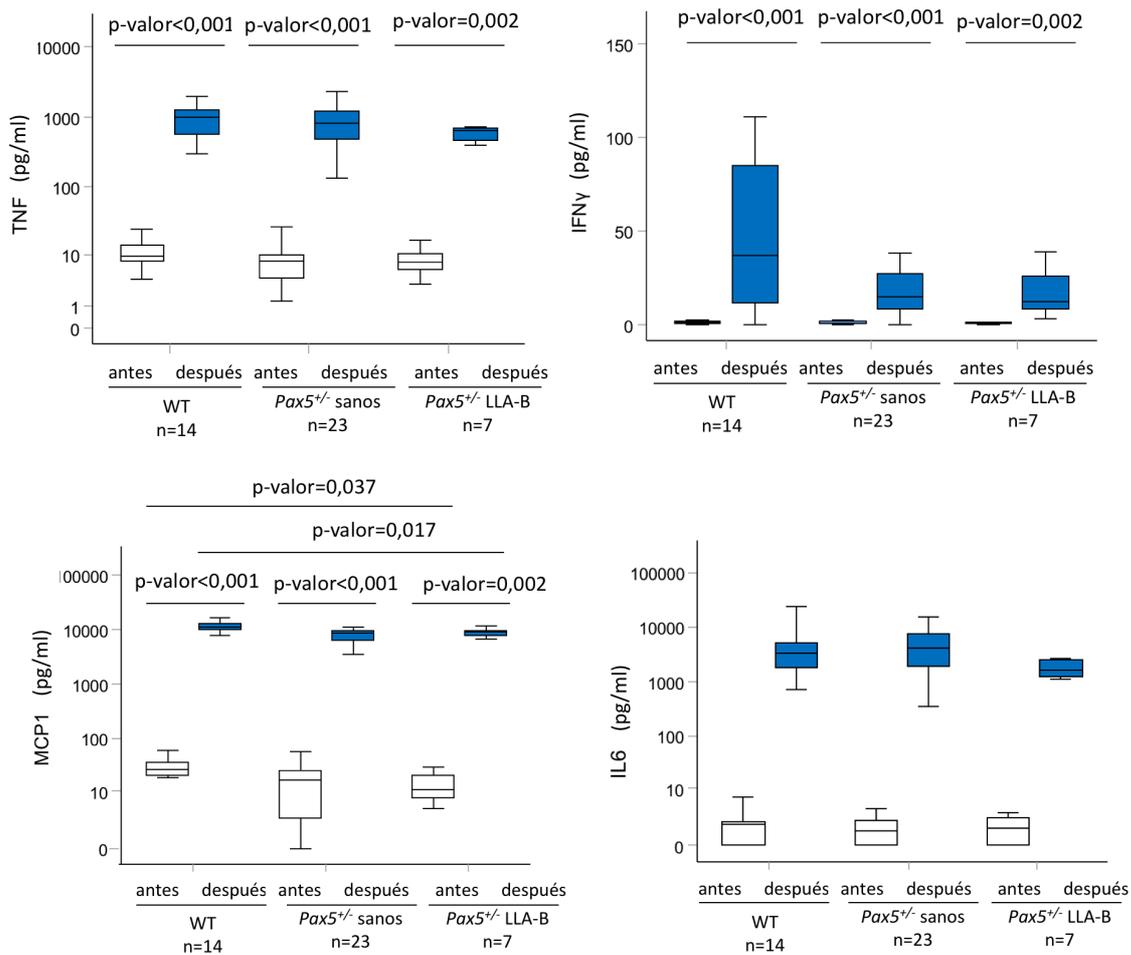


Figura 69 - Análisis de citometría de flujo de los distintos compartimentos hematopoyéticos de ratones WT tratados con poly(I:C). A) Se muestra el análisis de citometría de flujo de un ratón WT tratado con poly(I:C) que desarrolló linfoma B. Se observa la presencia de células de linfoma en médula ósea, bazo, nódulos linfáticos y sangre periférica. B) Se muestra el análisis de citometría de flujo de un ratón WT sano tratado con poly(I:C). En los ejes de las figuras se indica el marcador celular analizado. Se observa la presencia de células de linfoma en el primer caso y la ausencia de células con ese mismo fenotipo en los ratones sanos.

## RESULTADOS

Llegados a este punto, y puesto que la incidencia de LLA-B fue muy similar en los ratones *Pax5*<sup>+/-</sup> tratados y no tratados con poly(I:C), se quiso estudiar si los ratones *Pax5*<sup>+/-</sup> que en un futuro desarrollaron la enfermedad habían tenido una respuesta distinta a la administración del poly(I:C) que los ratones del mismo genotipo que se mantenían sanos. Para ello, se repitió el análisis estadístico de las concentraciones de las citoquinas inflamatorias en el suero de los ratones que se había usado para confirmar la activación del sistema inmunitario tras la administración del compuesto. En este caso, se separaron para el análisis estadístico los ratones *Pax5*<sup>+/-</sup> que habían desarrollado LLA-B de los que no. Como se observa en las gráficas de la **Figura 70** sólo la IL-12 mostró un aumento significativamente superior (p-valor<0,001) en los ratones *Pax5*<sup>+/-</sup> que posteriormente desarrollaron LLA-B frente tanto a los WT como a los *Pax5*<sup>+/-</sup> que nunca desarrollan la enfermedad. Por lo tanto, estos resultados permiten identificar por primera vez los ratones *Pax5*<sup>+/-</sup> que posteriormente desarrollarán LLA-B antes del estrés inmunológico. Este hallazgo tiene una gran relevancia para el potencial manejo terapéutico de individuos con dicha susceptibilidad.





**Figura 70 - Análisis de las citoquinas inflamatorias IL-12p70, IL-10, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , MCP1 e IL-6 en el suero de en ratones WT, Pax5<sup>+/-</sup> sanos y Pax5<sup>+/-</sup> leucémicos antes y después del tratamiento con poly(I:C). Se representa en cada caso la concentración de cada citoquina. Las barras representan la media y la desviación estándar. Los valores de significación (p-valores) corresponden a los obtenidos por test Kruskal-Wallis. Solo se indican valores significativos y los no significativos que pudiesen dar lugar a confusión.**

De esta manera, se concluyó que la estimulación del sistema inmunitario innato mediante la administración de poly(I:C) a los ratones con predisposición genética para desarrollar LLA-B Pax5<sup>+/-</sup> no es suficiente para frenar el desarrollo de la enfermedad. Esto sugiere que la anomalía responsable de la susceptibilidad tumoral puede residir dentro de la propia célula preleucémica; en otras palabras, es un defecto intrínseco a la célula preleucémica Pax5<sup>+/-</sup>.







## **DISCUSIÓN**



---

## DISCUSIÓN

### 1. El microbioma como pieza clave en el desarrollo de la LLA-B

El microbioma intestinal es un órgano cuyo estudio está actualmente en auge. Se ha postulado como un factor importante para el desarrollo de algunas enfermedades, como la enfermedad de Crohn<sup>204</sup>, Parkinson<sup>205,206</sup> e incluso cáncer<sup>207,208</sup>. De hecho, en otros estudios han tratado de buscar puntos diferenciales entre los microbiomas de pacientes de cánceres diferentes, distintos estados de una misma enfermedad, y entre tejidos malignos y sanos<sup>204</sup>. Sin embargo, a pesar de la importancia de la relación entre el microbioma y el cáncer, aún no se ha conseguido explicar si los cambios en composición del microbioma son una causa o una consecuencia del cáncer<sup>204</sup>.

Con nuestro estudio se ha añadido una evidencia más a esta relación entre microbioma y cáncer, demostrando que existe una conexión entre la predisposición genética a sufrir LLA-B y un microbioma alterado. Se ha demostrado que la predisposición por deficiencia de *Pax5* define un microbioma intestinal distinto al que podemos encontrar en ratones WT, incluso antes de que en estos ratones con predisposición genética se desarrolle la leucemia. Empleando algoritmos basados en inteligencia artificial, se ha verificado que el genotipo de los ratones podría predecirse con una gran precisión basándose sólo en la composición de su microbioma intestinal, diferenciándose entre microbioma de ratón WT y microbioma de ratón *Pax5*. Además, yendo un paso más allá, se ha observado que los ratones *Pax5*<sup>+/-</sup> que posteriormente desarrollan la enfermedad tienen también un microbioma diferente en ratones del mismo genotipo que permanecen sanos toda su vida.

Cuando se produce alguna alteración intestinal parece habitual observar un cambio importante en la presencia y cantidad de *Alistipes* en el intestino<sup>205</sup>. Este género de microorganismos se corresponde con bacterias comensales gram-

## DISCUSIÓN

---

negativas que habitualmente ocupan el intestino de animales y humanos sanos. No suelen ser patogénicas, sino que habitualmente se les adjudica un rol protector contra enfermedades, como cáncer, colitis, fibrosis hepática y enfermedad cardiovascular<sup>205</sup>. La secuenciación del metagenoma completo de muestras fecales de pacientes en diagnóstico de cáncer epitelial demostró que las *Alistipes* están asociadas con una correcta respuesta inmunitaria antitumoral, permitiendo una mejor respuesta a terapias de bloqueo de puntos de control inmunitarios<sup>207</sup>. Varios estudios avalan la relación de la presencia de un microbioma sano y una buena respuesta a la inmunoterapia<sup>83,207,209</sup>. Sin embargo, y de forma análoga a lo observado en nuestro estudio, no se puede adjudicar este papel protector a una única especie o pequeño grupo de especies, sino que más bien sería un estado de disbiosis el que se asocia con una gran variedad de enfermedades y malas perspectivas terapéuticas<sup>83</sup>.

Teniendo en cuenta la habitual falta de síntomas de la LLA hasta su diagnóstico en estados avanzados, saber que el microbioma alterado podría observarse meses antes de la aparición de la leucemia podría suponer un paso importante en la detección precoz de pacientes en alto riesgo de desarrollarla. En nuestro estudio se ha observado que, en general, en ratones que en un futuro desarrollan LLA-B, la abundancia y diversidad del microbioma es menor que en ratones del mismo genotipo que permanecen sanos. En general, la variedad de microorganismos es menor, y la ausencia de géneros completos en el microbioma de los ratones enfermos, incluso antes de la explosión de la enfermedad, puede utilizarse para predecir el genotipo del ratón y, en consecuencia, si desarrollarán o no la enfermedad. En concreto, se observa la ausencia de una gran parte de bacterias del orden *Clostridiales* y varias de la familia *Rikenellaceae*. Sin embargo, aún falta esclarecer cómo los microorganismos del microbioma afectan al clon preleucémico, en términos de colaborar en la adquisición de las mutaciones secundarias.

Con los experimentos de trasplante de MO y análisis del metaboloma se ha comprobado que la predisposición genética otorgada por la deficiencia de *Pax5* altera por sí sola el microbioma. Estos cambios no se limitan al intestino o el

tracto digestivo, sino que esto se traduce en un cambio global y sistémico. A partir de aquí, el siguiente paso sería estudiar si esta situación que se ha observado en ratones es reflejo de la situación humana de predisposición genética. Además, se ha demostrado que otra alteración genética de predisposición a LLA-B, la fusión *ETV6-RUNX1*, también es capaz de definir por sí sola un microbioma intestinal diferente al que observamos en ratones WT y ratones *Pax5<sup>+/-</sup>*. En niños, la predisposición genética debida a alteraciones en *PAX5* es poco común, por eso sería interesante investigar si otras alteraciones genéticas de predisposición, como por ejemplo la fusión *ETV6-RUNX1*, y el microbioma que define, tiene un papel similar en el desarrollo de la enfermedad.

Sin embargo, la traslación de estos resultados a la práctica en clínica infantil se complica por la necesidad de mantener un seguimiento estricto desde el momento del nacimiento. La recogida de muestras debería iniciarse en el momento del nacimiento, y mantenerse longitudinalmente con un número de pacientes suficiente para intentar demostrar una relación<sup>210–216</sup>. Aunque existen estudios en marcha, aún se está lejos de aplicar de una forma estandarizada.

Otro punto interesante que se ha demostrado es la necesidad del control del uso de antibióticos, pues estos fármacos son ampliamente utilizados, muchas veces sin el control que debería aplicarse. Se ha comprobado que un exceso en el uso de antibióticos podría alterar este microbioma intestinal de una forma crítica que propiciase la aparición de enfermedades. Sin embargo, aún falta comprobar si estos daños en el microbioma intestinal producidos por el uso de antibióticos podrían mantenerse a lo largo del tiempo y de esta manera agravar la situación<sup>217</sup>.

Se hace necesaria una mayor investigación para definir el mecanismo exacto a través del cual el microbioma, y más específicamente alteraciones en él, afecta a las células B precursoras y el desarrollo de LLA-B en un contexto de predisposición genética. Incluir el análisis del microbioma en portadores sanos de lesiones genéticas podría ser una herramienta de detección precoz para

pacientes en alto riesgo, pero para la que aún es necesario una mayor investigación para esclarecer los puntos aún en duda.

### 2. La LLA-B infantil como enfermedad prevenible

En la bibliografía hay una gran cantidad de trabajos publicados demostrando que la interacción entre genes y ambientes está ligada al desarrollo de LLA-B infantil<sup>78,79</sup>. Se han descrito algunas variantes y mutaciones de ciertos genes que se consideran patogénicas, por ejemplo, mutaciones y alteraciones estructurales en el gen *Pax5* y la traslocación *ETV6-RUNX1*<sup>78,79</sup>. Estos estudios revelan que la exposición a infecciones propicia el desarrollo de LLA-B como resultado de una sensibilidad aumentada a la transformación maligna de los precursores B que portan alteraciones genéticas específicas.

Basándose en el modelo de dos eventos para el desarrollo de la enfermedad, la exposición a infecciones sería el evento ambiental que aporta el estrés inmunológico que las células con predisposición genética necesitan para transformarse y malignizar. De esta manera, sin un segundo evento, las células susceptibles a malignización se mantendrían en un estado preleucémico. Siguiendo este razonamiento, impidiendo que este evento ambiental afecte a las células preleucémicas, o regulando esta respuesta para impedir el estrés inmunológico, se podría evitar la adquisición del segundo evento y así la aparición de la LLA-B<sup>5,10,62</sup>. Todos estos datos animan a diseñar nuevas estrategias para intervenir en el desarrollo de la LLA-B con el objetivo de lograr su prevención<sup>29,218</sup>.

Aunque la naturaleza exacta de la interacción entre genes y ambiente aún no está completamente definida<sup>29,219,220</sup>, la caracterización de las células B preleucémicas podría ayudar a identificar los puntos débiles que podrían abordarse como estrategias de prevención. Este sería el caso de las células B preleucémicas heterocigotas para *Pax5*: previamente se ha demostrado, en modelos animales, que esta heterocigosidad provoca la aparición de un compartimento aberrante de células B precursoras especialmente sensible a la

ausencia de IL7, que también lo son al ruxolitinib, inhibidor de las proteínas JAK<sup>78</sup>. En los estudios actuales, se ha demostrado por primera vez que, eliminando esta población susceptible de transformación gracias al tratamiento con ruxolitinib, se logra prevenir el desarrollo de la LLA-B *in vivo*.

Se ha demostrado que la incidencia de la LLA-B en ratones *Pax5*<sup>+/-</sup> se reduce tras la administración transitoria y temprana de ruxolitinib. La aparición de un caso de leucemia en el grupo de ratones susceptibles tratados con ruxolitinib, con mutaciones secundarias muy similares a las que observamos en ratones del mismo genotipo sin tratar, indica que es necesario que el tratamiento consiga eliminar un alto número de células susceptibles a transformación maligna. De no ser así, alguna de estas células podría adquirir en un futuro estas mutaciones secundarias y provocar la aparición de la LLA-B. Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que, en general, todos los niños con predisposición genética a sufrir LLA-B podrían beneficiarse como estrategia preventiva de la inhibición de vías frecuentemente mutadas como alteración secundaria, como es el caso de la vía JAK/STAT en los casos de alteraciones en *Pax5*. Tras el tratamiento con ruxolitinib también se observa una reducción del compartimento B inmaduro en ratones WT. El hecho de que en ratones de otros genotipos también se observe esta reducción del compartimento B inmaduro haría interesante comprobar si esta aproximación también sería posible en otros modelos de susceptibilidad genética, como por ejemplo, la presencia de la traslocación t(12;21).

La traslación a la clínica requiere de estudios que determinen cuál sería la ventana de tiempo en la que los niños deberían ser tratados para lograr esta prevención<sup>218</sup>. Una opción podría ser la monitorización de la sangre de los niños con predisposición a sufrir la enfermedad en busca de la aparición del clon leucémico con mutaciones secundarias que serán las que afecten las proteínas JAKs, y cuando sean detectadas se iniciaría el tratamiento. Sin embargo, aún así existiría el riesgo de que este momento podría ser ya demasiado tarde para impedir el desarrollo de la enfermedad.

## DISCUSIÓN

---

Además, se demuestra también que el tratamiento con ruxolitinib no es una cura para la leucemia, porque este inhibidor no se dirige a la proteína codificada por el gen *JAK3*, el más frecuentemente mutado en las leucemias murinas *Pax5<sup>+/-</sup>*. De hecho, el tratamiento con ruxolitinib no es capaz de eliminar las células ya leucémicas en ratones que tienen una leucemia *Pax5<sup>+/-</sup>* con una mutación secundaria activadora de *JAK3*. Como propuesta para el uso de este inhibidor, y tras quedar demostrada la ausencia de efectos secundarios graves tras su aplicación, el tratamiento podría ser administrado a todos los niños genéticamente predispuestos a la enfermedad de forma intermitente durante su infancia, con el objetivo de erradicar el compartimento susceptible de transformación maligna.

En cualquier caso, esta aproximación preventiva podría también aplicarse a otros casos donde el estudio de los segundos eventos nos permita la identificación de una vulnerabilidad que podría ser atacada para impedir la explosión de la enfermedad. En general, estos hallazgos apoyan que haya una mayor investigación de aproximaciones específicas de vías que tengan como diana las células B preleucémicas y que podrían permitir la prevención del desarrollo de la leucemia en un futuro<sup>15,78,79</sup>.

Desafortunadamente, pese a los buenos resultados obtenidos con el uso de ruxolitinib, no son tan prometedores los que se observaron tras la administración de poly(I:C). La deficiencia de *Pax5* supone un defecto inmunológico causado por la disminución de células B<sup>125,126</sup>. La idea de estimular el sistema inmunitario para reforzar una respuesta inmunológica correcta mediante la administración del compuesto poly(I:C) podía parecer una buena opción. Sin embargo, los resultados actuales sugieren que, pese a la activación de la respuesta inflamatoria y antiviral que el poly(I:C) produce, esto no sería suficiente para evitar que la exposición a infecciones induzca la aparición de la LLA-B.

Así, se pone de manifiesto la necesidad de estudios que descifren el mecanismo molecular por el que una respuesta inmunitaria insuficiente o

desregulada conduce a la aparición de la leucémica tras la exposición a factores ambientales que causen un estrés inmunológico. Sin conocer estos mecanismos y vías moleculares, se hace complicado establecer una vía de ataque al clon preleucémico para impedir su transformación maligna.

En general, estos resultados demuestran que, efectivamente, la prevención de la leucemia es posible. La investigación para descifrar otras vías frecuentemente alteradas como eventos secundarios, otros puntos débiles de las células preleucémicas y, por supuesto, la traslación a la clínica, son ahora el siguiente paso para conseguir extender este concepto de prevención a otros casos de leucemias.







## **CONCLUSIONES**



## CONCLUSIONES

- 1- El tratamiento con antibióticos de ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* a edades tempranas no tiene un efecto protector contra la LLA-B. Por el contrario, la alteración del microbioma intestinal inducida por el uso de antibióticos dispara la incidencia de la LLA-B, incluso en ausencia de un ambiente infeccioso.
- 2- La inhibición transitoria y en edades tempranas de la vía JAK/STAT en ratones preleucémicos *Pax5<sup>+/-</sup>* previene el desarrollo de la LLA-B. Este efecto es debido a la eliminación específica del compartimento susceptible de transformación maligna en los ratones con esta predisposición genética.
- 3- La estimulación del sistema inmunitario innato, mediante el tratamiento con poly(I:C), no consiguió prevenir el desarrollo de LLA-B en ratones con predisposición genética *Pax5<sup>+/-</sup>*. Sin embargo, la respuesta individual a la estimulación del sistema inmunitario innato permitió identificar a los ratones que posteriormente desarrollaron LLA-B.







## **MATERIAL Y MÉTODOS**



## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. Modelos animales utilizados

En este estudio se utilizaron cuatro modelos de ratón: el modelo *Pax5*<sup>+/-</sup>, para representar la situación humana de la pérdida de un alelo de *PAX5* (el modelo de ratón mimetiza la mutación inactivante que ocurre en los casos humanos con predisposición a la LLA-B por alteración de *Pax5*); el modelo *Sca1-ETV6-RUNX1* que expresa la fusión génica *ETV6-RUNX1* humana bajo el control del promotor *Sca1* activo en células madre hematopoyéticas; el modelo de ratón *Pax5*<sup>+/-</sup> *nu/nu*, con fondo genético *Pax5*<sup>+/-</sup> y deficiente en células T, y el modelo de ratón que expresa la mutación *Jak3*<sup>V670A</sup> en células B *Pax5*<sup>+/-</sup>. Todos los ratones utilizados en este trabajo tienen un fondo genético mixto CBAxC57BL/6J.

Todos los experimentos con animales han sido realizados siguiendo las directrices nacionales e internacionales pertinentes, y han sido aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca (USAL) y por el Subcomité de Bioética del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Para la realización de este proyecto obtuve la capacitación para experimentación en ciencias del animal de laboratorio, categorías a, b, c y d, por parte de la Consejería de Agricultura y Ganadería de la Junta de Castilla y León.

Los animales fueron generados en un animalario libre de patógenos (animalario SFP; del inglés *specific pathogen free*) (Animalario OMG del Centro de Investigación del Cáncer) y mantenidos en el mismo hasta que cumplieron un mes de edad. En ese momento, se trasladaron a un animalario convencional (animalario CF; del inglés *conventional facility*) para su exposición a agentes infecciosos naturales como se ha descrito previamente<sup>78</sup>. Las condiciones del animalario incluían una temperatura de 21°C ± 2°C, humedad del 55% ± 10% y un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. El acceso a la comida y la bebida fue *ad libitum*.

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

Los animales se revisaron y vigilaron diariamente, monitorizando su estado de salud. Para el seguimiento y estudio de las poblaciones hematopoyéticas se llevaron a cabo estudios periódicos por citometría de flujo de sangre periférica. Cuando se detectaron signos de leucemia, bien clínicamente en la monitorización diaria (letargia, disminución de la ingesta, pérdida de peso o inflamación de los nódulos linfáticos) o bien por la aparición de células leucémicas en los análisis rutinarios de sangre, el animal fue sacrificado y se realizaron los procedimientos estándar de necropsia. Los órganos principales fueron examinados en el microscopio y muestras representativas de los tejidos se cortaron y fijaron. Los análisis de supervivencia fueron realizados con el test estadístico log-rank (Mantel-Cox) utilizando el programa GraphPad Prism v.5.01.

El tamaño de las cohortes fue determinado en base a la literatura que describe la incidencia de leucemia por exposición a infección<sup>78</sup> y justificada mediante el cálculo de una estimación con una fiabilidad del 90% para poder detectar cambios en la incidencia de la leucemia.

En todos los experimentos se han utilizando ratones de ambos sexos, excepto para los análisis de microbioma, en los que solo se usaron animales hembra para evitar el sesgo por razón de sexo.

A continuación, se describen los modelos utilizados:

a- Modelo de ratón *Pax5*<sup>+/-</sup>.

El modelo de ratón *Pax5*<sup>+/-</sup> fue cedido por el laboratorio de M. Busslinger y su generación<sup>126</sup> y caracterización<sup>78</sup> han sido previamente descritas. Este modelo de ratón *knockout* (KO) para el gen *Pax5* permite estudiar el papel de la infección como disparador de la leucemia, ya que estos animales sólo desarrollan la enfermedad cuando sufren un estrés inmunológico como la exposición natural a infección<sup>78</sup>.

b- Modelo de ratón Sca1-ETV6-RUNX1.

La generación del modelo de ratón Sca1-ETV6-RUNX1 ya ha sido previamente descrita<sup>221</sup>. En estos ratones, la fusión génica humana ETV6-RUNX1 se encuentra expresada bajo el control del promotor Sca1, específico de células madre hematopoyéticas, de manera que la expresión de este gen de fusión se encuentra restringida a ese compartimento. De manera similar al modelo Pax5<sup>+/-</sup>, estos ratones sólo desarrollan leucemia en un ambiente de exposición a patógenos comunes<sup>79</sup>.

c- Modelo de ratón Pax5<sup>+/-</sup> nu/nu.

Los ratones nu/nu (rl:NUFoxn1<sup>nu</sup>) fueron comprados a Charles River. Los ratones Pax5<sup>+/-</sup> se cruzaron con ratones inmunodeficientes sin timo. Del cruce se obtuvieron ratones Pax5<sup>+/-</sup> nu/nu y Pax5<sup>+/-</sup> nu/+.

d- Modelo de ratón Rosa26-mJak3<sup>V670A</sup>.

El ADN complementario (ADNc) que contenía la mutación mJak3<sup>V670A</sup> se introdujo en el sitio de restricción XbaI del locus de expresión ubicua Rosa26. Aguas arriba del ADNc, el vector incluye un cassette de resistencia a neomicina y un codón STOP, ambos flanqueados por sitios loxP. Se incluyó también el ADNc de la proteína GFP (de las siglas en inglés *green fluorescence protein*) precedido de un sitio IRES (de las siglas en inglés *internal ribosomal entry site*) para usar como reportero de la expresión del transgén. El vector completo se linearizó con la enzima AsiSI y se introdujo en células madre embrionarias (ES, del inglés *embryonic stem cells*) mediante electroporación. Las células que habían incorporado la construcción Rosa26-mJak3<sup>V670A</sup> fueron seleccionadas gracias a la resistencia a la neomicina. Con estas células y a partir de la inyección de células ES en blastocistos, se generó la línea de ratón Rosa26-mJak3<sup>V670A</sup>, que no expresaban ni la mutación de Jak3 ni la proteína GFP por la presencia del codón de STOP (**Figura 60**).

Para activar la expresión de la mutación Jak3, estos ratones fueron cruzados con ratones Mb1-Cre que habían sido cruzados antes con ratones

## MATERIAL Y MÉTODOS

*Pax5*<sup>+/-</sup>. De este cruce se obtuvieron ratones *Rosa26-mJak3*<sup>V670A</sup>; *Mb1-Cre*; *Pax5*<sup>+/-</sup> donde la recombinasa Cre se expresa en el estadio de célula proB, de manera que el codón STOP del constructo genético es escindido y se inicia la expresión de *mJak3*<sup>V670A</sup> y de la GFP en todo el linaje B. Así, se obtuvieron ratones con un fondo genético *Pax5*<sup>+/-</sup> y la expresión de *Jak3*<sup>V670A</sup> restringida únicamente al compartimento B. Como control, se emplearon ratones *Rosa26-mJak3*<sup>V670A</sup>; *Pax5*<sup>+/-</sup> que no tienen activada la expresión de *mJak3*<sup>V670A</sup>, y ratones *Rosa26-mJak3*<sup>V670A</sup>; *Mb1-Cre*; *Pax5*<sup>+/+</sup> para demostrar el papel de la heterocigosidad de *Pax5* en el desarrollo de la leucemia.

## 2. Genotipado de ratones

El genotipado de los ratones se realizó mediante PCR (de las siglas en inglés *polymerase chain reaction*) del ADN total extraído a partir de una biopsia del extremo de la cola de los animales (la extracción de ADN se explica más adelante en esta sección).

### 1- Genotipado de los ratones *Pax5*<sup>+/-</sup>.

Se realizaron dos PCRs en paralelo: una para el alelo WT y otra para el alelo nulo. Se preparó una mezcla de reacción que contenía 2,5µl del oligonucleótido Pax5-1 10µM, 2,5 µl del oligonucleótido Pax5-2 10µM o 2,5µl del oligonucleótido Pax5-3 10µM (**Tabla 3**), 2,5µl del tampón comercial (Ref. 2900162, 5PRIME), 2,5µl de dNTPs 2mM, 2,5µl de MgCl<sub>2</sub> 25mM (Ref. 2900154 5PRIME), 0,5µl de la enzima Taq ADN polimerasa (Ref. 2900163, 5PRIME), 10µl de agua millipore (MPW, del inglés *millipore water*) y 2µl de ADN.

**Tabla 3** - Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para el genotipado de los ratones *Pax5*<sup>+/-</sup>.

Nombre	Secuencia
<b>Pax5-1</b>	5'-ACAGTCCCCTTACCCCTTCCCCCAAATGAA-3'
<b>Pax5-2</b>	5'-GTCCCTCCTAACAAAGTCTCCCTATTCCAC-3'
<b>Pax5-3</b>	5'-GAGCGAGTAACAACCCGTCCGATTCTCC-3'

La mezcla de reacción se amplificó usando un termociclador de gradiente (Mastercycler, Eppendorf) con las siguientes condiciones: 94°C 4 min; (94°C 1

min; 64°C 1 min; 72°C 2 min) x 40 ciclos; 72°C 7 min. El producto de la amplificación del alelo WT tenía un tamaño de 693 pares de bases (pb) y el del alelo nulo de 783 pb. Los tamaños se discriminaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2%.

2- Genotipado de los ratones *Sca1-ETV6-RUNX1*.

Se preparó una mezcla de reacción que contenía 2,5µl del oligonucleótido ETV6-RUNX1-F 10µM, 2,5µl del oligonucleótido ETV6-RUNX1-B 10µM (**Tabla 4**), 2,5µl del tampón comercial (Ref. 2900162, 5PRIME), 2,5µl de dNTPs 2mM, 2,5µl de MgCl<sub>2</sub> 25mM (Ref. 2900154 5PRIME), 0,2µl de la enzima Taq ADN polimerasa (Ref. 2900163, 5PRIME), 11,3µl de MPW y 1µl de ADN.

**Tabla 4** - Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para el genotipado de los ratones *Sca1-ETV6-RUNX1*.

Nombre	Secuencia
<b>ETV6-RUNX1-F</b>	5'-GCCCCATGGAGAATAATCACTG-3'
<b>ETV6-RUNX1-B</b>	5'-GCGTCTCTAGAAGGATTCATTC-3'

La mezcla de reacción se amplificó usando un termociclador de gradiente con las siguientes condiciones: 94°C 10 min; (94°C 1 min; 54°C 1 min; 72°C 1 min) x 40 ciclos; 72°C 10 min. El producto de la amplificación tenía un tamaño de 372 pb.

3- Genotipado de los ratones *nu/nu*.

Estos ratones no necesitan ser genotipados ya que son ratones carentes de pelo, característica por la que se identifican.

4- Genotipado de los ratones *Rosa26-mJak3<sup>V670A</sup>*.

Se preparó una mezcla de reacción que contenía 2,5µl del oligonucleótido GFP-FP2 10µM, 2,5µl del oligonucleótido GFP-RP1 10µM (**Tabla 5**), 2,5µl del tampón comercial (Ref. 2900162, 5PRIME), 2,5µl de dNTPs 2mM, 2,5µl de MgCl<sub>2</sub> 25mM (Ref. 2900154 5PRIME), 0,2µl de la enzima Taq ADN polimerasa (Ref. 2900163, 5PRIME), 11,3µl de MPW y 1µl de ADN.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Tabla 5-** Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para el genotipado de la inserción del vector Rosa26-*mJak3<sup>V670A</sup>*.

Nombre	Secuencia
<b>GFP-FP2</b>	5'-AGCACGACTTCTTCAAGTCC-3'
<b>GFP-RP1</b>	5'-TCCATGCCGAGAGTGATCC-3'

La mezcla de reacción se amplificó usando un termociclador de gradiente con las siguientes condiciones: 94°C 4 min; (94°C 30 seg; 8C 30 seg; 72°C 1 min) x 35 ciclos; 72°C 10 min. El producto de la amplificación tenía un tamaño de 450 pb.

### 5- Genotipado de los ratones *Mb1-Cre*.

Se realizaron dos PCR en paralelo. Se preparó una mezcla de reacción que contenía 2,5µl del oligo correspondiente F 10µM, 2,5µl del oligonucleótido correspondiente B 10µM (**Tabla 6**), 2,5µl del tampón comercial (Ref. 2900162, 5PRIME), 2,5µl de dNTPs 2mM, 2,5µl de MgCl<sub>2</sub> 25mM (Ref. 2900154 5PRIME), 0,2µl de la enzima Taq ADN polimerasa (Ref. 2900163, 5PRIME), 11,3µl de MPW, 1µl de ADN, y aceite mineral.

**Tabla 6-** Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para el genotipado de los ratones *Mb1-Cre*.

Nombre	Secuencia
<b>Mb1 (WT)-F</b>	5'-CTGCGGGTAGAAGGGGGTTC-3'
<b>Mb1 (WT)-B</b>	5'-CCTTGCGAGGTCAGGGAGCC-3'
<b>hCRE-F</b>	5'-CCCTGTGGATGCCACCTC-3'
<b>hCRE-B</b>	5'-GTCCTGGCATCTGTTCAGAG-3'

La mezcla de reacción se amplificó usando un termociclador de gradiente con las siguientes condiciones: 94°C 4 min; (94°C 1 min; 64°C 1 min; 72°C 2 min) x 40 ciclos; 72°C 2 min. El producto de la amplificación del alelo WT tenía un tamaño de 420 pb y el alelo hCre tenía un tamaño de 430 pb. Los tamaños de los productos de PCR se discriminaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%.

### 3. Estudios histológicos

Los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical y las muestras obtenidas fueron fijadas en formaldehído al 4% e incluidas en parafina. Los estudios patológicos fueron realizados sobre secciones teñidas con hematoxilina-eosina en colaboración con el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Salamanca, bajo la supervisión del experto en patología Óscar Blanco.

### 4. Tratamiento con antibióticos

Los fármacos incluidos en la **Tabla 7** se diluyeron en el agua de beber de los animales. Durante la duración del tratamiento (8 semanas) el agua con los antibióticos se reponía semanalmente y se comprobaba de forma regular si los ratones lo toleraban adecuadamente.

*Tabla 7 - Relación de antibióticos utilizados para el tratamiento, concentraciones utilizadas y casa comercial de cada uno de ellos.*

<b>Antibiótico</b>	<b>Concentración usada</b>	<b>Casa comercial</b>
<b>Ampicilina</b>	1g/L	Ratiopharm
<b>Vancomicina</b>	500mg/L	Cell Pharm
<b>Ciprofloxacina</b>	200mg/L	Bayer Vital
<b>Imipenem</b>	250mg/L	MSD
<b>Metronidazole</b>	1g/L	Fresenius

### 5. Formulación del pienso con ruxolitinib.

La formulación de ruxolitinib incluido en el pienso de los animales fue provista por la farmacéutica Novartis y elaborado en Profimi Kliba SA/Kliba Nafag (Suiza). El polvo para la preparación del pienso de los roedores fue mezclado con agua y monofosfato de ruxolitinib (formulado en suspensión en metilcelulosa 0,5%). Posteriormente, la mezcla se introdujo en moldes cilíndricos y se cortó a la medida óptima para administrar a los animales. Finalmente, se dejaron secar los pellets durante 48 horas bajo un flujo alto de aire y a temperatura ambiente.

El pienso se almacenó en bolsas de plástico cerradas y protegidas de olores y humedad. Se mantuvo para la óptima conservación del fármaco a 4 grados hasta ser usado y provisto a los animales *ad libitum*.

### 6. Estudio farmacocinético de ruxolitinib en sangre

Los animales fueron alimentados con pienso que contenía ruxolitinib en dos dosis distintas: 0,375 g/kg de comida (n=5) y 0,75 g/kg de comida (n=5) durante 14 días. Durante estos días se recogieron muestras sanguíneas tres veces a la semana dos veces al día: dos horas después del inicio de la fase activa (correspondiendo con la máxima concentración del fármaco en la sangre de los animales) y dos horas antes del fin de la fase inactiva (correspondiendo con la mínima concentración). De las muestras sanguíneas se separó el suero para analizar la concentración del fármaco. Para obtener el suero a partir de la sangre periférica se dejó que la muestra coagulase a temperatura ambiente (15-20 minutos), posteriormente se centrifugaron a 1.000-2.000 g durante 10 minutos. Se almacenaron las muestras a -70°C.

Los niveles de ruxolitinib en la sangre se determinaron por cromatografía líquida seguida de espectrometría de masas en tándem (LC/MS-MS, de las siglas en inglés *liquid chromatography-tandem mass spectrometry*).

La cantidad de comida consumida cada día por los ratones fue calculada pesando la comida que se colocaba en la jaula cada día y pesando lo restante al día siguiente. Se estimó el consumo por animal teniendo en cuenta que en cada jaula había cinco ratones y suponiendo que cada uno ingería de media la misma cantidad de comida.

### 7. Tratamiento con poly(I:C)

Se administraron a los animales dos dosis del tratamiento a través de la vena de la cola. Cada dosis contenía una concentración de 200 µg/l del polirribonucleótido de doble cadena poly(I)·poly(C) (poly(I:C) (27-4732-01, GE

Healthcare, Life Sciences, Fisher) disuelto en PBS. Las dosis se separaron 1 mes.

### 8. Trasplante de médula ósea

Las hembras receptoras de entre 8 y 12 semanas de edad y de fondo genético mixto C57BL/6J fueron irradiadas con dos dosis de 6 Gy, dosis suficiente para eliminar la hematopoyesis endógena por completo. Dos horas después se inyectaron entre 2 y 4 millones de células de la médula ósea de ratones donantes *Pax5<sup>+/-</sup>* o WT a través de la vena de la cola para la reconstitución hematopoyética. Todos los receptores se mantuvieron en un microasillador con comida y agua estériles.

### 9. Estudio del metaboloma

El estudio del metaboloma de los sueros de los ratones se realizó en colaboración con el laboratorio de Genómica y Transcriptómica del *Biological and Medical Research Center, Heinrich Heine University Düsseldorf, Düsseldorf, Alemania*. Brevemente, se recogieron muestras de suero de ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* preleucémico, ratones *Pax5<sup>+/-</sup>* leucémicos y ratones WT sanos (10 ratones de cada grupo), a partir de la sangre periférica. Para la extracción de metabolitos se siguió el protocolo de Barupal et al<sup>222</sup>. La solución de extracción (acetronila(ACN), isopropanol (IPA) y agua en proporciones 3:3:2) y se enfrió a -20°C. 1 mL de la solución de extracción se mezcló con 30  $\mu$ L de solución interna estándar 25  $\mu$ M (ISTD) (ribitol y N,N-dimetilpenilalanina) por muestra. Las muestras de suero que descongelaron en hielo y 20  $\mu$ L de cada muestra se añadió a la mezcla de solución de extracción e ISTD. Se agitaron en vórtex las muestras por 10 segundos, se agitaron 5 minutos y se centrifugaron 20 minutos a 14.000 rcf a 4°C. Después, 450  $\mu$ L del sobrenadante se transfirieron a tubos nuevos y se añadieron 50  $\mu$ L de una solución de ACN frío y agua (50:50) para retirar el exceso de proteína. Tras una centrifugación final de 2 minutos a 14.000 rcf se recogió el sobrenadante y se depositó en un tubo previamente enfriado y secado por centrifugación al vacío.

Las muestras secadas se reconstituyeron en 100 $\mu$ L de solución de extracción, se transfirieron a un vial de cristal y se secaron de nuevo por centrifugación de vacío. Cada muestra se derivó con cloruro de metoxiamina y N-metil-N(trimetilsilil)trifluoroacetamida como fue descrito por Gu et al<sup>223</sup>. Después de una incubación de dos horas a temperatura ambiente se inyectó 1 mL de la muestra en un cromatógrafo de gas acoplado (GC, *gas chromatograph*) a un espectrofotómetro de masas (*mass spectrometer*) (GC 7890A y MSD 5977B, Agilent Technologies) y se llevó a cabo la cromatografía como se describe en Shim<sup>224</sup>.

Los metabolitos se identificaron por dos métodos. Se utilizó una muestra control de calidad que contenía una mezcla de compuestos diana que fue usada como referencia para identificar compuestos en cada muestra en base a su similitud por espectro de masa y tiempo de retención. El software AMDIS (<http://chemdata.nist.gov/mass-spc/amdis/>, v.2.72, 2014) se utilizó para la deconvolución del espectro de masas de los picos diana antes de comparar el espectro con la librería de espectros de masa NIST14 (<https://www.nist.gov/srd/nist-standard-reference-database-1a-v14>). Las coincidencias con más del 80% de similitud en el espectro de masas se confirmaron. Los picos se integraron usando el software *MassHunter Quantitative* (v b08.00, Agilent Technologies). Para la cuantificación relativa del área de los picos de metabolitos se normalizaron al área del pico del ribitol estándar interno.

## 10. Cuantificación de los niveles de citoquinas en el suero

Los estudios de cuantificación de citoquinas se hicieron en colaboración con el laboratorio 11 del Centro de Investigación del Cáncer. Los niveles de citoquinas en el suero de los ratones se analizaron usando el sistema de inmunoensayo *Cytometric Bead Array* (BD Biosciences) que analiza simultáneamente las citoquinas IL2, IL4, IL6, IL10, IL17A, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  (*Mouse Th1 Th2 Th17 Cytokine Kit #560485*; BDB), el ensayo IL1 $\beta$  (*Mouse IL1 $\beta$  Enhanced Sensitivity Flex Set #562278*; BDB) y el ensayo *CBA Inflammation Kit*

que analiza simultáneamente IL6, IL10, MCP1, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL12p70 (#552364; BDB). 50  $\mu$ l de suero, preparado según se describe en el apartado 6, se incubaron 2 horas a temperatura ambiente con 50  $\mu$ l de *beads* cubiertas con anticuerpos anti-citoquinas (*mAb-coated beads*) y 50  $\mu$ l del detector de anticuerpos anti-citoquinas conjugado con PE (*phycoerythrin*). Después de esta incubación, las muestras se lavaron una vez (5 min 200g) para quitar el exceso de anticuerpos de detección. Inmediatamente después, la adquisición de datos se llevó a cabo en un FACSCanto II (BD Biosciences) usando el software FACSDvia (BD Biosciences). Durante la adquisición se almacenó la información de al menos 3000 eventos positivos para cada *bead* analizada (en total el número de *beads* fue superior a 9.000). El análisis se realizó utilizando el programa FCAP Array Software v3.0 (BDB).

### 11. Extracción de ADN

Los tejidos fueron disgregados con un tampón de lisis con proteinasa K (0,25M de sacarosa, 50mM Tris pH 7,4, 25mM KCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1% SDS, 20mM EDTA pH 8 y 1 $\mu$ g de proteinasa K 40 $\mu$ g/mL (Roche)) en volumen variable según la celularidad de cada tejido (entre 500 $\mu$ l y 5ml), durante 16 horas a 55°C. Tras la incubación, se procedió a la extracción del ADN mediante el método fenol-cloroformo. Se agregó 1 volumen de solución de fenol (Gibco BRL) a las muestras, se homogeneizó y se centrifugó 5 minutos a 14000 rpm, transfiriendo la fase superior a un tubo con 1 volumen de cloroformo (Merck). De nuevo, la solución se homogeneizó y centrifugó 5 minutos a 14000 rpm, transfiriendo la fase superior a un nuevo tubo con 2 volúmenes de etanol absoluto. Seguidamente, la solución se mezcló y se centrifugó en las mismas condiciones. El precipitado formado por el ADN se lavó con 1 volumen de etanol al 70% v/v, se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en agua bidestilada. La concentración de ADN se cuantificó mediante la medida de la absorbancia a 260nm con el espectrofotómetro Nanodrop-1000 (THERMO Scientific). Las muestras extraídas se conservaron a -20°C.

### 12. Extracción de ARN

Los tejidos se disgregaron haciéndolos pasar por filtros de 70 $\mu$ m de nylon (BD FALCON). Después, se procedió a la extracción de ARN mediante el kit TRIzol (Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los restos del fenol procedentes del uso del reactivo TRIzol se eliminaron para evitar interferencias en técnicas aplicadas posteriormente con el kit comercial “RNeasy Mini Kit” (Ref. 74104, Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La calidad e integridad del ARN se estimó en función de la relación resultante del cociente entre la longitud de onda de absorción del ARN (260nm) y de las proteínas (280nm), utilizando el espectrofotómetro Nanodrop-1000 y el Bioanalizador Agilent 2100. Las muestras extraídas se conservaron a -70°C.

### 13. Extracción del ADN de heces de ratones

Las muestras fecales fueron recogidas individualmente de cada ratón en los diferentes momentos a lo largo de la vida de los ratones objetos de estudio. El ADN fecal se aisló utilizando el kit QIAmp ADN Stool Mini Kit (Qiagen) siguiendo el protocolo de detección de patógenos en heces. El ADN se extrajo siguiendo las instrucciones del fabricante con dos modificaciones: el paso de calentamiento con el tampón ASL se realizó a 95°C y la elución se realizó en 100  $\mu$ l de tampón AE.

### 14. Secuenciación y análisis del ARN ribosómico 16S

Para la secuenciación de la región variable V4 del ARNr 16S se siguieron los protocolos del *Earth Microbiome Project* <sup>225,226</sup>. La amplificación específica por PCR de la región V4 del ARNr 16S se realizó utilizando *barcoded primers* (oligonucleótidos con un código identificativo)<sup>227</sup>. La secuenciación del extremo emparejado V4<sup>227</sup> se llevó a cabo mediante Illumina MiSeq (La Jolla, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Además de la secuenciación específica de la región V4 se llevó a cabo la secuenciación del amplicón completo 16S en las mismas muestras. Para ello, se

realizó una ronda de PCR con oligonucleótidos específicos de los 16S concatenados con los mismos códigos identificativos de cada muestra que se habían utilizado para la secuenciación del V4 (Pacific Biosciences). 2,5 ng de ADN fecal fueron utilizados para la PCR aplicando el KAPA HiFi HotStart ReadyMix PCR Kit (KAPA Biosystems, 3  $\mu$ M cada primer, programa de ciclado: 95°C 3 minutos seguido de 23 ciclos de amplificación (95°C 20 seg, 57°C 30 seg y 72°C 30 seg) seguido de una extensión final 72°C 1 min). Los productos de la PCR fueron purificados con las *beads* 0,6X AMPure (Pacific Biosciences) en un SciClone G3 (Perkin Elmen) y se eluyeron en 38  $\mu$ l 1X Tris-HCl (pH 8,5). Los productos de PCR se diluyeron 1:10 y se usaron para el control de calidad post-amplificación en un Fragment Analyzer (Advanced Analytical) usando el HS NSG Fragment kit (Agilent). Los productos de PCR se agruparon equimolarmente en grupos de 10 muestras con aproximadamente 100 ng por muestra. Cada grupo incluía controles positivos (imitación de la comunidad ATCC MSA-1003) y negativos (sin ADN). Los grupos de ADN se concentraron con las *beads* 1X AMPure hasta 48  $\mu$ l y la concentración de ADN (dilución 1:10) se midió usando el kit *Qubit dsDNA HS* (Thermo Fisher). La preparación de la librería se llevó a cabo utilizando el ExpressTemplate Prep Kit 2.0 (Pacific Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los oligonucleótidos para la secuenciación de la región V4 (Pacific Biosciences) se anillaron a 20 ng de cada librería a un ratio molar de 20:1 (oligonucleótidos: plantilla de la librería) durante 1 hora a 20°C y la polimerasa 3.0 se añadió a las librerías a un ratio molar 30:1 (polimerasa : plantilla de la librería) a 30°C durante 1 hora. Los conjuntos plantilla-polimerasa se purificaron con las *beads* 1X AMPure PB y la concentración de ADN se midió con el kit *Qubit dsDNA HS* (Thermo Fisher). La secuenciación se realizó en un PacBio Sequel System con el químico de secuenciación 3.0. Cada grupo (7pM) se cargó en un SMRT celular y se secuenció con una pre-extensión de 60 minutos y un tiempo de recogida de 600 minutos. Las lecturas consenso circulares fueron generadas y el de-multiplexado se llevó a cabo con el SMRT Link 7.0.

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

Para el procesamiento de los datos de secuenciación y el control de calidad de las secuencias V4 en bruto se de-multiplexaron usando el software Illumina's bcl2fastq 2.19.0.316. Los *oligonucleótidos* se recortaron vía cutadapt1.18<sup>228</sup>, fueron cargados a Qiita<sup>229</sup> y pasaron el control de calidad usando los valores por defecto. Las lecturas *forward* se recortaron a los 150 nucleótidos. La primera tabla de secuencias se generó utilizando Deblur 1.1.0<sup>230</sup> y puede encontrarse en Qiita (qiita.ucsd.edu) con los números de estudios 11758, 11953, 12981 y 13189 con artefactos 67817, 75878, 86044 y 90669 respectivamente. Las secuencias también se encuentran en el *European Genome-Phenome Archive* (EGA) con los números de acceso EBI: ERP117561 (para las cohortes de ratones en co-habitat y ratones no tratados con antibióticos) y ERP117668 (la cohorte de ratones tratados con antibióticos), y ERP122653 (para los animales con trasplante de médula ósea), y ERP122650 (para los ratones con la fusión *ETV6-RUNX1*). La adjudicación de taxones se realizó utilizando el Qime2's<sup>231</sup>, con el complemento "clasificador por rasgos" (*feature-classifier*) versión 2019.1 contra la región de secuencias *GreenGenes 13.8 99% OTUs from 515F/806R*. Los rasgos bacterianos asociados a un taxón que contenían la etiqueta *c\_Chroloplast* o *f\_mitochondria* se consideraron que eran originarios del hospedador o de origen vegetal y se eliminaron de la tabla antes de la rarefacción. El análisis de abundancia diferencial se llevó a cabo con el FDR discreto<sup>191</sup>, como se implementó en *calour*<sup>232</sup>. Los datos de PacBio se transformaron a una tabla de secuencias vía DAD2<sup>233</sup> como está descrito<sup>234</sup>. El procesamiento de los datos se realizó de forma análoga al de las secuencias V4 con las siguientes excepciones: la asignación de un grupo taxonómico se realizó contra las secuencias completas de *Greengenes 13\_8 99% OTUs*, la profundidad de la rarefacción fue de 12.000, la filogenia se creó alineando las secuencias con Mafft 7.310<sup>235</sup> y la construcción de árbol *de-novo* con Fasttree 2.1.10<sup>236</sup>.

En cuanto al análisis estadístico, para computar las distancias filogenéticas de diversidad, los fragmentos V4 de secuencia única se insertaron en el árbol de referencia filogenética de *GreenGenes 13.8 99%*<sup>237</sup>. El árbol resultante se usó para computar las distancias beta de UniFrac<sup>238</sup> cuantitativas y cualitativas y la

diversidad alfa de *Fatih's PD*. Las curvas de rarefacción para todas las muestras se computaron vía *Faith's PD* y se escogió una rarefacción óptima de una profundidad de 35.000 lecturas por muestra, resultando en 657 muestras con un número de lecturas apropiado. Los rasgos bacterianos con menos de 10 lecturas entre las 657 muestras se omitieron, resultando en 3983 rasgos bacterianos para los análisis posteriores. Las diferencias en la composición de comunidades para los grupos de muestras, por ejemplo la beta diversidad, se calcularon por Permanova<sup>239</sup> por pares con 999 permutaciones como se implementó en el scikit-bio 0.5.5. Scikit-learn 0.20.1<sup>240</sup> se utilizó para los análisis de Random Forest. La comparación de la alfa diversidad y los cambios en la beta diversidad se analizaron utilizando los test Mann-Whitney como se implementó en scipy 1.1.0<sup>241</sup>. Los cuadernos *Jupyter* para el análisis de datos están disponibles como material suplementario. Los datos de análisis bioinformático del estudio del microbioma pueden encontrarse en [https://github.com/jlab/microbiome\\_pax5/archive/1.0.0.zip](https://github.com/jlab/microbiome_pax5/archive/1.0.0.zip).

### 15. Análisis celular mediante citometría de flujo

Se obtuvieron células nucleadas de sangre periférica, timo, bazo, nódulos linfáticos y médula ósea total (mediante arrastre con PBS de los huesos largos). Los eritrocitos fueron eliminados de las muestras de sangre periférica mediante una incubación a 4°C con un tampón de lisis de eritrocitos (RCLB, de las siglas en inglés *red cell lysis buffer*; 0,155 M NH<sub>4</sub>CL, 10mM KHCO<sub>3</sub>, 10 mM EDTA pH 7,4) y las células restantes fueron lavadas con PBS suplementado al 1% con suero de ternera fetal (FCS; del inglés *fecal calf serum*) (referido como PBS 1% FCS de ahora en adelante). Tras la tinción con anticuerpos (**Tabla 8**), las células se lavaron de nuevo con PBS 1% FCS y se resuspendieron en PBS 1% FCS que contenía 10µg/mL de yoduro de propidio (PI, de las siglas en inglés *propidium iodide*), para la exclusión de las células muertas en los análisis.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Tabla 8** - Relación de anticuerpos utilizados para los análisis por citometría de flujo, concentración utilizada y casa comercial de la que se obtuvieron.

<b>Anticuerpo</b>	<b>Dilución empleada</b>	<b>Casa comercial</b>
<b>anti-B220 (RA3-6B2)</b>	1:100	Biolegend
<b>anti-CD4 (RM4-5)</b>	1:250	Biolegend
<b>anti-CD8a (53-6.7)</b>	1:250	Biolegend
<b>anti-CD11b/Mac1 (M1/70)</b>	1:200	Biolegend
<b>anti-CD19 (1D3)</b>	1:100	Biolegend
<b>anti-CD117/c-Kit (2B8)</b>	1:200	Biolegend
<b>anti-Ly-6G/Gr1 (RB6- 8C5)</b>	1:100	Biolegend
<b>anti-IgM (R6-60.2)</b>	1:100	Biolegend
<b>anti-CD25 (PC61)</b>	1:500	BD Biosciences
<b>anti-CD45</b>	1:100	BD Biosciences
<b>anti-Ter119 (TER119)</b>	1:100	Biolegend

Las muestras se adquirieron en el citómetro Accuri C6 (BD Biosciences) y fueron analizadas utilizando el software FlowJo. La fluorescencia específica para los fluorocromos FITC, PE, PI y APC, excitados a 488nm (0,4W) y 633nm (30mW), así como las propiedades conocidas de dispersión de la luz directa y ortogonal de las células de ratón fueron utilizadas para establecer las poblaciones. En cada análisis se examinaron al menos 50.000 células viables (PI<sup>-</sup>). Para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos, antes de ser teñidas las células se incubaron con anti-CD16/CD32 Fc-Block (2,4G2, 1:100, de BD Biosciences, cat. 553142).

Las poblaciones se identificaron de la siguiente manera: células B maduras en la periferia (B220<sup>+</sup> IgM<sup>+/-</sup>), células T CD4 (CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup>), células T CD8 (CD4<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup>), granulocitos (Gr1<sup>alto</sup> Mac<sup>alto</sup>), células T dobles positivas (CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>), células pro-B y pre-B en la médula ósea (B220<sup>bajo</sup> IgM<sup>-</sup>), células pro-B en la médula ósea (CD19<sup>+</sup> c-Kit<sup>+</sup>), células pre-B en la médula ósea (B220<sup>bajo</sup>CD25<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup>

), células B recirculantes en médula ósea (B220<sup>alto</sup> IgM<sup>+/-</sup>), células B inmaduras en médula ósea (B220<sup>bajo</sup> IgM<sup>+</sup>) y células B maduras en bazo y nódulos linfáticos (B220<sup>+</sup> CD19<sup>+</sup> y B220<sup>+</sup> IgM<sup>+/-</sup>).

## 16. Análisis de clonalidad de inmunoglobulinas (recombinación VDJ)

Los reordenamientos de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas fueron amplificados por PCR empleando distintas parejas de oligonucleótidos (Tabla 9). El programa empleado en el termociclador fue el siguiente: activación inicial a 95°C seguida por 35 ciclos de desnaturalización (95°C 1 min), anillamiento (65°C 1 min) y elongación (72°C 1 min 45 seg) y una elongación final a 72°C 10 minutos. Para determinar las secuencias de ADN de cada reordenamiento V(D)J individual, los fragmentos de PCR fueron discriminados mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8%.

*Tabla 9 - Oligonucleótidos utilizados para la PCR del reordenamiento de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas.*

NOMBRE	DIRECCIÓN	SECUENCIA
<b>V<sub>H</sub>J558</b>	sentido	5'-CGAGCTCTCCARCACAGCCTWCATGCARCTCARC-3'
	antisentido	5'-GTCTAGATTCTCACAAGAGTCCGATAGACCCTGG-3'
<b>V<sub>H</sub>7183</b>	sentido	5'-CGGTACCAAGAASAMCCTGTWCCTGCAAATGASC-3'
	antisentido	5'-GTCTAGATTCTCACAAGAGTCCGATAGACCCTGG-3'
<b>V<sub>H</sub>Q52</b>	sentido	5'-CGGTACCAGACTGARCATCASCAGGACAAAYTCC-3'
	antisentido	5'-GTCTAGATTCTCACAAGAGTCCGATAGACCCTGG-3'
<b>DH</b>	sentido	5'-TTCAAAGCACAATGCCTGGCT-3'
	antisentido	5'-GTCTAGATTCTCACAAGAGTCCGATAGACCCTGG-3'
<b>C<sub>μ</sub></b>	sentido	5'-TGGCCATGGGCTGCCTAGCCCGGGACTT-3'
	antisentido	5'-GCCTGACTGAGCTCACACAAGGAGGA-3'

## 17. Preparación de las librerías y secuenciación del ADN

El ADN fue purificado siguiendo los métodos detallados anteriormente. La preparación de la librería del exoma se realizó utilizando el kit Agilent SureSelectXT *Mouse All Exon* con modificaciones adaptadas de Fisher y

### 17. Preparación de las librerías y secuenciación del ADN

El ADN fue purificado siguiendo los métodos detallados anteriormente. La preparación de la librería del exoma se realizó utilizando el kit Agilent SureSelectXT *Mouse All Exon* con modificaciones adaptadas de Fisher y colaboradores<sup>242</sup>. Como breve resumen, se añadieron *beads* SPRI al protocolo original y se redujo el tamaño de la reacción a 0,5  $\mu$ L para poder usar tubos de PCR en los pasos siguientes, se redujo el volumen de lavado, se minimizó la pérdida de muestra y se optimizó el procesamiento reduciendo el manejo de la muestra. Por lo tanto, simplemente se añadió un preparado fresco 20% PEG y 2,5M NaCl (Sigma) en lugar de eluir las muestras de las *beads* SPRI para la preparación de la librería. Se realizó la captura dirigida gracias a la hibridación con una librería de ARN, siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. La purificación y el enriquecimiento de esta librería se realizó mediante la unión a “*MyOne Streptavidin T1 Dynabeads*” (Life Technologies) y la amplificación de los elementos no unidos a los *beads* por PCR en un rango lineal. La secuenciación de  $2 \times 10^2$  pb con un índice de lectura de 6-8 pb fue realizada utilizando el kit TruSeq SBS kit v3 en el secuenciador HiSeq 2500 (Illumina).

Los archivos Fastq se generaron utilizando bcltoFastq 2.19.0.316 (Illumina). Se utilizó la versión 0.7.12 de BWA<sup>243</sup> para alinear los datos secuenciados con el genoma de referencia de ratón (GRCm38.71). Los pasos de conversión se llevaron a cabo utilizando Samtools 1.3.2<sup>244,245</sup>, seguidos por la retirada de las lecturas duplicadas (<http://broadinstitute.github.io/picard>).

El reordenamiento local alrededor de los *indels* (inserción-delección), la denominación de los SNPs, la anotación y la recalibración fueron facilitados por GATK 3.5<sup>246</sup>. Los SNP de ratón dbSNP138 y dbSNP fueron utilizados como conjuntos de datos para la recalibración. Las variaciones resultantes entre los datos secuenciados y la secuencia referencia fueron anotadas por el programa *Variant Effect Predictor*<sup>247</sup> utilizando la base de datos Ensembl (v70) e importadas a una base de datos propia (servidor MySWL interno, SQL), para facilitar la anotación automática y manual y el análisis de los datos. Las

puntuaciones de predicción de pérdida de función para PolyPhen2<sup>248</sup> y SIFT<sup>249</sup> se extrajeron de Ensembl.

Las anotaciones somáticas fueron realizadas utilizando MuTect<sup>250</sup> y VarScan<sup>251</sup>; se aplicó el filtro de detección de falsos-positivos siguiendo las sugerencias del autor de VarScan2. Solo las entradas con al menos un 9% de diferencia en la frecuencia alélica entre la muestra tumor y control fueron utilizadas para análisis posteriores. Los genes relacionados con cáncer se han seleccionado traduciendo la lista “*cancer gene consensus*” de COSMIC<sup>252</sup>, utilizando la aplicación Biomart de Ensembl<sup>253</sup>.

### 18. Secuenciación del genoma completo (WGS)

Las librerías de ADN genómico se prepararon desde ADN fragmentado (extraído de muestras de médula ósea o nódulos linfáticos tumorales con más de un 70% de células tumorales y muestras de ADN de la cola como muestras germinales) con el kit *HyperPrep Library Preparation Kit* (Roche PN 07962363001). Se realizó la secuenciación de 150 ciclos por partes en el NovaSeq 6000 (Illumina). Las lecturas pareadas de Illumina se pre-procesaron y mapearon al genoma de referencia del ratón (mm10) con BWA<sup>245</sup>. Se usó una aproximación en conjunto para buscar mutaciones somáticas (SNV/indels) con varias herramientas publicadas, incluyendo Mutect2<sup>250</sup>, SomaticSniper<sup>254</sup>, VarScan2<sup>251</sup>, MuSe<sup>255</sup> y Strelka<sup>256</sup>. Los resultados que tenían al menos dos fuentes se consideraron como mutaciones fiables. Estos resultados fueron revisados manualmente para una lectura más profunda, un mapeo de calidad y el sesgo de hebra para retirar artefacto. Las alteraciones somáticas en el número de copias se determinaron por CNVkit<sup>257</sup>. Para las variantes estructurales SV, cuatro fuentes de SV se implementaron en el flujo de trabajo para la búsqueda de SV, incluyendo Delly<sup>258</sup>, Lumpy<sup>259</sup>, Manta<sup>260</sup> y Gridss<sup>261</sup>. Los resultados de SV que pasaron los filtros de control de calidad de cada fuente se fusionaron usando SURVIVOR<sup>262</sup> y se genotiparon por SBtyper<sup>263</sup>. Los resultados encontrados se revisaron manualmente para apoyar los recuentos más flojos y las lecturas discordantes en ambos extremos de un supuesto sitio de SV usando IGV.

### 19. Arrays de expresión

El ARN total se aisló en 2 pasos, utilizando TRIzol (Life Technologies) seguido de la purificación con *RNeasy Mini-Kit* (Qiagen) siguiendo el protocolo “*RNA clean-up*” con tratamiento opcional de DNasa. La integridad y calidad del ARN fueron verificadas por electroforesis en gel de agarosa y su concentración fue medida utilizando Agilent (Agilent Technologies). Las muestras fueron analizadas utilizando los arrays “*Affymetrix Mouse Gene 1.0 ST*”.

Como breve resumen, se utilizó el algoritmo “*robust microarray analysis*” (RMA) para la corrección del fondo, la normalización intra- e inter-microarray, y el cálculo de la señal de expresión<sup>264–266</sup>. Una vez fue calculada la señal de expresión absoluta para cada gen (por ejemplo, el valor de cada *probe set*) en cada microarray, se aplicó el método “*significance analysis of microarray*” (SAM)<sup>267</sup> para calcular la expresión diferencial significativa y encontrar los genes que caracterizan las muestras problema comparadas con las muestras control en cada caso (por ejemplo, muestras de ratones tratados con antibióticos o con ruxolitinib contra ratones no tratados). Este método utiliza permutaciones para calcular de forma robusta la inferencia estadística de los genes más significativos y proporciona p-valores ajustados a múltiples test utilizando el “*false Discovery rate*” (FDR)<sup>268</sup>. Un corte al menos entre  $FDR < 0,05$  o  $FDR < 0,015$  se utilizó para los cálculos de expresión diferencial. Todos estos métodos se aplicaron utilizando R<sup>269</sup> y Bioconductor<sup>270</sup>.

Los datos discutidos en este trabajo se han publicado y depositado en la plataforma Gene Expression Omnibus (GEO)<sup>271</sup> y son accesibles a través de los números de acceso de GEO GSE179182, GSE62529 y GSE139547.

### 20. Análisis de enriquecimiento (GSEA)

El análisis de enriquecimiento de la expresión de determinados grupos de genes (*gene set enrichment analysis* – GSEA)<sup>201,272</sup> se llevó a cabo utilizando el software GSEAv2.2.2 y la colección de genes *hallmark*<sup>273</sup> (<http://www.broad.mit.edu/gsea/>). Las firmas de expresión genética que están

específicamente sobreexpresadas o subexpresadas en las LLA-B humanas<sup>274,275</sup> se compararon también con las encontradas en las leucemias murinas de los estudios usando GSEA.

Los datos de expresión génica del estudio con ruxolitinib se depositaron en la base de datos NCBI's Gene Expression Omnibus (GEO) y son accesibles con el número de acceso: GSE179182. Los datos de expresión génica del estudio del tratamiento con antibióticos son accesibles con los números de acceso: GSE62529 y GSE139547.







**ANEXOS**

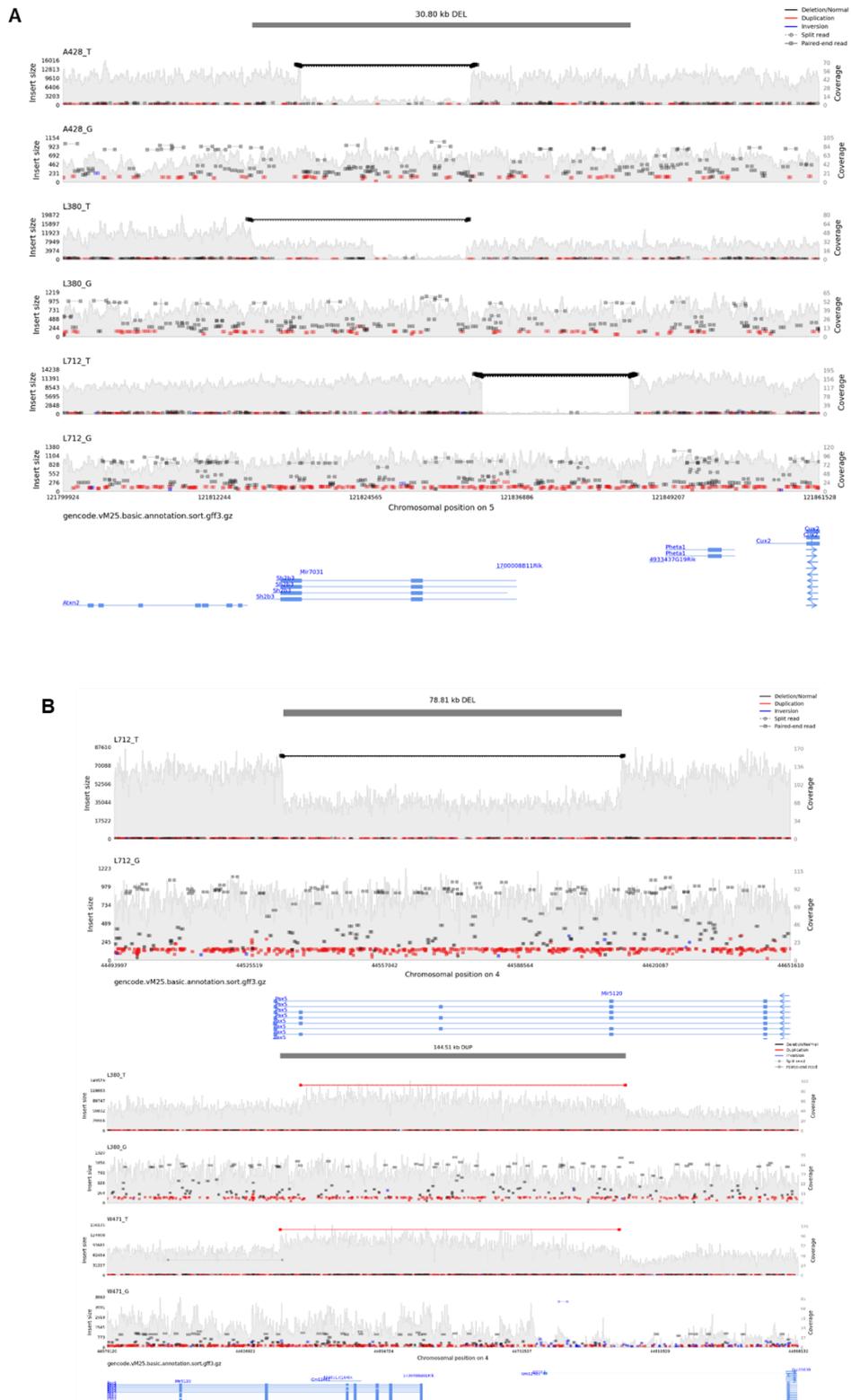


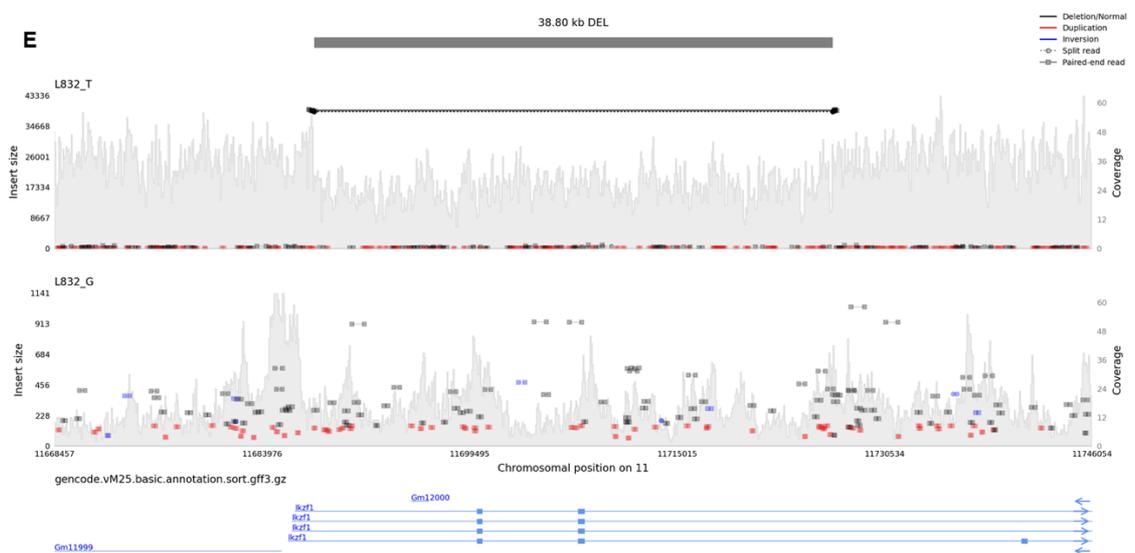
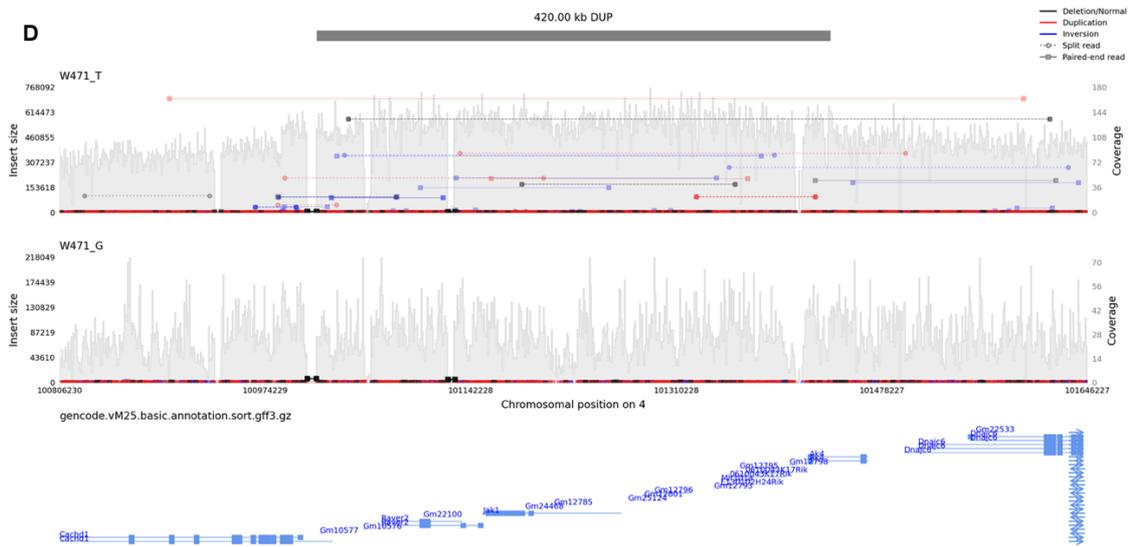
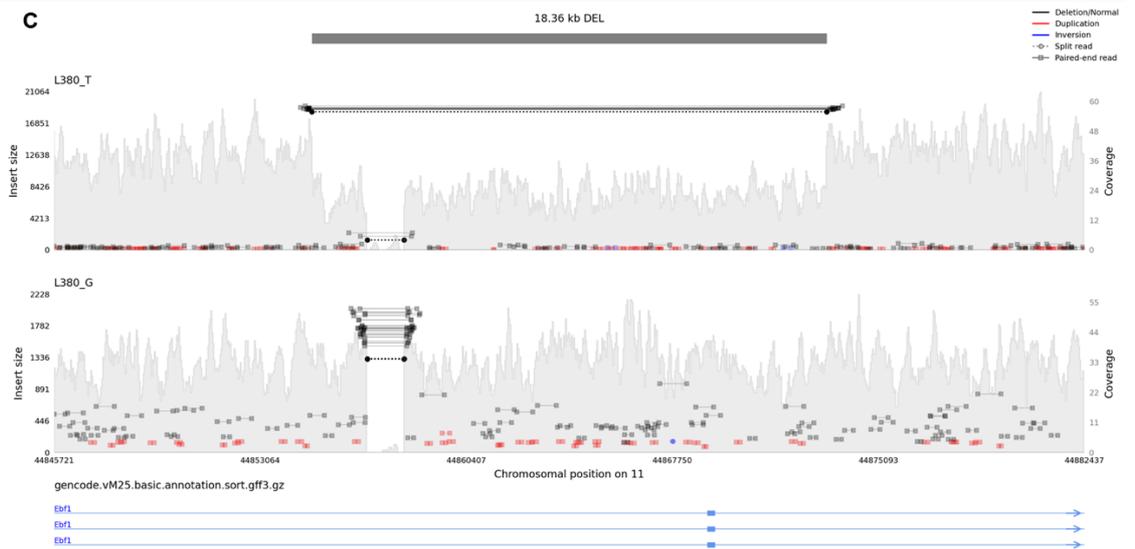
## ANEXOS

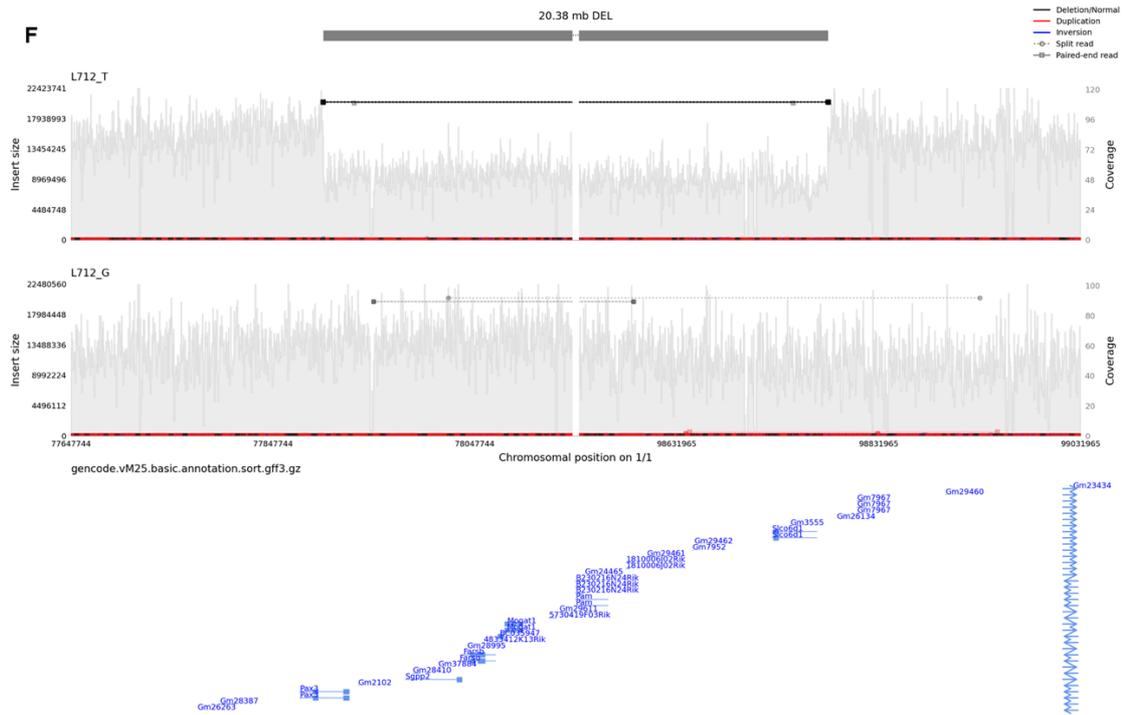
Tabla 10 - Estado microbiológico de los ratones en animalario convencional (CF).

CONVENTIONAL FACILITY HEALTH MONITORING REPORT				SPF FACILITY HEALTH MONITORING REPORT
Timeline	When mice are moved to the conventional facility	1 year later	2 years later	
<b>VIRUSES</b>				
MAD (Adenovirus type 1 and 2)	NEG	NEG	NEG	NEG
MCMV (Mouse cytomegalovirus)	NEG	NEG	NEG	NEG
LCMV (Lymph choriomeningitis)	NEG	NEG	NEG	NEG
Ectromelia	NEG	NEG	NEG	NEG
EDIM	NEG	NEG	NEG	NEG
Hantaan virus	NEG	NEG	NEG	NEG
MHV (Mouse hepatitis virus)	POS	POS	POS	NEG
MVM (Minute virus)	NEG	NEG	NEG	NEG
MPV (Parvovirus type 1 and 2)	NEG	NEG	NEG	NEG
PVM (Pneumonia virus)	NEG	NEG	NEG	NEG
Reovirus type 3	NEG	NEG	NEG	NEG
Sendai	NEG	NEG	NEG	NEG
TMEV (Theiler's murine encephalomyelitis virus)	NEG	NEG	NEG	NEG
K virus	NEG	NEG	NEG	NEG
Polyoma virus	NEG	NEG	NEG	NEG
MNV (Norovirus)	POS	POS	POS	NEG
<b>BACTERIA</b>				
Bordetella bronchiseptica	NEG	NEG	NEG	NEG
Car-bacillus	NEG	NEG	NEG	NEG
Citrobacter rodentium	NEG	NEG	NEG	NEG
Clostridium piliforme (Tyzzer' disease)	NEG	NEG	NEG	NEG
Corynebacterium kutscheri	NEG	NEG	NEG	NEG
Mycoplasma pulmonis	NEG	NEG	NEG	NEG
Pasteurella pneumotropica	NEG	NEG	NEG	NEG
Pasteurella multocida	NEG	NEG	NEG	NEG
Salmonella spp	NEG	NEG	NEG	NEG
Streptobacillus moniliformis	NEG	NEG	NEG	NEG
Streptococci beta hemolíticos (A,G)	NEG	NEG	NEG	NEG
Streptococcus pneumoniae	NEG	NEG	NEG	NEG
Helicobacter spp	POS	POS	POS	NEG
<b>PARASITES</b>				
Ectoparasites	NEG	NEG	NEG	NEG
Helminth (A.tetraptrera, Syphacia spp)	NEG	NEG	NEG	NEG
Cestods (Hymenolepis spp)	NEG	NEG	NEG	NEG
Eimeria spp	NEG	NEG	NEG	NEG
Entamoeba muris	NEG	NEG	NEG	NEG
Giardia spp	NEG	NEG	NEG	NEG
Trichomonas muris	POS	POS	NEG	NEG
Spironucleus spp	NEG	NEG	NEG	NEG
Encephalitozoon cuniculi	NEG	NEG	NEG	NEG
<b>NECROPSY</b>	No gross lesion	No gross lesion	No gross lesion.	No gross lesion.
<b>NEG: Negative</b>				

## Figura suplementaria 1







**Figura suplementaria 1** – Visualización del navegador del genoma de las muestras analizadas por WES. Se representa ADN genómico tumoral (T) y ADN germinal (G). **A)** Deleciones identificadas por WGS del gen *Sh2b3* en los ratones A428, L380 y L712. **B)** Deleciones del gen *Pax5* identificadas por WGS en los ratones L712 y amplificaciones del gen *Pax5* identificadas por WGS en los ratones L380 y W471. **C)** Deleción identificada por WGS del gen *Ebf1* en el ratón L380. **D)** Amplificación identificada por WGS del gen *Jak1* en el ratón W471 tratado con ruxolitinib. **E)** Deleción identificada por WGS del gen *Ikzf1* en el ratón L832. **F)** Deleción identificada por WGS del gen *Pax5* en el ratón L712.





## **BIBLIOGRAFÍA**



## BIBLIOGRAFÍA

1. Tebbi CK. Etiology of Acute Leukemia: A Review. *Cancers*. 2021;13(9):2256. doi:10.3390/cancers13092256
2. 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(5):937-951. doi:10.1182/blood-2009-03-209262
3. Terwilliger T, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer Journal*. 2017;7(6):e577. doi:10.1038/bcj.2017.53
4. Chang JH, Poppe MM, Hua C, Marcus KJ, Esiashvili N. Acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2021;68(S2). doi:10.1002/pbc.28371
5. Malouf C, Ottersbach K. Molecular processes involved in B cell acute lymphoblastic leukaemia. *Cell Mol Life Sci*. 2018;75(3):417-446. doi:10.1007/s00018-017-2620-z
6. Hunger SP, Mullighan CG. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. Longo DL, ed. *New England Journal of Medicine*. 2015;373(16):1541-1552. doi:10.1056/NEJMra1400972
7. Moorman A V. New and emerging prognostic and predictive genetic biomarkers in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2016;101(4):407-416. doi:10.3324/haematol.2015.141101
8. Inaba H, Mullighan CG. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *haematol*. 2020;105(11):2524-2539. doi:10.3324/haematol.2020.247031
9. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. *CA A Cancer J Clin*. 2021;71(1):7-33. doi:10.3322/caac.21654
10. Wiemels J. Perspectives on the causes of childhood leukemia. *Chemico-Biological Interactions*. 2012;196(3):59-67. doi:10.1016/j.cbi.2012.01.007
11. Cancer Facts & Figures 2021. Published online 1930:72.
12. Moorman AV. New and emerging prognostic and predictive genetic biomarkers in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2016;101(4):407-416. doi:10.3324/haematol.2015.141101
13. Amitay EL, Keinan-Boker L. Breastfeeding and Childhood Leukemia Incidence: A Meta-analysis and Systematic Review. *JAMA Pediatr*. 2015;169(6):e151025. doi:10.1001/jamapediatrics.2015.1025
14. Jasinski S, De Los Reyes FA, Yametti GC, Pierro J, Raetz E, Carroll WL. Immunotherapy in Pediatric B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: Advances and Ongoing Challenges. *Pediatr Drugs*. 2020;22(5):485-499. doi:10.1007/s40272-020-00413-3
15. Greaves M. A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2018;18(8):471-484. doi:10.1038/s41568-018-0015-6

## BIBLIOGRAFÍA

---

16. González-Herrero I, Rodríguez-Hernández G, Luengas-Martínez A, et al. The Making of Leukemia. *IJMS*. 2018;19(5):1494. doi:10.3390/ijms19051494
17. Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, et al. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*. 2007;446(7137):758-764. doi:10.1038/nature05690
18. Laurier D, Grosche B, Auvinen A, et al. Childhood leukaemia risks: from unexplained findings near nuclear installations to recommendations for future research. *J Radiol Prot*. 2014;34(3):R53-R68. doi:10.1088/0952-4746/34/3/R53
19. Pui CH, Yang JJ, Hunger SP, et al. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Progress Through Collaboration. *JCO*. 2015;33(27):2938-2948. doi:10.1200/JCO.2014.59.1636
20. Stieglitz E, Loh ML. Genetic predispositions to childhood leukemia. *Therapeutic Advances in Hematology*. 2013;4(4):270-290. doi:10.1177/2040620713498161
21. Swaminathan M, Bannon SA, Routbort M, et al. Hematologic malignancies and Li–Fraumeni syndrome. *Cold Spring Harb Mol Case Stud*. 2019;5(1):a003210. doi:10.1101/mcs.a003210
22. for the BFM Group, Dördelmann M, Schrappe M, et al. Down's syndrome in childhood acute lymphoblastic leukemia: clinical characteristics and treatment outcome in four consecutive BFM trials. *Leukemia*. 1998;12(5):645-651. doi:10.1038/sj.leu.2400989
23. Woods WG, Roloff JS, Lukens JN, Krivit W. The occurrence of leukemia in patients with the Shwachman syndrome. *The Journal of Pediatrics*. 1981;99(3):425-428. doi:10.1016/S0022-3476(81)80336-8
24. Shearer P, Parham D, Kovnar E, et al. Neurofibromatosis type I and malignancy: Review of 32 pediatric cases treated at a single institution. *Med Pediatr Oncol*. 1994;22(2):78-83. doi:10.1002/mpo.2950220203
25. SWIFT M. Fanconi's Anaemia in the Genetics of Neoplasia. *Nature*. 1971;230(5293):370-373. doi:10.1038/230370a0
26. Willis AE, Lindahl T. DNA ligase I deficiency in Bloom's syndrome. *Nature*. 1987;325(6102):355-357. doi:10.1038/325355a0
27. Miller RW. Relation between cancer and congenital defects: an epidemiologic evaluation. *J Natl Cancer Inst*. 1968;40(5):1079-1085.
28. Ziegelberger G, Baum C, Borkhardt A, et al. Research recommendations toward a better understanding of the causes of childhood leukemia. *Blood Cancer Journal*. 2011;1(1):e1-e1. doi:10.1038/bcj.2010.1
29. Cobaleda C, Vicente-Dueñas C, Sanchez-Garcia I. Infectious triggers and novel therapeutic opportunities in childhood B cell leukaemia. *Nat Rev Immunol*. 2021;21(9):570-581. doi:10.1038/s41577-021-00505-2
30. Kaatsch P, Spix C, Jung I, Blettner M. Childhood Leukemia in the Vicinity of Nuclear Power Plants in Germany. *Deutsches Aerzteblatt Online*. Published online October 17, 2008. doi:10.3238/arztebl.2008.0725
31. Descatha A, Jenabian A, Conso F, Ameille J. Occupational Exposures and Haematological Malignancies: Overview on Human Recent Data. *Cancer Causes Control*. 2005;16(8):939-953. doi:10.1007/s10552-005-

2301-3

32. Finch SC. Radiation-induced leukemia: Lessons from history. *Best Practice & Research Clinical Haematology*. 2007;20(1):109-118. doi:10.1016/j.beha.2006.10.009
33. Bhatia S, Robison LL. Epidemiology of leukemia and lymphoma. *Current Opinion in Hematology*. 1999;6(4). [https://journals.lww.com/co-hematology/Fulltext/1999/07000/Epidemiology\\_of\\_leukemia\\_and\\_lymphoma.2.aspx](https://journals.lww.com/co-hematology/Fulltext/1999/07000/Epidemiology_of_leukemia_and_lymphoma.2.aspx)
34. Preston DL, Kato H, Kopecky KJ, Fujita S. Studies of the Mortality of A-Bomb Survivors: 8. Cancer Mortality, 1950-1982. *Radiation Research*. 1987;111(1):151-178. doi:10.2307/3577030
35. Kellerbyrne JE, Khuder SA, Schaub EA. Meta-analysis of Leukemia and Farming. *Environmental Research*. 1995;71(1):1-10. doi:<https://doi.org/10.1006/enrs.1995.1060>
36. Rinsky RA, Smith AB, Hornung R, et al. Benzene and Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 1987;316(17):1044-1050. doi:10.1056/NEJM198704233161702
37. Household solvent exposures and childhood acute lymphoblastic leukemia. *Am J Public Health*. 2001;91(4):564-567. doi:10.2105/AJPH.91.4.564
38. Smith MA, McCaffrey RP, Karp JE. The Secondary Leukemias: Challenges and Research Directions. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 1996;88(7):407-418. doi:10.1093/jnci/88.7.407
39. Ron E. Ionizing Radiation and Cancer Risk: Evidence from Epidemiology. *Radiation Research*. 1998;150(5):S30-S41. doi:10.2307/3579806
40. Sali D, Cardis E, Sztanyik L, et al. Cancer consequences of the Chernobyl accident in Europe outside the former USSR: A review. *Int J Cancer*. 1996;67(3):343-352. doi:10.1002/(SICI)1097-0215(19960729)67:3<343::AID-IJC7>3.0.CO;2-R
41. Moloney WC. Leukemia in Survivors of Atomic Bombing. *N Engl J Med*. 1955;253(3):88-90. doi:10.1056/NEJM195507212530302
42. Reigstad MM, Larsen IK, Myklebust TÅ, et al. Risk of Cancer in Children Conceived by Assisted Reproductive Technology. *Pediatrics*. 2016;137(3):e20152061. doi:10.1542/peds.2015-2061
43. on behalf of the UK Childhood Cancer Study Investigators, Pang D, McNally R, Birch JM. Parental smoking and childhood cancer: results from the United Kingdom Childhood Cancer Study. *Br J Cancer*. 2003;88(3):373-381. doi:10.1038/sj.bjc.6600774
44. Dockerty JD, Draper G, Vincent T, Rowan SD, Bunch KJ. Case-control study of parental age, parity and socioeconomic level in relation to childhood cancers. *International Journal of Epidemiology*. 2001;30(6):1428-1437. doi:10.1093/ije/30.6.1428
45. Savitz D A, Chen J H. Parental occupation and childhood cancer: review of epidemiologic studies. *Environmental Health Perspectives*. 1990;88:325-337. doi:10.1289/ehp.9088325
46. Lowengart RA, Peters JM, Cicioni C, et al. Childhood leukemia and parents' occupational and home

- exposures. *J Natl Cancer Inst.* 1987;79(1):39-46.
47. Brown WMC. INCIDENCE OF LEUKAEMIA AFTER EXPOSURE TO DIAGNOSTIC RADIATION IN UTERO. :7.
  48. Kleinerman RA. Cancer risks following diagnostic and therapeutic radiation exposure in children. *Pediatr Radiol.* 2006;36(S2):121-125. doi:10.1007/s00247-006-0191-5
  49. Errata: Risk Factors for Acute Leukemia in Children: A Review. *Environmental Health Perspectives.* 2010;118(9):A380-A380. doi:10.1289/ehp.118-2944105
  50. Gruhn B, Taub JW, Ge Y, et al. Prenatal origin of childhood acute lymphoblastic leukemia, association with birth weight and hyperdiploidy. *Leukemia.* 2008;22(9):1692-1697. doi:10.1038/leu.2008.152
  51. Greaves MF. Speculations on the cause of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 1988;2(2):120-125.
  52. Hauer J, Martín-Lorenzo A, Sánchez-García I. Infection causes childhood leukemia. *Aging.* 2015;7(9):607-608. doi:10.18632/aging.100815
  53. Matsuoka M. Human T-cell leukemia virus type I and adult T-cell leukemia. *Oncogene.* 2003;22(33):5131-5140. doi:10.1038/sj.onc.1206551
  54. Taub JW, Ge Y, Xavier AC. COVID-19 and childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer.* 2020;67(7). doi:10.1002/psc.28400
  55. Bach JF. The hygiene hypothesis in autoimmunity: the role of pathogens and commensals. *Nat Rev Immunol.* 2018;18(2):105-120. doi:10.1038/nri.2017.111
  56. Greaves M. The 'delayed infection' (aka 'hygiene') hypothesis for childhood leukaemia. In: Rook GAW, ed. *The Hygiene Hypothesis and Darwinian Medicine.* Birkhäuser Basel; 2009:239-255. doi:10.1007/978-3-7643-8903-1\_13
  57. Okada H, Kuhn C, Feillet H, Bach JF. The 'hygiene hypothesis' for autoimmune and allergic diseases: an update. *Clinical and Experimental Immunology.* 2010;160(1):1-9. doi:10.1111/j.1365-2249.2010.04139.x
  58. Greaves M, Cazzaniga V, Ford A. Can we prevent childhood Leukaemia? *Leukemia.* 2021;35(5):1258-1264. doi:10.1038/s41375-021-01211-7
  59. Kosmider O, Moreau-Gachelin F. From Mice to Human: The "Two-Hit Model" of Leukemogenesis. *Cell Cycle.* 2006;5(6):569-570. doi:10.4161/cc.5.6.2577
  60. Hein D, Borkhardt A, Fischer U. Insights into the prenatal origin of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer and Metastasis Reviews.* 2020;39(1):161-171. doi:10.1007/s10555-019-09841-1
  61. Schäfer D, Olsen M, Lähnemann D, et al. Five percent of healthy newborns have an ETV6-RUNX1 fusion as revealed by DNA-based GIPFEL screening. *Blood.* 2018;131(7):821-826. doi:10.1182/blood-2017-09-808402
  62. Zhou Y, You MJ, Young KH, et al. Advances in the molecular pathobiology of B-lymphoblastic leukemia.

- Human Pathology*. 2012;43(9):1347-1362. doi:10.1016/j.humpath.2012.02.004
63. Mori H, Colman SM, Xiao Z, et al. Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002;99(12):8242-8247. doi:10.1073/pnas.112218799
  64. Hein D, Borkhardt A, Fischer U. Insights into the prenatal origin of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Metastasis Rev*. 2020;39(1):161-171. doi:10.1007/s10555-019-09841-1
  65. Falletta, J. M., Starling, K. A., & Fernbach, D. J. Leukemia in twins. *Pediatrics*. 1973;52(6):846-849.
  66. Ford AM, Bennett CA, Price CM, Bruin MCA, Van Wering ER, Greaves M. Fetal origins of the TEL-AML1 fusion gene in identical twins with leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998;95(8):4584-4588. doi:10.1073/pnas.95.8.4584
  67. Gu Z, Churchman ML, Roberts KG, et al. PAX5-driven subtypes of B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. 2019;51(2):296-307. doi:10.1038/s41588-018-0315-5
  68. Raboso-Gallego J, Casado-García A, Isidro-Hernández M, Vicente-Dueñas C. Epigenetic Priming in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Front Cell Dev Biol*. 2019;7:137. doi:10.3389/fcell.2019.00137
  69. Liu YF, Wang BY, Zhang WN, et al. Genomic Profiling of Adult and Pediatric B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *EBioMedicine*. 2016;8:173-183. doi:10.1016/j.ebiom.2016.04.038
  70. Iacobucci I, Mullighan CG. Genetic Basis of Acute Lymphoblastic Leukemia. *JCO*. 2017;35(9):975-983. doi:10.1200/JCO.2016.70.7836
  71. Kuiper RP, Schoenmakers EFPM, van Reijmersdal SV, et al. High-resolution genomic profiling of childhood ALL reveals novel recurrent genetic lesions affecting pathways involved in lymphocyte differentiation and cell cycle progression. *Leukemia*. 2007;21(6):1258-1266. doi:10.1038/sj.leu.2404691
  72. Roman E, Simpson J, Ansell P, et al. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia and Infections in the First Year of Life: A Report from the United Kingdom Childhood Cancer Study. *American Journal of Epidemiology*. 2006;165(5):496-504. doi:10.1093/aje/kwk039
  73. Kinlen L. Evidence for an infective cause of childhood leukaemia: comparison of a Scottish new town with nuclear reprocessing sites in Britain. *Lancet*. 1988;2(8624):1323-1327. doi:10.1016/s0140-6736(88)90867-7
  74. Kinlen L. Childhood leukaemia, nuclear sites, and population mixing. *Br J Cancer*. 2011;104(1):12-18. doi:10.1038/sj.bjc.6605982
  75. Kinlen L. Epidemiological evidence for an infective basis in childhood leukaemia. :5.
  76. Papaemmanuil E, Rapado I, Li Y, et al. RAG-mediated recombination is the predominant driver of oncogenic rearrangement in ETV6-RUNX1 acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. 2014;46(2):116-125. doi:10.1038/ng.2874
  77. Rodríguez-Hernández G, Opitz FV, Delgado P, et al. Infectious stimuli promote malignant B-cell acute lymphoblastic leukemia in the absence of AID. *Nat Commun*. 2019;10(1):5563. doi:10.1038/s41467-019-

13570-y

78. Martín-Lorenzo A, Hauer J, Vicente-Dueñas C, et al. Infection Exposure Is a Causal Factor in B-cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia as a Result of *Pax5* -Inherited Susceptibility. *Cancer Discov.* 2015;5(12):1328-1343. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-0892
79. Rodríguez-Hernández G, Hauer J, Martín-Lorenzo A, et al. Infection Exposure Promotes *ETV6-RUNX1* Precursor B-cell Leukemia via Impaired H3K4 Demethylases. *Cancer Res.* 2017;77(16):4365-4377. doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-0701
80. Vicente-Dueñas C, Janssen S, Oldenburg M, et al. An intact gut microbiome protects genetically predisposed mice against leukemia. *Blood.* 2020;136(18):2003-2017. doi:10.1182/blood.2019004381
81. Fattizzo B, Cavallaro F, Folino F, Barcellini W. Recent insights into the role of the microbiome in malignant and benign hematologic diseases. *Critical Reviews in Oncology/Hematology.* 2021;160:103289. doi:10.1016/j.critrevonc.2021.103289
82. Guedj A, Volman Y, Geiger-Maor A, et al. Gut microbiota shape 'inflamm-ageing' cytokines and account for age-dependent decline in DNA damage repair. *Gut.* 2020;69(6):1064-1075. doi:10.1136/gutjnl-2019-318491
83. Gopalakrishnan V, Helmink BA, Spencer CN, Reuben A, Wargo JA. The Influence of the Gut Microbiome on Cancer, Immunity, and Cancer Immunotherapy. *Cancer Cell.* 2018;33(4):570-580. doi:10.1016/j.ccell.2018.03.015
84. Uribe-Herranz M, Klein-González N, Rodríguez-Lobato LG, Juan M, Fernández de Larrea C. Gut Microbiota Influence in Hematological Malignancies: From Genesis to Cure. *IJMS.* 2021;22(3):1026. doi:10.3390/ijms22031026
85. Ramirez J, Guarner F, Bustos Fernandez L, Maruy A, Sdepanian VL, Cohen H. Antibiotics as Major Disruptors of Gut Microbiota. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10:572912. doi:10.3389/fcimb.2020.572912
86. Ferrer M, Méndez-García C, Rojo D, Barbas C, Moya A. Antibiotic use and microbiome function. *Biochemical Pharmacology.* 2017;134:114-126. doi:10.1016/j.bcp.2016.09.007
87. Blaser MJ. Antibiotic use and its consequences for the normal microbiome. *Science.* 2016;352(6285):544-545. doi:10.1126/science.aad9358
88. Longhi G, van Sinderen D, Ventura M, Turrone F. Microbiota and Cancer: The Emerging Beneficial Role of Bifidobacteria in Cancer Immunotherapy. *Front Microbiol.* 2020;11:575072. doi:10.3389/fmicb.2020.575072
89. Tamburini S, Shen N, Wu HC, Clemente JC. The microbiome in early life: implications for health outcomes. *Nat Med.* 2016;22(7):713-722. doi:10.1038/nm.4142
90. Berg G, Rybakova D, Fischer D, et al. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome.* 2020;8(1):103. doi:10.1186/s40168-020-00875-0
91. Levy M, Kolodziejczyk AA, Thaiss CA, Elinav E. Dysbiosis and the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(4):219-232. doi:10.1038/nri.2017.7

92. Robertson SJ, Goethel A, Girardin SE, Philpott DJ. Innate Immune Influences on the Gut Microbiome: Lessons from Mouse Models. *Trends in Immunology*. 2018;39(12):992-1004. doi:10.1016/j.it.2018.10.004
93. McCoy KD, Mager LF. Impact of the microbiome on tumor immunity. *Current Opinion in Immunology*. 2021;69:39-46. doi:10.1016/j.coi.2021.01.002
94. Shanahan F, Ghosh TS, O'Toole PW. The Healthy Microbiome—What Is the Definition of a Healthy Gut Microbiome? *Gastroenterology*. 2021;160(2):483-494. doi:10.1053/j.gastro.2020.09.057
95. Langdon A, Crook N, Dantas G. The effects of antibiotics on the microbiome throughout development and alternative approaches for therapeutic modulation. *Genome Med*. 2016;8(1):39. doi:10.1186/s13073-016-0294-z
96. McDonnell L, Gilkes A, Ashworth M, et al. Association between antibiotics and gut microbiome dysbiosis in children: systematic review and meta-analysis. *Gut Microbes*. 2021;13(1):1870402. doi:10.1080/19490976.2020.1870402
97. Gola A, Dorrington MG, Speranza E, et al. Commensal-driven immune zonation of the liver promotes host defence. *Nature*. 2021;589(7840):131-136. doi:10.1038/s41586-020-2977-2
98. Greaves M. Evolutionary Determinants of Cancer. *Cancer Discovery*. 2015;5(8):806-820. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-0439
99. Heltemes-Harris LM, Hubbard GK, LaRue RS, et al. Identification of mutations that cooperate with defects in B cell transcription factors to initiate leukemia. *Oncogene*. 2021;40(43):6166-6179. doi:10.1038/s41388-021-02012-z
100. Heltemes-Harris LM, Willette MJL, Ramsey LB, et al. Ebf1 or Pax5 haploinsufficiency synergizes with STAT5 activation to initiate acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Experimental Medicine*. 2011;208(6):1135-1149. doi:10.1084/jem.20101947
101. Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA. The JAK/STAT signaling pathway. *Journal of Cell Science*. 2004;117(8):1281-1283. doi:10.1242/jcs.00963
102. O'Shea JJ, Murray PJ. Cytokine Signaling Modules in Inflammatory Responses. *Immunity*. 2008;28(4):477-487. doi:10.1016/j.immuni.2008.03.002
103. Mendiola AV, Cruz IS. VÍA JAK-STAT: UNA VISIÓN GENERAL. :12.
104. Yasukawa H. The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. *The EMBO Journal*. 1999;18(5):1309-1320. doi:10.1093/emboj/18.5.1309
105. Steeghs EMP, Jerchel IS, de Goffau-Nobel W, et al. JAK2 aberrations in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget*. 2017;8(52):89923-89938. doi:10.18632/oncotarget.21027
106. Kim SK, Knight DA, Jones LR, et al. JAK2 is dispensable for maintenance of JAK2 mutant B-cell acute lymphoblastic leukemias. *Genes Dev*. 2018;32(11-12):849-864. doi:10.1101/gad.307504.117
107. Schinnerl D, Fortschegger K, Kauer M, et al. The role of the Janus-faced transcription factor PAX5-JAK2 in

- acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2015;125(8):1282-1291. doi:10.1182/blood-2014-04-570960
108. Ajayi S, Becker H, Reinhardt H, et al. Ruxolitinib. In: Martens UM, ed. *Small Molecules in Hematology*. Vol 212. Recent Results in Cancer Research. Springer International Publishing; 2018:119-132. doi:10.1007/978-3-319-91439-8\_6
109. Zhou T, Georgeon S, Moser R, Moore DJ, Cafilisch A, Hantschel O. Specificity and mechanism-of-action of the JAK2 tyrosine kinase inhibitors ruxolitinib and SAR302503 (TG101348). *Leukemia*. 2014;28(2):404-407. doi:10.1038/leu.2013.205
110. Quintás-Cardama A, Vaddi K, Liu P, et al. Preclinical characterization of the selective JAK1/2 inhibitor INCB018424: therapeutic implications for the treatment of myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2010;115(15):3109-3117. doi:10.1182/blood-2009-04-214957
111. Tefferi A, Barbui T. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2017 update on diagnosis, risk-stratification, and management: TEFFERI and BARBUI. *Am J Hematol*. 2017;92(1):94-108. doi:10.1002/ajh.24607
112. O'Shea JJ, Schwartz DM, Villarino AV, Gadina M, McInnes IB, Laurence A. The JAK-STAT Pathway: Impact on Human Disease and Therapeutic Intervention. *Annu Rev Med*. 2015;66(1):311-328. doi:10.1146/annurev-med-051113-024537
113. Verstovsek S, Levy RS, Catalano JV, et al. A Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of Ruxolitinib for Myelofibrosis. *The New England Journal of Medicine*. Published online 2012:9.
114. Verstovsek S RA, Gotlib J, Gupta V, et al. Long-term treatment with ruxolitinib for patients with myelofibrosis: 5-year update from the randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 COMFORT-I trial. *J Hematol Oncol*. 2017;10(1):55. doi:10.1186/s13045-017-0417-z
115. Verstovsek S, Kantarjian HM, Estrov Z, et al. Long-term outcomes of 107 patients with myelofibrosis receiving JAK1/JAK2 inhibitor ruxolitinib: survival advantage in comparison to matched historical controls. *Blood*. 2012;120(6):1202-1209. doi:10.1182/blood-2012-02-414631
116. on behalf of the COMFORT-II Investigators, Harrison CN, Vannucchi AM, et al. Long-term findings from COMFORT-II, a phase 3 study of ruxolitinib vs best available therapy for myelofibrosis. *Leukemia*. 2016;30(8):1701-1707. doi:10.1038/leu.2016.148
117. Harrison C, Kiladjian JJ, Al-Ali HK, et al. JAK Inhibition with Ruxolitinib versus Best Available Therapy for Myelofibrosis. *N Engl J Med*. 2012;366(9):787-798. doi:10.1056/NEJMoa1110556
118. Stegelmann F, Hebart H, Bangerter M, et al. Ruxolitinib Plus Pomalidomide in Myelofibrosis: Updated Results from the Mpnsg-0212 Trial (NCT01644110). *Blood*. 2016;128(22):1939-1939. doi:10.1182/blood.V128.22.1939.1939
119. Daver N, Cortes JE, Pemmaraju N, et al. Ruxolitinib (RUX) in Combination with 5-Azacytidine (AZA) As Therapy for Patients (pts) with Myelofibrosis (MF). *Blood*. 2016;128(22):1127-1127. doi:10.1182/blood.V128.22.1127.1127
120. Spoerl S, Mathew NR, Bscheider M, et al. Activity of therapeutic JAK 1/2 blockade in graft-versus-host

- disease. *Blood*. 2014;123(24):3832-3842. doi:10.1182/blood-2013-12-543736
121. Zeiser R, Burchert A, Lengerke C, et al. Ruxolitinib in corticosteroid-refractory graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation: a multicenter survey. *Leukemia*. 2015;29(10):2062-2068. doi:10.1038/leu.2015.212
  122. Caocci G, Murgia F, Podda L, Solinas A, Atzeni S, La Nasa G. Reactivation of hepatitis B virus infection following ruxolitinib treatment in a patient with myelofibrosis. *Leukemia*. 2014;28(1):225-227. doi:10.1038/leu.2013.235
  123. Patel KP, Newberry KJ, Luthra R, et al. Correlation of mutation profile and response in patients with myelofibrosis treated with ruxolitinib. *Blood*. 2015;126(6):790-797. doi:10.1182/blood-2015-03-633404
  124. Ding YY, Stern JW, Jubelirer TF, et al. Clinical efficacy of ruxolitinib and chemotherapy in a child with Philadelphia chromosome-like acute lymphoblastic leukemia with *GOLGA5-JAK2* fusion and induction failure. *Haematologica*. 2018;103(9):e427-e431. doi:10.3324/haematol.2018.192088
  125. Barbosa TC, Lopes BA, Blunck CB, et al. A novel PAX5 rearrangement in TCF3-PBX1 acute lymphoblastic leukemia: a case report. *BMC Med Genomics*. 2018;11(1):122. doi:10.1186/s12920-018-0444-9
  126. Urbánek P, Wang ZQ, Fetka I, Wagner EF, Busslinger M. Complete block of early B cell differentiation and altered patterning of the posterior midbrain in mice lacking Pax5 BSAP. *Cell*. 1994;79:901-912.
  127. Dang J, Wei L, de Ridder J, et al. PAX5 is a tumor suppressor in mouse mutagenesis models of acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2015;125(23):3609-3617. doi:10.1182/blood-2015-02-626127
  128. Netea MG, Wijmenga C, O'Neill LAJ. Genetic variation in Toll-like receptors and disease susceptibility. *Nat Immunol*. 2012;13(6):535-542. doi:10.1038/ni.2284
  129. Maglione PJ, Simchoni N, Cunningham-Rundles C. Toll-like receptor signaling in primary immune deficiencies: TLR signaling in primary immune deficiencies. *Ann NY Acad Sci*. 2015;1356(1):1-21. doi:10.1111/nyas.12763
  130. Beutler BA. TLRs and innate immunity. *Blood*. 2009;113(7):1399-1407. doi:10.1182/blood-2008-07-019307
  131. Feng Y, Mu R, Wang Z, et al. A toll-like receptor agonist mimicking microbial signal to generate tumor-suppressive macrophages. *Nat Commun*. 2019;10(1):2272. doi:10.1038/s41467-019-10354-2
  132. Hänel G, Angerer C, Petry K, Lichtenegger FS, Subklewe M. Blood DCs activated with R848 and poly(I:C) induce antigen-specific immune responses against viral and tumor-associated antigens. *Cancer Immunol Immunother*. Published online November 25, 2021. doi:10.1007/s00262-021-03109-w
  133. Salcedo R, Cataisson C, Hasan U, Yuspa SH, Trinchieri G. MyD88 and its divergent toll in carcinogenesis. *Trends in Immunology*. 2013;34(8):379-389. doi:10.1016/j.it.2013.03.008
  134. Chiron D, Bekeredjian-Ding I, Pellat-Deceunynck C, Bataille R, Jego G. Toll-like receptors: lessons to learn from normal and malignant human B cells. *Blood*. 2008;112(6):2205-2213. doi:10.1182/blood-2008-02-140673

## BIBLIOGRAFÍA

---

135. Kang SM, Yoo DG, Kim MC, et al. MyD88 Plays an Essential Role in Inducing B Cells Capable of Differentiating into Antibody-Secreting Cells after Vaccination. *Journal of Virology*. 2011;85(21):11391-11400. doi:10.1128/JVI.00080-11
136. Gavin AL, Hoebe K, Duong B, et al. Adjuvant-Enhanced Antibody Responses in the Absence of Toll-Like Receptor Signaling. *Science*. 2006;314(5807):1936-1938. doi:10.1126/science.1135299
137. Larsson E, Tremaroli V, Lee YS, et al. Analysis of gut microbial regulation of host gene expression along the length of the gut and regulation of gut microbial ecology through MyD88. *Gut*. 2012;61(8):1124-1131. doi:10.1136/gutjnl-2011-301104
138. Hua Z, Hou B. TLR signaling in B-cell development and activation. *Cell Mol Immunol*. 2013;10(2):103-106. doi:10.1038/cmi.2012.61
139. Netea MG, van de Veerdonk FL, van der Meer JWM. Primary immunodeficiencies of pattern recognition receptors. *J Intern Med*. 2012;272(6):517-527. doi:10.1111/j.1365-2796.2012.02583.x
140. Suhir H, Etzioni A. The Role of Toll-Like Receptor Signaling in Human Immunodeficiencies. *Clinic Rev Allerg Immunol*. 2010;38(1):11-19. doi:10.1007/s12016-009-8135-0
141. Takeda K, Akira S. Toll-Like Receptors. *Current Protocols in Immunology*. 2015;109(1). doi:10.1002/0471142735.im1412s109
142. Salaun B, Lebecque S, Matikainen S, Rimoldi D, Romero P. Toll-like Receptor 3 Expressed by Melanoma Cells as a Target for Therapy? *Clin Cancer Res*. 2007;13(15):4565-4574. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-0274
143. LaRue H, Ayari C, Bergeron A, Fradet Y. Toll-like receptors in urothelial cells—targets for cancer immunotherapy. *Nat Rev Urol*. 2013;10(9):537-545. doi:10.1038/nrurol.2013.153
144. Pinto A, Morello S, Sorrentino R. Lung cancer and Toll-like receptors. *Cancer Immunol Immunother*. 2011;60(9):1211-1220. doi:10.1007/s00262-011-1057-8
145. Chuffa LGA, Fioruci-Fontanelli BA, Mendes LO, et al. Melatonin attenuates the TLR4-mediated inflammatory response through MyD88- and TRIF-dependent signaling pathways in an in vivo model of ovarian cancer. *BMC Cancer*. 2015;15(1):34. doi:10.1186/s12885-015-1032-4
146. Li TT, Ogino S, Qian ZR. Toll-like receptor signaling in colorectal cancer: Carcinogenesis to cancer therapy. *WJG*. 2014;20(47):17699-17708. doi:10.3748/wjg.v20.i47.17699
147. Wang BG, Yi DH, Liu YF. TLR3 gene polymorphisms in cancer: a systematic review and meta-analysis. *Chin J Cancer*. 2015;34(3):19. doi:10.1186/s40880-015-0020-z
148. Fan L, Zhou P, Chen AX, Liu GY, Yu KD, Shao ZM. Toll-like receptor 3 -926T>A increased the risk of breast cancer through decreased transcriptional activity. *Oncol Immunology*. 2019;8(12):e1673126. doi:10.1080/2162402X.2019.1673126
149. Sánchez-Cuaxospa M, Contreras-Ramos A, Pérez-Figueroa E, et al. Low expression of Toll-like receptors in peripheral blood mononuclear cells of pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *International*

- Journal of Oncology*. 2016;49(2):675-681. doi:10.3892/ijo.2016.3569
150. Yang Y, Feng R, Wang YZ, Sun HW, Zou QM, Li HB. Toll-like receptors: Triggers of regulated cell death and promising targets for cancer therapy. *Immunology Letters*. 2020;223:1-9. doi:10.1016/j.imlet.2020.04.002
  151. Tian M, Hua Z, Hong S, et al. B Cell–Intrinsic MyD88 Signaling Promotes Initial Cell Proliferation and Differentiation To Enhance the Germinal Center Response to a Virus-like Particle. *Jl*. 2018;200(3):937-948. doi:10.4049/jimmunol.1701067
  152. Mohs A, Kuttkat N, Otto T, Youssef SA, De Bruin A, Trautwein C. MyD88-dependent signaling in non-parenchymal cells promotes liver carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2020;41(2):171-181. doi:10.1093/carcin/bgy173
  153. Hong EH, Chang SY, Lee BR, et al. Blockade of Myd88 signaling induces antitumor effects by skewing the immunosuppressive function of myeloid-derived suppressor cells. *Int J Cancer*. 2013;132(12):2839-2848. doi:10.1002/ijc.27974
  154. Liu X, Chen JG, Munshi M, et al. Expression of the prosurvival kinase HCK requires PAX5 and mutated MYD88 signaling in MYD88-driven B-cell lymphomas. *Blood Advances*. 2020;4(1):141-153. doi:10.1182/bloodadvances.2019000947
  155. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell*. 2006;124(4):783-801. doi:10.1016/j.cell.2006.02.015
  156. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(7):499-511. doi:10.1038/nri1391
  157. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, et al. Role of Adaptor TRIF in the MyD88-Independent Toll-Like Receptor Signaling Pathway. *Science*. 2003;301(5633):640-643. doi:10.1126/science.1087262
  158. Ullah MO, Sweet MJ, Mansell A, Kellie S, Kobe B. TRIF-dependent TLR signaling, its functions in host defense and inflammation, and its potential as a therapeutic target. *Journal of Leukocyte Biology*. 2016;100(1):27-45. doi:10.1189/jlb.2RI1115-531R
  159. Tatematsu M, Seya T, Matsumoto M. Beyond dsRNA: Toll-like receptor 3 signalling in RNA-induced immune responses. *Biochemical Journal*. 2014;458(2):195-201. doi:10.1042/BJ20131492
  160. Yoneyama M, Kikuchi M, Matsumoto K, et al. Shared and Unique Functions of the DExD/H-Box Helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in Antiviral Innate Immunity. *J Immunol*. 2005;175(5):2851-2858. doi:10.4049/jimmunol.175.5.2851
  161. Matsumoto M, Seya T. TLR3: Interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C)☆. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2008;60(7):805-812. doi:10.1016/j.addr.2007.11.005
  162. Kumar A, Zhang J, Yu FSX. Toll-like receptor 3 agonist poly(I:C)-induced antiviral response in human corneal epithelial cells. *Immunology*. 2006;117(1):11-21. doi:10.1111/j.1365-2567.2005.02258.x
  163. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-κB by Toll-like receptor 3. *Nature*. 2001;413(6857):732-738. doi:10.1038/35099560

164. Omagari D, Takenouchi-Ohkubo N, Endo S, et al. Nuclear factor kappa B plays a pivotal role in polyinosinic-polycytidylic acid-induced expression of human  $\beta$ -defensin 2 in intestinal epithelial cells: HBD-2 induction in epithelial cells. *Clinical & Experimental Immunology*. 2011;165(1):85-93. doi:10.1111/j.1365-2249.2011.04404.x
165. Cheng L, Zhang Z, Li G, et al. Human innate responses and adjuvant activity of TLR ligands in vivo in mice reconstituted with a human immune system. *Vaccine*. 2017;35(45):6143-6153. doi:10.1016/j.vaccine.2017.09.052
166. MacPherson C, Audy J, Mathieu O, Tompkins TA. Multistrain Probiotic Modulation of Intestinal Epithelial Cells' Immune Response to a Double-Stranded RNA Ligand, Poly(I:C). *Appl Environ Microbiol*. 2014;80(5):1692-1700. doi:10.1128/AEM.03411-13
167. Lee BR, Jeong SK, Ahn BC, et al. Combination of TLR1/2 and TLR3 ligands enhances CD4+ T cell longevity and antibody responses by modulating type I IFN production. *Sci Rep*. 2016;6(1):32526. doi:10.1038/srep32526
168. Pérez-Girón JV, Belicha-Villanueva A, Hassan E, et al. Mucosal Polyinosinic-Polycytidylic Acid Improves Protection Elicited by Replicating Influenza Vaccines via Enhanced Dendritic Cell Function and T Cell Immunity. *Jl*. 2014;193(3):1324-1332. doi:10.4049/jimmunol.1400222
169. Martins KA, Bavari S, Salazar AM. Vaccine adjuvant uses of poly-IC and derivatives. *Expert Review of Vaccines*. 2015;14(3):447-459. doi:10.1586/14760584.2015.966085
170. Fortier ME, Kent S, Ashdown H, Poole S, Boksa P, Luheshi GN. The viral mimic, polyinosinic:polycytidylic acid, induces fever in rats via an interleukin-1-dependent mechanism. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2004;287(4):R759-R766. doi:10.1152/ajpregu.00293.2004
171. Kasamatsu J, Takahashi S, Azuma M, et al. PolyI:C and mouse survivin artificially embedding human 2B peptide induce a CD4+ T cell response to autologous survivin in HLA-A\*2402 transgenic mice. *Immunobiology*. 2015;220(1):74-82. doi:10.1016/j.imbio.2014.08.017
172. Wu Y, Huang W, Chen L, et al. Anti-tumor outcome evaluation against non-small cell lung cancer in vitro and in vivo using PolyI:C as nucleic acid therapeutic agent. :19.
173. Sultan H, Wu J, Kumai T, Salazar AM, Celis E. Role of MDA5 and interferon-I in dendritic cells for T cell expansion by anti-tumor peptide vaccines in mice. *Cancer Immunol Immunother*. 2018;67(7):1091-1103. doi:10.1007/s00262-018-2164-6
174. Sultan H, Wu J, Fesenkova VI, et al. Poly-IC enhances the effectiveness of cancer immunotherapy by promoting T cell tumor infiltration. *J Immunother Cancer*. 2020;8(2):e001224. doi:10.1136/jitc-2020-001224
175. Bianchi F, Pretto S, Tagliabue E, Balsari A, Sfondrini L. Exploiting poly(I:C) to induce cancer cell apoptosis. *Cancer Biology & Therapy*. 2017;18(10):747-756. doi:10.1080/15384047.2017.1373220
176. Takemura R, Takaki H, Okada S, et al. PolyI:C-Induced, TLR3/RIP3-Dependent Necroptosis Backs Up Immune Effector-Mediated Tumor Elimination In Vivo. *Cancer Immunol Res*. 2015;3(8):902-914. doi:10.1158/2326-6066.CIR-14-0219

177. Taura M, Fukuda R, Suico MA, et al. TLR3 induction by anticancer drugs potentiates poly I:C-induced tumor cell apoptosis. *Cancer Science*. 2010;101(7):1610-1617. doi:10.1111/j.1349-7006.2010.01567.x
178. Mehrotra S, Britten CD, Chin S, et al. Vaccination with poly(IC:LC) and peptide-pulsed autologous dendritic cells in patients with pancreatic cancer. *J Hematol Oncol*. 2017;10(1):82. doi:10.1186/s13045-017-0459-2
179. Bou-Hanna C, Jarry A, Mosnier JF, Bossard C, Laboisie CL. The double stranded RNA analog poly-Ic elicits both robust IFN- $\lambda$  production and oncolytic activity in human gastrointestinal. :14.
180. Martín-Lorenzo A, Auer F, Chan LN, et al. Loss of Pax5 Exploits Sca1-BCR-ABL p190 Susceptibility to Confer the Metabolic Shift Essential for pB-ALL. *Cancer Res*. 2018;78(10):2669-2679. doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-3262
181. Amir A, McDonald D, Navas-Molina JA, et al. Deblur Rapidly Resolves Single-Nucleotide Community Sequence Patterns. Gilbert JA, ed. *mSystems*. 2017;2(2). doi:10.1128/mSystems.00191-16
182. Vázquez-Baeza Y, Pirrung M, Gonzalez A, Knight R. EMPERor: a tool for visualizing high-throughput microbial community data. *GigaSci*. 2013;2(1):16. doi:10.1186/2047-217X-2-16
183. Laukens D, Brinkman BM, Raes J, De Vos M, Vandenaabeele P. Heterogeneity of the gut microbiome in mice: guidelines for optimizing experimental design. Normark BH, ed. *FEMS Microbiology Reviews*. 2016;40(1):117-132. doi:10.1093/femsre/fuv036
184. Belkaid Y, Hand TW. Role of the Microbiota in Immunity and Inflammation. *Cell*. 2014;157(1):121-141. doi:10.1016/j.cell.2014.03.011
185. Faith JJ, Ahern PP, Ridaura VK, Cheng J, Gordon JI. Identifying Gut Microbe–Host Phenotype Relationships Using Combinatorial Communities in Gnotobiotic Mice. *Sci Transl Med*. 2014;6(220). doi:10.1126/scitranslmed.3008051
186. Josefsson KS, Baldrige MT, Kadmon CS, King KY. Antibiotics impair murine hematopoiesis by depleting the intestinal microbiota. *Blood*. 2017;129(6):729-739. doi:10.1182/blood-2016-03-708594
187. Mao K, Baptista AP, Tamoutounour S, et al. Innate and adaptive lymphocytes sequentially shape the gut microbiota and lipid metabolism. *Nature*. 2018;554(7691):255-259. doi:10.1038/nature25437
188. Rooks MG, Garrett WS. Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(6):341-352. doi:10.1038/nri.2016.42
189. Sefik E, Geva-Zatorsky N, Oh S, et al. Individual intestinal symbionts induce a distinct population of ROR $\gamma$  + regulatory T cells. *Science*. 2015;349(6251):993-997. doi:10.1126/science.aaa9420
190. Tanoue T, Morita S, Plichta DR, et al. A defined commensal consortium elicits CD8 T cells and anti-cancer immunity. *Nature*. 2019;565(7741):600-605. doi:10.1038/s41586-019-0878-z
191. Jiang L, Amir A, Morton JT, Heller R, Arias-Castro E, Knight R. Discrete False-Discovery Rate Improves Identification of Differentially Abundant Microbes. Neufeld JD, ed. *mSystems*. 2017;2(6):e00092-17. doi:10.1128/mSystems.00092-17

## BIBLIOGRAFÍA

---

192. Ho, Tin Kam. Random Decision Forests. Proceedings of the Third International Conference on Document Analysis and Recognition: August 14 - 16, 1995, Montréal, Canada. *IEEE Computer Society*. 1995;1:278--282.
193. Knights D, Kuczynski J, Charlson ES, et al. Bayesian community-wide culture-independent microbial source tracking. *Nat Methods*. 2011;8(9):761-763. doi:10.1038/nmeth.1650
194. Cording S, Fleissner D, Heimesaat MM, et al. Commensal microbiota drive proliferation of conventional and Foxp3 + Regulatory CD4 + T cells in mesenteric lymph nodes and Peyer's patches. *European Journal of Microbiology and Immunology*. 2013;3(1):1-10. doi:10.1556/EuJMI.3.2013.1.1
195. Chen X, Williams WV, Sandor V, Yeleswaram S. Population Pharmacokinetic Analysis of Orally-Administered Ruxolitinib (INCB018424 Phosphate) in Patients With Primary Myelofibrosis (PMF), Post-Polycythemia Vera Myelofibrosis (PPV-MF) or Post-Essential Thrombocythemia Myelofibrosis (PET MF): The Journal of Clinical Pharmacology. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 2013;53(7):721-730. doi:10.1002/jcph.102
196. Wu SC, Li LS, Kopp N, et al. Activity of the Type II JAK2 Inhibitor CHZ868 in B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell*. 2015;28(1):29-41. doi:10.1016/j.ccell.2015.06.005
197. Das R, Guan P, Sprague L, et al. Janus kinase inhibition lessens inflammation and ameliorates disease in murine models of hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood*. 2016;127(13):1666-1675. doi:10.1182/blood-2015-12-684399
198. Kubovcakova L, Lundberg P, Grisouard J, et al. Differential effects of hydroxyurea and INC424 on mutant allele burden and myeloproliferative phenotype in a JAK2-V617F polycythemia vera mouse model. *Blood*. 2013;121(7):1188-1199. doi:10.1182/blood-2012-03-415646
199. Jagasia M, Perales MA, Schroeder MA, et al. Ruxolitinib for the treatment of steroid-refractory acute GVHD (REACH1): a multicenter, open-label phase 2 trial. *Blood*. 2020;135(20):1739-1749. doi:10.1182/blood.2020004823
200. Søegaard SH, Rostgaard K, Skogstrand K, Wiemels JL, Schmiegelow K, Hjalgrim H. Neonatal Inflammatory Markers Are Associated with Childhood B-cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Res*. 2018;78(18):5458-5463. doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-0831
201. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, et al. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005;102(43):15545-15550. doi:10.1073/pnas.0506580102
202. Isidro-Hernández M, Mayado A, Casado-García A, et al. Inhibition of inflammatory signaling in Pax5 mutant cells mitigates B-cell leukemogenesis. *Sci Rep*. 2020;10(1):19189. doi:10.1038/s41598-020-76206-y
203. Hobeika E, Thiemann S, Storch B, et al. Testing gene function early in the B cell lineage in mb1-cre mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(37):13789-13794. doi:10.1073/pnas.0605944103
204. Poore GD, Kopylova E, Zhu Q, et al. Microbiome analyses of blood and tissues suggest cancer diagnostic approach. *Nature*. 2020;579(7800):567-574. doi:10.1038/s41586-020-2095-1

205. Parker BJ, Wearsch PA, Veloo ACM, Rodriguez-Palacios A. The Genus *Alistipes*: Gut Bacteria With Emerging Implications to Inflammation, Cancer, and Mental Health. *Front Immunol.* 2020;11:906. doi:10.3389/fimmu.2020.00906
206. Moschen AR, Gerner RR, Wang J, et al. Lipocalin 2 Protects from Inflammation and Tumorigenesis Associated with Gut Microbiota Alterations. *Cell Host & Microbe.* 2016;19(4):455-469. doi:10.1016/j.chom.2016.03.007
207. Routy B, Chatelier EL, Derosa L, et al. Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors. *Science.* 2018;359(6371):91-97. doi:10.1126/science.aan3706
208. Iida N, Dzutsev A, Stewart CA, et al. Commensal Bacteria Control Cancer Response to Therapy by Modulating the Tumor Microenvironment. *Science.* 2013;342(6161):967-970. doi:10.1126/science.1240527
209. Vétizou M, Pitt JM, Daillère R, et al. Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. *Science.* 2015;350(6264):1079-1084. doi:10.1126/science.aad1329
210. Linet MS, Brown LM, Mbulaiteye SM, et al. International long-term trends and recent patterns in the incidence of leukemias and lymphomas among children and adolescents ages 0-19 years. *Int J Cancer.* 2016;138(8):1862-1874. doi:10.1002/ijc.29924
211. Steliarova-Foucher E, Fidler MM, Colombet M, et al. Changing geographical patterns and trends in cancer incidence in children and adolescents in Europe, 1991–2010 (Automated Childhood Cancer Information System): a population-based study. *The Lancet Oncology.* 2018;19(9):1159-1169. doi:10.1016/S1473-2045(18)30423-6
212. Steliarova-Foucher E, Colombet M, Ries LAG, et al. International incidence of childhood cancer, 2001–10: a population-based registry study. *The Lancet Oncology.* 2017;18(6):719-731. doi:10.1016/S1473-2045(17)30186-9
213. Steliarova-Foucher E, Stiller C, Kaatsch P, Berrino F, Coebergh JW. Trends in childhood cancer incidence in Europe, 1970-99. *Lancet.* 2005;365(9477):2088. doi:10.1016/S0140-6736(05)66728-1
214. Barrington-Trimis JL, Cockburn M, Metayer C, Gauderman WJ, Wiemels J, McKean-Cowdin R. Trends in childhood leukemia incidence over two decades from 1992 to 2013. *Int J Cancer.* 2017;140(5):1000-1008. doi:10.1002/ijc.30487
215. Shah A, Coleman MP. Increasing incidence of childhood leukaemia: a controversy re-examined. *Br J Cancer.* 2007;97(7):1009-1012. doi:10.1038/sj.bjc.6603946
216. Spix C, Eletr D, Blettner M, Kaatsch P. Temporal trends in the incidence rate of childhood cancer in Germany 1987-2004. *Int J Cancer.* 2008;122(8):1859-1867. doi:10.1002/ijc.23281
217. Gasparri AJ, Wang B, Sun X, et al. Persistent metagenomic signatures of early-life hospitalization and antibiotic treatment in the infant gut microbiota and resistome. *Nat Microbiol.* 2019;4(12):2285-2297. doi:10.1038/s41564-019-0550-2
218. Cobaleda C, Vicente-Dueñas C, Sánchez-García I. An immune window of opportunity to prevent childhood B cell leukemia. *Trends in Immunology.* 2021;42(5):371-374. doi:10.1016/j.it.2021.03.004

## BIBLIOGRAFÍA

---

219. Fischer U, Yang JJ, Ikawa T, et al. Cell Fate Decisions: The Role of Transcription Factors in Early B-cell Development and Leukemia. *Blood cancer discovery*. 2020;1 3:224-233.
220. Vicente-Dueñas C, Hauer J, Cobaleda C, Borkhardt A, Sánchez-García I. Epigenetic Priming in Cancer Initiation. *Trends Cancer*. 2018;4(6):408-417. doi:10.1016/j.trecan.2018.04.007
221. Miles C, Sanchez MJ, Sinclair A, Dzierzak E. Expression of the Ly-6E.1 (Sca-1) transgene in adult hematopoietic stem cells and the developing mouse embryo. :11.
222. Barupal DK, Zhang Y, Shen T, et al. A Comprehensive Plasma Metabolomics Dataset for a Cohort of Mouse Knockouts within the International Mouse Phenotyping Consortium. *Metabolites*. 2019;9(5). doi:10.3390/metabo9050101
223. Gu J, Weber K, Klemp E, et al. Identifying core features of adaptive metabolic mechanisms for chronic heat stress attenuation contributing to systems robustness. *Integrative Biology*. 2012;4(5):480-493. doi:10.1039/c2ib00109h
224. Shim SH, Lee SK, Lee DW, et al. Loss of Function of Rice Plastidic Glycolate/Glycerate Translocator 1 Impairs Photorespiration and Plant Growth. *Frontiers in Plant Science*. 2020;10. doi:10.3389/fpls.2019.01726
225. Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J*. 2012;6(8):1621-1624. doi:10.1038/ismej.2012.8
226. Gilbert JA, Jansson JK, Knight R. The Earth Microbiome project: successes and aspirations. *BMC Biol*. 2014;12(1):69. doi:10.1186/s12915-014-0069-1
227. Walters W, Hyde ER, Berg-Lyons D, et al. Improved Bacterial 16S rRNA Gene (V4 and V4-5) and Fungal Internal Transcribed Spacer Marker Gene Primers for Microbial Community Surveys. Bik H, ed. *mSystems*. 2016;1(1):e00009-15. doi:10.1128/mSystems.00009-15
228. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet journal*. 2011;17:10.:3.
229. Gonzalez A, Navas-Molina JA, Kosciolk T, et al. Qiita: rapid, web-enabled microbiome meta-analysis. *Nat Methods*. 2018;15(10):796-798. doi:10.1038/s41592-018-0141-9
230. Amir A, McDonald D, Navas-Molina JA, et al. Correcting for Microbial Blooms in Fecal Samples during Room-Temperature Shipping. Arumugam M, ed. *mSystems*. 2017;2(2):e00199-16. doi:10.1128/mSystems.00199-16
231. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol*. 2019;37(8):852-857. doi:10.1038/s41587-019-0209-9
232. Xu ZZ, Amir A, Sanders J, et al. Calour: an Interactive, Microbe-Centric Analysis Tool. Segata N, ed. *mSystems*. 2019;4(1):e00269-18. doi:10.1128/mSystems.00269-18
233. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods*. 2016;13(7):581-583. doi:10.1038/nmeth.3869

234. Callahan BJ, Wong J, Heiner C, et al. High-throughput amplicon sequencing of the full-length 16S rRNA gene with single-nucleotide resolution. *Nucleic Acids Research*. 2019;47(18):e103-e103. doi:10.1093/nar/gkz569
235. Katoh K, Standley DM. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Molecular Biology and Evolution*. 2013;30(4):772-780. doi:10.1093/molbev/mst010
236. Price MN, Dehal PS, Arkin AP. FastTree 2 – Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large Alignments. Poon AFY, ed. *PLoS ONE*. 2010;5(3):e9490. doi:10.1371/journal.pone.0009490
237. Janssen S, McDonald D, Gonzalez A, et al. Phylogenetic Placement of Exact Amplicon Sequences Improves Associations with Clinical Information. Chia N, ed. *mSystems*. 2018;3(3):e00021-18. doi:10.1128/mSystems.00021-18
238. Lozupone C, Knight R. UniFrac: a New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71(12):8228-8235. doi:10.1128/AEM.71.12.8228-8235.2005
239. Anderson MJ. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance: NON-PARAMETRIC MANOVA FOR ECOLOGY. *Austral Ecology*. 2001;26(1):32-46. doi:10.1111/j.1442-9993.2001.01070.pp.x
240. Pedregosa F, Varoquaux G, Gramfort A, et al. Scikit-learn: Machine Learning in Python. *MACHINE LEARNING IN PYTHON*:6.
241. Jones E, Oliphant T, Peterson P. *SciPy: Open Source Scientific Tools for Python*.; 2021. <http://www.scipy.org/>
242. Fisher S, Barry A, Abreu J, et al. A scalable, fully automated process for construction of sequence-ready human exome targeted capture libraries. *Genome Biol*. 2011;12(1):R1. doi:10.1186/gb-2011-12-1-r1
243. Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2010;26(5):589-595. doi:10.1093/bioinformatics/btp698
244. Li H, Handsaker B, Wysoker A, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009;25(16):2078-2079. doi:10.1093/bioinformatics/btp352
245. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2009;25(14):1754-1760. doi:10.1093/bioinformatics/btp324
246. DePristo MA, Banks E, Poplin R, et al. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat Genet*. 2011;43(5):491-498. doi:10.1038/ng.806
247. McLaren W, Pritchard B, Rios D, Chen Y, Flicek P, Cunningham F. Deriving the consequences of genomic variants with the Ensembl API and SNP Effect Predictor. *Bioinformatics*. 2010;26(16):2069-2070. doi:10.1093/bioinformatics/btq330
248. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 2010;7(4):248-249. doi:10.1038/nmeth0410-248
249. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc*. 2009;4(7):1073-1081. doi:10.1038/nprot.2009.86

## BIBLIOGRAFÍA

---

250. Cibulskis K, Lawrence MS, Carter SL, et al. Sensitive detection of somatic point mutations in impure and heterogeneous cancer samples. *Nat Biotechnol.* 2013;31(3):213-219. doi:10.1038/nbt.2514
251. Koboldt DC, Zhang Q, Larson DE, et al. VarScan 2: Somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Res.* 2012;22(3):568-576. doi:10.1101/gr.129684.111
252. Forbes SA, Beare D, Gunasekaran P, et al. COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer. *Nucleic Acids Research.* 2015;43(D1):D805-D811. doi:10.1093/nar/gku1075
253. Smedley D, Haider S, Durinck S, et al. The BioMart community portal: an innovative alternative to large, centralized data repositories. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(W1):W589-W598. doi:10.1093/nar/gkv350
254. Larson DE, Harris CC, Chen K, et al. SomaticSniper: identification of somatic point mutations in whole genome sequencing data. *Bioinformatics.* 2012;28(3):311-317. doi:10.1093/bioinformatics/btr665
255. Fan Y, Xi L, Hughes DST, et al. MuSE: accounting for tumor heterogeneity using a sample-specific error model improves sensitivity and specificity in mutation calling from sequencing data. *Genome Biol.* 2016;17(1):178. doi:10.1186/s13059-016-1029-6
256. Kim S, Scheffler K, Halpern AL, et al. *Strelka2: Fast and Accurate Variant Calling for Clinical Sequencing Applications.* Bioinformatics; 2017. doi:10.1101/192872
257. Talevich E, Shain AH, Botton T, Bastian BC. CNVkit: Genome-Wide Copy Number Detection and Visualization from Targeted DNA Sequencing. *PLoS Comput Biol.* 2016;12(4):e1004873. doi:10.1371/journal.pcbi.1004873
258. Rausch T, Zichner T, Schlattl A, Stutz AM, Benes V, Korbel JO. DELLY: structural variant discovery by integrated paired-end and split-read analysis. *Bioinformatics.* 2012;28(18):i333-i339. doi:10.1093/bioinformatics/bts378
259. Layer RM, Chiang C, Quinlan AR, Hall IM. LUMPY: a probabilistic framework for structural variant discovery. *Genome Biol.* 2014;15(6):R84. doi:10.1186/gb-2014-15-6-r84
260. Chen X, Schulz-Trieglaff O, Shaw R, et al. Manta: rapid detection of structural variants and indels for germline and cancer sequencing applications. *Bioinformatics.* 2016;32(8):1220-1222. doi:10.1093/bioinformatics/btv710
261. Cameron DL, Schröder J, Penington JS, et al. GRIDSS: sensitive and specific genomic rearrangement detection using positional de Bruijn graph assembly. *Genome Res.* 2017;27(12):2050-2060. doi:10.1101/gr.222109.117
262. Jeffares D. Transient structural variations have strong effects on quantitative traits and reproductive isolation in fission yeast. :51.
263. Chiang C, Layer RM, Faust GG, et al. SpeedSeq: ultra-fast personal genome analysis and interpretation. *Nat Methods.* 2015;12(10):966-968. doi:10.1038/nmeth.3505
264. Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics.* 2003;19(2):185-193.

- doi:10.1093/bioinformatics/19.2.185
265. Irizarry RA. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Research*. 2003;31(4):15e-115. doi:10.1093/nar/gng015
266. Irizarry RA. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*. 2003;4(2):249-264. doi:10.1093/biostatistics/4.2.249
267. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98(9):5116-5121. doi:10.1073/pnas.091062498
268. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal statistical society: series B (Methodological)*. 1995;57(1):289-300.
269. R Core Team (2018). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available Online at <https://www.R-project.org/>.
270. Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, et al. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biology*. Published online 2004:16.
271. Edgar R. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Research*. 2002;30(1):207-210. doi:10.1093/nar/30.1.207
272. Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, et al. PGC-1 $\alpha$ -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet*. 2003;34(3):267-273. doi:10.1038/ng1180
273. Liberzon A, Birger C, Thorvaldsdóttir H, Ghandi M, Mesirov JP, Tamayo P. The Molecular Signatures Database (MSigDB) hallmark gene set collection. *Cell Syst*. 2015;1(6):417-425. doi:10.1016/j.cels.2015.12.004
274. Chiaretti S, Li X, Gentleman R, et al. Gene Expression Profiles of B-lineage Adult Acute Lymphocytic Leukemia Reveal Genetic Patterns that Identify Lineage Derivation and Distinct Mechanisms of Transformation. *Clin Cancer Res*. 2005;11(20):7209-7219. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-2165
275. Kohlmann A, Schoch C, Schnittger S, et al. Pediatric acute lymphoblastic leukemia (ALL) gene expression signatures classify an independent cohort of adult ALL patients. *Leukemia*. 2004;18(1):63-71. doi:10.1038/sj.leu.2403167

