







**VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA**



**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**DOCTORADO EN FISIOPATOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA**

---

**NOX2 Y SU EFECTO SOBRE EL  
METABOLISMO, NUEVAS  
DIANAS PARA EL PRONÓSTICO  
Y TRATAMIENTO DE LA  
LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA**

**NOX2 AND ITS EFFECT ON METABOLISM, NEW  
TARGETS FOR PROGNOSIS AND TREATMENT OF  
ACUTE MYELOID LEUKEMIA**

---

**Carla Ijurko Valeta**

**Salamanca, 2023**





VNIVERSIDAD  
D SALAMANCA



D. **ÁNGEL HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ**, Catedrático de Universidad del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca,

CERTIFICA:

Que la presente Memoria de Tesis Doctoral titulada, **“NOX2 y su efecto sobre el metabolismo, nuevas dianas para el pronóstico y tratamientos de la leucemia mieloide aguda”**, presentada por **Dña. Carla Ijurko Valeta** para optar al Grado de Doctor en Fisiopatología y Farmacología, ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca.

Considerando que la Tesis Doctoral se halla concluida, autorizo su presentación para que sea evaluada por el Tribunal correspondiente.

Y, para que así conste, firmo el presente documento en Salamanca, a 6 de febrero de 2023.

Fdo. Ángel Hernández Hernández





VNIVERSIDAD  
D SALAMANCA



**D. CARLA IJURKO VALETA**, Graduada en Biotecnología y Máster en Biología y Clínica del Cáncer por la Universidad de Salamanca,

DECLARA:

Que es autora de la presente Memoria de Tesis Doctoral titulada, **“NOX2 y su efecto sobre el metabolismo, nuevas dianas para el pronóstico y tratamientos de la leucemia mieloide aguda”**, realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca bajo la dirección del Profesor **Dr. Ángel Hernández Hernández**.

Y, para que así conste, firmo el presente documento en Salamanca, a 6 de febrero de 2023.

Fdo. Carla Ijurko Valeta





## **NOTA PRELIMINAR**

El trabajo de investigación detallado en el presente manuscrito ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad, en base al proyecto “Estudio de la regulación de la hematopoyesis y del metabolismo de las células leucémicas mediante señalización redox” (BFU2014-56490-R); por la Fundación Ramón Areces, en base al proyecto “NADPH oxidasas y regulación del metabolismo intermediario de las células leucémicas: búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas” (CIV17A2822); por la Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León con cofinanciación del Fondo Europeo de Desarrollo Regional, en base al proyecto “Regulación del metabolismo por NADPH oxidasas en leucemias mieloides” (SAP077P20); por el Ministerio de Ciencia e Innovación, en base al proyecto “NADPH oxidasas, metabolismo y señalización redox en leucemias mieloides” (PID2020-117692RB-I00).

Durante la realización de este trabajo, la autora ha sido financiada con una de las ayudas destinadas a financiar la contratación predoctoral de personal investigador de la Junta de Castilla y León cofinanciadas por el Fondo Social Europeo (ORDEN EDU/1100/2017, de 12 de diciembre de 2017) y con una ayuda de movilidad para estancias en centros extranjeros para estudiantes de doctorado de la Universidad de Salamanca 2022, para una estancia de tres meses en el *Institute of Biology and Pathology CHU* de Grenoble Alpes (Francia).



# **CONTRIBUCIÓN CIENTÍFICA**

## **ARTÍCULOS:**

Marta Romo González; **Carla Ijurko**; María Teresa Alonso; Marta Gómez de Cedrón; Ana Ramirez de Molina; María Eugenia Soriano; Ángel Hernández Hernández. **NOX2 and NOX4 control mitochondrial function in chronic myeloid leukaemia.** *Free Radical Biology and Medicine*. En revisión.

Marta Romo González\*; **Carla Ijurko**\*; Ángel Hernández Hernández. 2022. **Reactive oxygen species and metabolism in leukemia: a dangerous liaison.** *Frontiers of Immunology* 9;13:889875.

**Carla Ijurko**; Nerea González García; Purificación Galindo Villardón; Ángel Hernández Hernández. 2022. **A 29-gene signature associated with NOX2 discriminates acute myeloid leukemia prognosis and survival.** *American Journal of Hematology* 97(4):448-457.

Alejandro Pérez Fernández; Guillermo López Ruano; Rodrigo Prieto Bermejo; **Carla Ijurko**; María Díez Campelo; Fermín Sánchez Guijo; Ángel Hernández Hernández. 2019. **SHP1 and SHP2 inhibition enhances the pro-differentiative effect of phorbol esters: an alternative approach against acute myeloid leukemia.** *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 38:80.

Rodrigo Prieto Bermejo; Marta Romo González; Alejandro Pérez Fernández; **Carla Ijurko**; Ángel Hernández Hernández. 2018. **Reactive oxygen species in haematopoiesis: leukaemic cells take a walk on the wild side.** *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 37:125.

## **POSTERS:**

**Carla Ijurko**; Nerea González García; Purificación Galindo Villardón; Ángel Hernández Hernández. **A 29G-gene signature associated with NOX2 discriminates acute myeloid leukemia prognosis and survival.** Cancer Metabolism EACR Conference. EACR 2022. España.

**Carla Ijurko**; Nerea González García; Purificación Galindo Villardón; Ángel Hernández Hernández. **NOX2 is involved in acute myeloid leukemia prognosis and survival**

**discrimination.** 43rd Annual Meeting of Spanish Society of Biochemistry and Biomolecular Biology. SEBBM. 2021. España.

**Carla Ijurko**; Marta Romo González; Fermín Sánchez Guijo; Ángel Hernández Hernández. **Delving into connection of LDH-B and mitochondria as an alternative AML treatment.** ISCaM 6th Annual Meeting Braga. ISCaM. 2019. Portugal.

Marta Romo González; Marta Gómez de Cedrón; **Carla Ijurko**; Ángel Hernández Hernández. **NADPH oxidases and Warburg effect in Chronic Myeloid Leukemia: a history of metabolic addiction.** ISCaM 6th Annual Meeting Braga. ISCaM. 2019. Portugal.

**Carla Ijurko**; Marta Romo González; Fermín Sánchez Guijo; Ángel Hernández Hernández. **Delving into connection of LDH-B and mitochondria as an alternative AML treatment.** 42nd Congress of the Spanish Society of Biochemistry and Molecular Biology. SEBBM. 2019. España.

Alejandro Pérez Fernández; Guillermo López Ruano; Rodrigo Prieto Bermejo; **Carla Ijurko**; María Díez Campelo; Fermín Sánchez Guijo; Ángel Hernández Hernández. **Dual inhibition of SHP1 and SHP2 potentiates the differentiation and impairs the proliferation of acute myeloid leukemia cells.** 42nd Congress of the Spanish Society of Biochemistry and Molecular Biology. SEBBM. 2019. España.

Marta Romo González; Marta Gómez de Cedrón; **Carla Ijurko**; Ángel Hernández Hernández. **NADPH oxidases and Warburg effect in Chronic Myeloid Leukemia: a history of metabolic addiction.** 42nd Congress of the Spanish Society of Biochemistry and Molecular Biology. SEBBM. 2019. España.

**Carla Ijurko**; Marta Romo González; Beatriz Sánchez Sánchez; Ángel Hernández Hernández. **Effect of different NADPH oxidases inhibitors on acute and chronic myeloid leukemia cell lines.** FEBS3+ 1st Joint Meeting of the French-Portuguese-Spanish Biochemical and Molecular Biology Societies. SEBBM, SFBBM, SPB. 2017. España.

**Carla Ijurko**; Marta Romo González; Alejandro Perez Fernández; Rodrigo Prieto Bermejo; Ángel Hernández Hernández. **Effect of metabolic enzyme inhibitors in proliferation and viability of leukemic cells lines.** Redox Regulation of Metabolic Processes Advanced Course. FEBS. 2016. Grecia.

Marta Romo González; **Carla Ijurko**; Alejandro Perez Fernández; Rodrigo Prieto Bermejo; Ángel Hernández Hernández. **NADPH oxidases as therapeutic target in acute myeloid leukemia.** Redox Regulation of Metabolic Processes Advanced Course. FEBS. 2016. Grecia.

**Carla Ijurko**; Marta Romo Gonzalez; Ángel Hernández Hernández. **Análisis del efecto de inhibidores de enzimas metabólicas sobre la proliferación y viabilidad de una línea celular modelo de leucemia mieloide aguda.** XXXIX Congreso de la SEBBM. SEBBM. 2016. España.

Marta Romo González; **Carla Ijurko**; Rodrigo Prieto Bermejo; Alejandro Perez Fernández; Ángel Hernández Hernández. **NADPH oxidases como reguladoras del metabolismo intermediario en leucemia mieloide crónica.** XXXIX Congreso de la SEBBM. SEBBM. 2016. España.

Alejandro Perez Fernández; Rodrigo Prieto Bermejo; Marta Romo González; **Carla Ijurko**; Ángel Hernández Hernández.  **$\beta$ -catenina y PTP-BL están implicadas en la regulación de la quiescencia de las HSC por parte de las células mesenquimales del estroma.** XXXIX Congreso de la SEBBM. SEBBM. 2016. España.

Rodrigo Prieto Bermejo; Guillermo Lopez Ruano; Alejandro Perez Fernández; Marta Romo González; **Carla Ijurko**; Ángel Hernández Hernández. **Análisis de la función de NADPH oxidases en hematopoyesis in vivo mediante ARNi frente a p22phox.** XXXIX Congreso de la SEBBM. SEBBM. 2016. España.



## TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE TABLAS.....	IV
LISTA DE FIGURAS.....	V
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VIII
RESUMEN/ABSTRACT.....	XI

## INTRODUCCIÓN

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Leucemia mieloide aguda .....</b>	<b>1</b>
1.1.1. Origen de la leucemia mieloide aguda.....	2
1.1.2. Diagnóstico de la leucemia mieloide aguda.....	4
1.1.3. Clasificación y pronóstico.....	5
1.1.4. Tratamiento de la leucemia mieloide aguda .....	11
<b>1.2. El metabolismo, una diana incipiente frente a la leucemia mieloide aguda .....</b>	<b>16</b>
1.2.1. Glucólisis .....	17
1.2.2. Ciclo de los ácidos tricarboxílicos .....	19
1.2.3. Otras fuentes de energía distintas a la glucosa.....	20
1.2.4. Fosforilación oxidativa .....	21
<b>1.3. Metabolismo en leucemia mieloide aguda.....</b>	<b>22</b>
1.3.1. Células madre hematopoyéticas.....	23
1.3.2. Células madre leucémicas (LSC).....	24
1.3.3. Masa de células leucémicas .....	25
<b>1.4. Especies reactivas del oxígeno, ¿consecuencias del metabolismo o un mecanismo celular independiente? .....</b>	<b>27</b>
1.4.1. Especies reactivas del oxígeno.....	27
1.4.2. Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasas.....	29
1.4.3. Las especies reactivas del oxígeno están implicadas en señalización celular ....	32
1.4.4. Sistemas antioxidantes .....	35
1.4.5. Sistema glutation.....	37
1.4.6. Especies reactivas del oxígeno en hematopoyesis y leucemogénesis .....	39
<b>1.5. Especies reactivas del oxígeno y metabolismo .....</b>	<b>41</b>
1.5.1. Especies reactivas del oxígeno y metabolismo en leucemia mieloide aguda ....	42
1.5.2. Especies reactivas del oxígeno y metabolismo como estrategias terapéuticas en leucemia mieloide aguda.....	43

## OBJETIVOS

<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>45</b>
--------------------------	-----------

## MATERIALES Y MÉTODOS

<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>47</b>
<b>3.1. Materiales .....</b>	<b>47</b>
3.1.1. Equipamiento .....	47
3.1.2. Soluciones de trabajo .....	50

3.1.3. Fármacos .....	52
3.1.4. Material biológico .....	52
<b>3.2. Métodos experimentales .....</b>	<b>59</b>
3.2.1. Cultivos celulares .....	59
3.2.2. Aislamiento de células mononucleadas de paciente diagnosticados con leucemia mieloide aguda por gradiente de ficoll.....	59
3.2.3. Cuantificación de la proliferación celular .....	60
3.2.4. Cuantificación de la viabilidad celular.....	62
3.2.5. Ensayos de colonias .....	63
3.2.6. Ensayos de diferenciación celular.....	64
3.2.7. Análisis de la expresión génica.....	65
3.2.8. Análisis de la expresión proteica .....	67
3.2.9. Silenciamiento lentiviral .....	69
3.2.10. Generación de líneas celulares deficientes en <i>CYBB</i> mediante la herramienta CRISPR-CAS9.....	74
3.2.11. Cuantificación de las especies reactivas del oxígeno.....	78
3.2.12. Evaluación del estado oxidativo de la célula .....	81
3.2.13. Análisis metabólico mediante la herramienta Seahorse .....	82
3.2.14. Determinación de la actividad de los complejos I, II y IV.....	84
3.2.15. Determinación del potencial de membrana.....	85
3.2.16. Análisis metabolómicos .....	86
3.2.17. Modelo <i>in vivo</i> de leucemia mieloide aguda.....	87
<b>3.3. Métodos estadísticos.....</b>	<b>90</b>
3.3.1. Análisis descriptivo de los datos.....	90
3.3.2. Procesamiento de datos de expresión.....	90
3.3.3. Técnicas estadísticas para el análisis de datos de expresión .....	92
3.3.4. Procesamiento de datos metabolómicos .....	95
3.3.5. Técnicas de estadísticas para el análisis de datos metabólicos .....	95

## **RESULTADOS**

---

<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>97</b>
<b>4.1. Estudiar el papel de NOX2 en el metabolismo de la leucemia mieloide aguda .</b>	<b>97</b>
4.1.1. Comparación del metabolismo de líneas celulares con diferente expresión de NOX2 .....	98
4.1.2. Efecto del silenciamiento de NOX2 sobre el metabolismo de líneas celulares leucémicas.....	99
4.1.3. Análisis del metabolismo celular al eliminar la expresión de NOX2 por CRISPR-CAS9 .....	103
4.1.4. Estudio metabolómico del efecto de la delección de NOX2 sobre la línea celular modelo de leucemia mieloide aguda THP-1 .....	107
4.1.5. Estudio del estado oxidativo de las células THP-1 con la delección de NOX2. 116	
4.1.6. Análisis de las vías de señalización implicadas en la regulación metabólica ejercida por NOX2.....	119
4.1.7. Discusión 1: NOX2, metabolismo y estrés oxidativo: tres procesos celulares con un punto de encuentro en LMA .....	124
<b>4.2. NOX2 y metabolismo como dianas terapéuticas de la leucemia mieloide aguda.....</b>	<b>130</b>
4.2.1. Efecto de los tratamientos combinados de inhibidores de las NADPH oxidasas e inhibidores del metabolismo de la glucosa sobre líneas celulares de leucemia mieloide aguda .....	131



4.2.2. Efecto de los tratamientos combinados sobre células de médula ósea de pacientes de leucemia mieloide aguda recién diagnosticados .....	142
4.2.3. Efecto de los tratamientos combinados sobre células de médula ósea de individuos sanos.....	144
4.2.4. Efecto de la combinación de inhibidores de NADPH oxidasas e inhibidores del metabolismo de la glucosa con citarabina y daunorubicina.....	146
4.2.5. Analizar la efectividad de los tratamientos <i>in vivo</i> en modelos animales .....	149
4.2.6. Estudio del mecanismo de acción de la terapia combinada de inhibición de las NOX e inhibición de la lactato deshidrogenasa.....	151
4.2.7. Evaluación de las especies reactivas del oxígeno generadas al tratar las células THP-1 <sup>NOX2/KO</sup> con citarabina y oxamato .....	162
4.2.8. Discusión 2: La terapia combinada de inhibidor de NOX2+Ara-C+Ox es eficaz frente a la leucemia mieloide aguda.....	164
<b>4.3. NOX2 y metabolismo como factores pronósticos en LMA.....</b>	<b>172</b>
4.3.1. <i>CYBB</i> está regulado a la baja en pacientes con leucemia mieloide aguda y se correlaciona con la clasificación FAB, así como con las mutaciones <i>IDH1</i> , <i>IDH2</i> , <i>RUNX1</i> , <i>FLT3TKD</i> y <i>N-Ras</i> .....	173
4.3.2. Hay 28 genes metabólicos que muestran una expresión vinculada con <i>CYBB</i> en pacientes con leucemia mieloide aguda.....	175
4.3.3. Los 29 genes correlacionados constituyen una firma con capacidad pronóstica para la leucemia mieloide aguda.....	178
4.3.4. Validación de la eficacia de 29G para la determinación del pronóstico de pacientes de leucemia mieloide aguda.....	180
4.3.5. Un bajo índice de expresión de 29G está relacionado con una mayor supervivencia .....	183
4.3.6. 29G complementa a la clasificación pronóstica ELN.....	187
4.3.7. Discusión 3: NOX2 y el metabolismo como herramientas pronósticas de la leucemia mieloide aguda.....	190
<b>4.4. Discusión final: La regulación metabólica ejercida por NOX2 en la LMA como herramienta pronóstica y terapéutica .....</b>	<b>194</b>

## **CONCLUSIONES/CONCLUSIONS**

---

<b>5. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS .....</b>	<b>196</b>
--	------------

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

<b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>199</b>
-----------------------------	------------



## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Grupos de clasificación FAB de LMA y frecuencia de diagnóstico de cada uno de los grupos. ....	6
Tabla 2. Clasificación pronóstica de la ELN 2022 .....	7
Tabla 3. Mutaciones recurrentes de LMA y sus implicaciones funcionales. ....	10
Tabla 4. Fármacos utilizados en esta tesis .....	52
Tabla 5. Líneas celulares utilizadas en esta tesis .....	53
Tabla 6. Principales características de las líneas celulares utilizadas en esta tesis.....	53
Tabla 7. Pacientes con LMA cuyas células mononucleadas de médula ósea han sido utilizadas en esta tesis.....	54
Tabla 8. Individuos sanos cuyas células mononucleadas de médula ósea han sido utilizadas en esta tesis.....	55
Tabla 9. Bases de datos de expresión génica que han sido utilizadas en esta tesis.....	56
Tabla 10. Oligonucleótidos utilizados para el silenciamiento de los genes estudiados. ...	56
Tabla 11. Oligonucleótidos utilizados para eliminar la expresión NOX2 mediante CRISPR-CAS9 .....	57
Tabla 12. Oligonucleótidos utilizados para PCR.....	57
Tabla 13. Anticuerpos primarios utilizados en esta tesis para western blot .....	57
Tabla 14. Anticuerpos secundarios utilizados en esta tesis para western blot .....	58
Tabla 15. Secuencias diseñadas para noquear la expresión de NOX2 mediante CRISPR-CAS9 .....	75
Tabla 16. Metabolitos identificados mediante RMN .....	109
Tabla 17. Metabolitos alterados en las comparaciones THP-1 <sup>NOX2/KO</sup> frente a THP-1 <sup>WT</sup> ...	115
Tabla 18. Efecto de la combinación de GSK2795039 con DCA u Ox sobre la viabilidad del individuo sano 16 .....	146
Tabla 19. Resultados del test de permutación y CV-ANOVA que confirman la validez y capacidad predictiva respectivamente, de cada una de las comparaciones entre grupos realizadas .....	156
Tabla 20. Metabolitos alterados en las comparaciones THP-1 <sup>NOX2/KO</sup> frente a THP-1 <sup>WT</sup> tras 16h de cultivo en presencia o no de Ox 5mM .....	158
Tabla 21. Metabolitos alterados en las comparaciones THP-1 <sup>NOX2/KO</sup> frente a THP-1 <sup>WT</sup> tras 16h de cultivo en presencia o no de Ara-C 1µM .....	160
Tabla 22. Principales funciones moleculares de 29G .....	177
Tabla 23. Comparación de porcentajes de correcta clasificación entre 29G y las firmas genéticas referenciales propuestas por Li <i>et al.</i> <sup>28</sup> y Ng <i>et al.</i> <sup>27</sup> .....	183



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Alteraciones citogenéticas y mutaciones recurrentes de pacientes adultos de LMA.....	1
Figura 2. Modelo de hematopoyesis con una estructura jerárquica en árbol.....	3
Figura 3. Abordaje clínico del diagnóstico y toma de decisión terapéutica de la LMA.....	14
Figura 4. Metabolismo de la glucosa.....	20
Figura 5. Estado redox y metabólico de las HSC frente a las LSC y las células quimiorresistentes.....	25
Figura 6. Estado redox y metabólico de las células de leucemia mieloide aguda frente a sus homólogas sanas.....	27
Figura 7. Procesos de conversión de las especies reactivas del oxígeno y nitrógeno (RONS).....	28
Figura 8. Complejo NOX2 activo.....	31
Figura 9. Sistemas antioxidantes enzimáticos.....	37
Figura 10. Mapa del vector lentiviral pLVTHM para la expresión estable de ARN de silenciamiento.....	70
Figura 11. Comprobación del silenciamiento de los genes diana en estudio.....	73
Figura 12. Comprobación de la delección producida por CRISPR-CAS9 en la población de células THP-1 nucleofectadas.....	737
Figura 13. Comprobación de la delección de CYBB mediante la estrategia CRISPR-CAS9 en la línea celular THP-1.....	78
Figura 14. La normalización RMA de la base de datos GSE15061 dio lugar a la homogeneización de la muestra.....	91
Figura 15. Comparativa de los niveles de expresión de NOX2 (CYBB) en las distintas líneas celulares modelo de LMA.....	97
Figura 16. Altos niveles de NOX2 se asocian a un menor porcentaje de ATP mitocondrial.....	99
Figura 17. La producción de ATP es mayor en las células con silenciamiento de NOX2.....	100
Figura 18. El silenciamiento de NOX2 incrementa la actividad glucolítica de las líneas celulares HL60 y MV4-11 pero no produce cambios metabólicos basales en las células THP-1.....	101
Figura 19. Análisis de los parámetros mitocondriales en las células THP-1 silenciadas para NOX2.....	102
Figura 20. La delección de NOX2 en las células THP-1 reduce OXPHOS.....	104
Figura 21. La delección de NOX2 en las células THP-1 reduce la producción de ATP a partir de fosforilación oxidativa (OXPHOS) y provoca una menor capacidad de viraje metabólico hacia la glucólisis cuando se inhibe el metabolismo mitocondrial.....	105
Figura 22. Medida de la actividad y eficiencia de los complejos I, II y IV mitocondriales.....	106
Figura 23. No hay alteración de los parámetros mitocondriales en las células THP-1 noqueadas para NOX2.....	107
Figura 24. Los resultados de los análisis multivariantes confirman que las células THP-1 <sup>NOX2/KO</sup> tienen un espectro metabólico distinto a las células THP-1 <sup>WT</sup> .....	109
Figura 25. El metabolismo se altera al eliminar la expresión de NOX2.....	111
Figura 26. Las células THP-1 en las que se ha delecionado NOX2 son más sensibles a la inhibición de la entrada lípidos y menos sensibles a la inhibición del metabolismo de la glutamina que las células THP-1 control.....	114

Figura 27. Los niveles de glutation están drásticamente disminuidos en las células THP-1 en las que se ha delecionado NOX2 .....	117
Figura 28. NRF2 se encuentra sobreexpresado en las células THP-1 en las que se ha delecionado NOX2 .....	118
Figura 29. La capacidad antioxidante de las células THP-1 en las que se ha delecionado NOX2 se encuentra reducida .....	118
Figura 30. Cuantificación de la producción de las principales ROS en las células THP-1 con deleción de <i>CYBB</i> .....	119
Figura 31. La vía de mTOR está incrementada en las células THP-1 en las que se ha delecionado NOX2 .....	120
Figura 32. GSK3 $\beta$ se inactiva e incrementan los niveles de $\beta$ -catenina al reducir los niveles de NOX2 en las células THP-1 .....	121
Figura 33. La deleción de NOX2 aumenta la fosforilación de PDH1 $\alpha$ provocando así su inactivación .....	122
Figura 34. El silenciamiento de NOX2 incrementa los niveles de expresión proteica de LDH-A y LDH-B pero la deleción por CRISPR-CAS9 no .....	123
Figura 35. La combinación de iMet y del inhibidor de NOX DPI disminuye la proliferación de líneas celulares modelo de LMA de un modo sinérgico .....	132
Figura 36. La combinación de iMet y del inhibidor de NOX DPI disminuye la proliferación de líneas celulares modelo de LMA de un modo sinérgico .....	134
Figura 37. La combinación de iMet y de otros pan-iNOX reducen la proliferación de líneas celulares modelo de LMA .....	136
Figura 38. La combinación de iMet y del inhibidor de NOX GKT137831 no es sinérgico. ....	137
Figura 39. La combinación de iMet y del inhibidor de NOX GSK2795039 disminuye la proliferación de líneas celulares modelo de LMA de un modo sinérgico .....	138
Figura 40. La combinación de DPI y FX-11 es sinérgica en las células MOLM-13 y NB4 y aditiva en las células THP-1 .....	139
Figura 41. La combinación de Ox, inhibidor de la lactato deshidrogenasa, y del inhibidor de NOX DPI activan la apoptosis de las líneas celulares de LMA MOLM-13 y THP-1 .....	140
Figura 42. La combinación de Ox, inhibidor de la lactato deshidrogenasa, y del inhibidor de NOX DPI reducen la capacidad clonogénica de las líneas celulares de LMA MOLM-13 y THP-1 .....	141
Figura 43. La combinación de Ox, inhibidor de la lactato deshidrogenasa, y del inhibidor de NOX DPI también activa la muerte celular de las líneas celulares menos sensibles al tratamiento .....	141
Figura 44. La combinación de los iMet con iNOX reduce la proliferación, viabilidad y clonogenicidad en células mononucleares procedentes de pacientes de LMA .....	143
Figura 45. Efecto de la combinación de los iMet con iNOX sobre la viabilidad de las poblaciones celulares de la sangre de individuos sanos .....	145
Figura 46. La combinación de Ox con iNOX es más efectiva en combinación con citarabina .....	147
Figura 47. La combinación de Ox con iNOX con daunorubicina no es sinérgica .....	148
Figura 48. El tratamiento con DPI y la combinación del inhhbidor de NOX DPI con Ox son eficaces alargando la supervivencia de un modelo de ratón de LMA .....	150
Figura 49. El tratamiento intraperitoneal cada 48h con la combinación del inhibidor de NOX DPI y Ox no aumenta la supervivencia en un modelo de ratón de leucemia <i>in vivo</i> .....	151
Figura 50. Sensibilidad de las líneas THP-1 silenciadas a los inhibidores químicos .....	152

Figura 51. Morfología de células THP-1 control y silenciadas para NOX2 y LDH-A.....	153
Figura 52. Sensibilidad de las líneas MOLM-13 silenciadas a los inhibidores químicos.	154
Figura 53. Sensibilidad de las líneas THP-1 en las que se ha delecionado NOX2 a los inhibidores químicos Ox y Ara-C .....	155
Figura 54. Cuantificación de la producción de las principales ROS tras el tratamiento con Ara-C u Ox de las células THP-1 en las que se ha delecionado NOX2 .....	163
Figura 55. Niveles de expresión de las subunidades del complejo NOX2 en células de médula ósea obtenidos de GSE15061 .....	173
Figura 56. La clasificación FAB y las mutaciones de <i>IDH1</i> , <i>IDH2</i> , <i>RUNX1</i> , <i>FLT3TKD</i> y <i>N-Ras</i> se asocian con bajos niveles de expresión de <i>CYBB</i> en pacientes con LMA .....	174
Figura 57. Genes expresados diferencialmente al comparar los grupos de alta y baja expresión de los genes del complejo NOX2 .....	176
Figura 58. 29G es capaz de discriminar los pacientes en base a los grupos <i>CYBB</i> .....	178
Figura 59. 29G es una firma genética correlacionada que separa a los pacientes de LMA en función del pronóstico .....	179
Figura 60. Los miembros de 29G muestran patrones de expresión correlacionados en las bases de datos de validación.....	180
Figura 61. 29G también demuestra la capacidad de separar a los pacientes de LMA en distintos grupos de pronóstico en las bases de datos de validación. ....	181
Figura 62. Algunos de los genes de 29G tienen mayor influencia sobre la determinación pronóstica de los pacientes de LMA .....	182
Figura 63. Los pacientes con un EI bajo presentan una mayor OS.....	185
Figura 64. Los pacientes con un EI bajo presentan una mayor OS también en la base de datos de validación GSE14468.....	186
Figura 65. Los grupos de LowIndex y HighIndex muestran una mayor diferencia de supervivencia en los pacientes de FAB M4 y M5.....	187
Figura 66. 29G es igualmente pronóstico en pacientes menores y mayores de 60 años.	187
Figura 67. En base a la expresión de 29G las muestras intermedias se clasifican en cuatro grupos que muestran diferencias en la OS y la EFS.....	190





## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**2-DG:** 2-desoxi-D-glucosa

**Ara-C:** citarabina

**CFU:** unidad formadora de colonias

**CI:** índice de combinación

**COL:** célula que origina la leucemia

**DCA:** dicloroacetato

**DEG:** genes diferencialmente expresados

**DPI:** *Diphenyleneiodonium*

**ECAR:** tasa de acidificación extracelular

**EFS:** supervivencia libre de eventos

**ELN:** *EuropeanLeukemia Net*

**ETC:** cadena transportadora de electrones

**FAB:** *French-American-British*

**FAO:** oxidación de ácidos grasos

**FC:** tasa de cambio

**FDA:** *Food and Drug Administration*

**FLT3-TKD:** mutaciones puntuales en *FLT3*

**FLT3-ITD:** duplicados internos en tándem en *FLT3*

**GAPDH:** gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

**GCS:**  $\gamma$ -glutamilcisteina sintetasa

**Gpx:** glutathion peroxidase

**GR:** glutathion reductasa

**Grx:** glutarredoxina

**GSH:** glutathion

**GSK:** GSK2795039

**GO:** gentuzumab-ozogamicina

**HSC:** células madre hematopoyéticas

**HCT:** trasplante de células hematopoyéticas

**HK:** hexoquinasa

**iNOX:** inhibidores de NADPH oxidasas

**iMet:** inhibidores del metabolismo de la glucosa

**IV:** intravenoso

**LDA:** análisis discriminante lineal

**LDH:** lactato deshidrogenasa

**LMA:** leucemia mieloide aguda

**LSC:** células madre leucémicas

**MDA:** malonilaldehído

**MDS:** síndrome mielodisplásico

**MOI:** multiplicidad de infección

**MPP:** células progenitoras multipotentes

**MRD:** enfermedad mínima residual

**NMR:** resonancia magnética nuclear

**NOX:** NADPH oxidasas

**OCR:** tasa de consumo de oxígeno

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**OPLS-DA:** análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales ortogonales

**OS:** supervivencia global

**Ox:** oxamato

**OXPHOS:** fosforilación oxidativa

**PCA:** análisis de componentes principales

**PDH:** piruvato deshidrogenasa

**PDK:** piruvato deshidrogenasa quinasa

**PDP:** piruvato deshidrogenasa fosfatasa

**PER:** tasa de eflujo de protones

**PFK:** fosfofructoquinasa

**PI:** yoduro de propidio

**PK:** piruvato quinasa

**PMA:** forbol 12-miristato 13-acetato

**Prx:** peroxirredoxinas

**RC:** remisión completa

**RCR:** ratio de respiración mitocondrial

**RNS:** especies reactivas del nitrógeno

**RONs:** especies reactivas del oxígeno y nitrógeno

**ROS:** especies reactivas del oxígeno

**SGLT:** transportadores de sodio-glucosa

**SOD:** superóxido dismutasa

**TBARS:** sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico

**TCA:** ácidos tricarbóxicos

**Trx:** tiorredoxinas

**WT:** modelo silvestre



## RESUMEN

La leucemia mieloide aguda (LMA) es la leucemia más diagnosticada en adultos. Su abordaje clínico es complejo debido, principalmente, a su gran heterogeneidad. Esto ha ocasionado que durante más de 50 años apenas se hayan introducido mejoras en su diagnóstico y tratamiento. Sin embargo, la revolución de las ciencias ómicas ha provocado que en los últimos 4 años el protocolo médico de diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la enfermedad se haya visto notablemente modificado. La reciente inclusión de varias mutaciones en la determinación pronóstica y la aprobación de hasta nueve nuevos agentes terapéuticos denota que la gestión clínica de la LMA está cambiando y que este tema es de actualidad. Pese a ello, la supervivencia a 5 años de la enfermedad sigue siendo inferior al 30%. Dos mecanismos moleculares, el metabolismo y la señalización redox, han demostrado estar involucrados en la hematopoyesis normal y en su versión tumorigénica, la leucemogénesis. Además, estos dos procesos se encuentran interconectados. Las especies reactivas del oxígeno (ROS), principales ejecutoras de la señalización redox, regulan el metabolismo; y este es el mayor productor de ROS. Con todo, los mecanismos que gobiernan esta relación redox-metabolismo requieren una investigación más profunda. En este sentido, destacan las NADPH oxidasas (NOX) por ser el único sistema celular cuya funcionalidad principal es la producción de ROS y, por tanto, tentativamente ser las enzimas clave para regular la señalización redox. En esta tesis estudiamos el papel de NOX2 en la LMA. NOX2 es el miembro de la familia de las NOX mayoritariamente expresado en células mieloides. Hemos descubierto que NOX2 tiene un papel importante regulando el metabolismo de la glucosa de células leucémicas, de modo que el descenso de los niveles de NOX2 provoca un metabolismo mitocondrial deficiente (ciclo de los ácidos tricarboxílicos y fosforilación oxidativa disminuidos), que puede ser compensado por un incremento glucolítico en células metabólicamente flexibles. Además, hemos visto que NOX2 también tiene un rol importante en la regulación del sistema glutatión, donde bajos niveles de NOX2 se ven acompañados de un descenso en los niveles de glutatión y una capacidad antioxidante comprometida. Así pues, NOX2 resulta fundamental para mantener un metabolismo mitocondrial activo y permitir la reposición de los depósitos de glutatión en células de LMA. Conocer estas interacciones moleculares, nos permite proponer un tratamiento de inhibición de las NOX (iNOX) en combinación con inhibidores del metabolismo de la glucosa como estrategia terapéutica frente a la LMA. Esta combinación ha resultado

eficaz en líneas celulares y células procedentes de pacientes con distinto fondo genético-molecular. De entre las alternativas testadas, la inhibición de NOX junto con el tratamiento con oxamato (Ox) ha resultado la opción más atractiva por su alta efectividad y su moderada toxicidad en células sanas de médula ósea. La efectividad de iNOX+Ox es mayor cuanto más alta es la expresión de NOX2. Por ello, iNOX+Ox se muestra una alternativa interesante para pacientes con altos niveles de NOX2 como aquellos con fenotipo diferenciado, grupos FAB (clasificación *French-American-British*) M4 o M5, y quimiorresistentes. La adición de citarabina (Ara-C) a la combinación iNOX+Ox aumenta la potencia de la combinación induciendo más fuertemente la muerte celular. Según nuestros datos, la efectividad de la combinación parece deberse a la modulación que ejerce sobre el metabolismo energético y a una potente supresión de la capacidad antioxidante de la célula. Por último, en esta tesis presentamos un panel de 29 genes correlacionados (29G) con implicación en el metabolismo, entre los que se encuentra NOX2. Este panel tiene capacidad de clasificar a nivel pronóstico a los pacientes de LMA. Un paso más allá, la expresión de estos 29 genes nos ha permitido computar un índice que podría predecir la supervivencia de los pacientes en base a 29G. 29G también discrimina 4 grupos con distinta supervivencia dentro del grupo de pacientes con pronóstico intermedio. 29G podría mejorar la clasificación de un grupo tan heterogéneo como es el de pronóstico intermedio, que actualmente concentra a todos aquellos casos con alteraciones que no han sido catalogadas como favorables o adversas. Todos estos resultados coinciden en NOX2 y su influencia sobre el metabolismo como piezas angulares de la LMA.

## ABSTRACT

AML is the most commonly diagnosed leukemia in adults. Its clinical management is complex, mainly due to its great heterogeneity. Consequently, for more than 50 years there has been little improvement in its diagnosis and treatment. However, in the last 4 years the medical protocol for diagnosis, prognosis and treatment of the disease has been significantly modified owing to the revolution in the omics sciences. The recent inclusion of several mutations in the prognostic determination and the approval of nine new therapeutic agents indicate that the clinical management of AML is changing and that AML is a hot topic. Notwithstanding, the 5-year survival of the disease is still less than 30%. Two molecular mechanisms, metabolism and redox signaling, have been shown to be involved in normal hematopoiesis and its tumorigenic version, leukemogenesis. Moreover, these two processes are interconnected. Reactive oxygen species (ROS), the main executors of redox signaling, are involved in metabolic regulation and metabolism is the major producer of ROS. However, the mechanisms governing this redox-metabolism relationship require further investigation. In this sense, NOX stand out as the only cellular system whose main functionality is the production of ROS and, therefore, tentatively as the key enzymes to regulate redox signaling and, further, its influence on metabolism. In this thesis we study the role of NOX2 in AML. NOX2 is the NOX family member mostly expressed in myeloid cells. We have found that NOX2 plays an important role in regulating glucose metabolism of leukemic cells. Decreased NOX2 levels lead to impaired mitochondrial metabolism (decreased tricarboxylic acid cycle and oxidative phosphorylation), which can be compensated by a glycolytic increase in metabolically flexible cells. In addition, we have shown that NOX2 also plays an important role in the regulation of the glutathione system, where low NOX2 levels are accompanied by decreased glutathione levels and compromised antioxidant capacity. Thus, NOX2 is critical for maintaining active mitochondrial metabolism and allowing replenishment of glutathione stores in AML cells. Knowledge of these molecular interactions allows us to propose a NOX inhibition (iNOX) treatment in combination with glucose metabolism inhibition as a therapeutic strategy against AML. This combination has been effective in cell lines and patients' bone marrow mononuclear cells with different molecular-genetic backgrounds. Among the alternatives tested, NOX inhibition together with oxamate (Ox) treatment has proved to be the most attractive option due to its high effectiveness against tumoral cells and moderate toxicity in healthy bone marrow cells. iNOX+Ox shows

greater effectiveness the higher the NOX2 expression. Thus, iNOX+Ox is an interesting alternative for FAB group patients with a differentiated phenotype, M4 or M5, and chemoresistant patients who have demonstrated high NOX2 expression. The addition of cytarabine (Ara-C) to the iNOX+Ox combination increases the potency of the combination by more strongly inducing cell death. Furthermore, according to our data, the effectiveness of the combination seems to be due to the modulation on energy metabolism and a potent suppression of antioxidant capacity exerted on cells. Finally, in this thesis we present a panel of 29 correlated genes (29G), including NOX2 and involved in metabolism, with the ability to prognostically classify AML patients. One step further, the expression of these 29 genes has allowed us to compute an index that could predict patient survival based on 29G. 29G also discriminates 4 groups with different survival rates within the group of patients with intermediate prognosis. 29G could improve the classification of such a heterogeneous group as the intermediate prognosis group, which currently concentrates all those cases with alterations that have not been classified as favorable or adverse. All these results coincide in NOX2 and its influence on metabolism as cornerstones of AML.







# **INTRODUCCIÓN**



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Leucemia mieloide aguda

La leucemia mieloide aguda (LMA) es un desorden hematopoyético clonal que se caracteriza por la acumulación de mieloblastos (precursores de células mieloides) anormales en la médula ósea, que pueden interferir la producción normal de células de la sangre y diseminarse a sangre o a otros órganos. El 25% de las leucemias diagnosticadas a nivel mundial se corresponden con la LMA; de hecho, se sabe que es la leucemia aguda que más afecta a adultos. Cada año se diagnostican entre 3 y 5 casos nuevos de LMA por cada 100.000 habitantes.<sup>1</sup> La LMA es un cáncer que predominantemente afecta a individuos de mediana edad y mayores, más del 65% de los diagnosticados son mayores de 50 años y la mediana de edad en el momento del diagnóstico es de 68 años.<sup>2</sup> Se caracteriza por presentar un escenario molecular muy heterogéneo, con más de 250 mutaciones y 20 alteraciones citogenéticas que la desencadenan y dificultan su estudio (Figura 1). Además, se ha visto que en más de un 90% de los diagnósticos las células leucémicas presentan al menos 2 mutaciones iniciadores y, al menos 4 en un 50% de los casos.<sup>3</sup> Por ello, se suele decir que no hay dos LMA iguales.

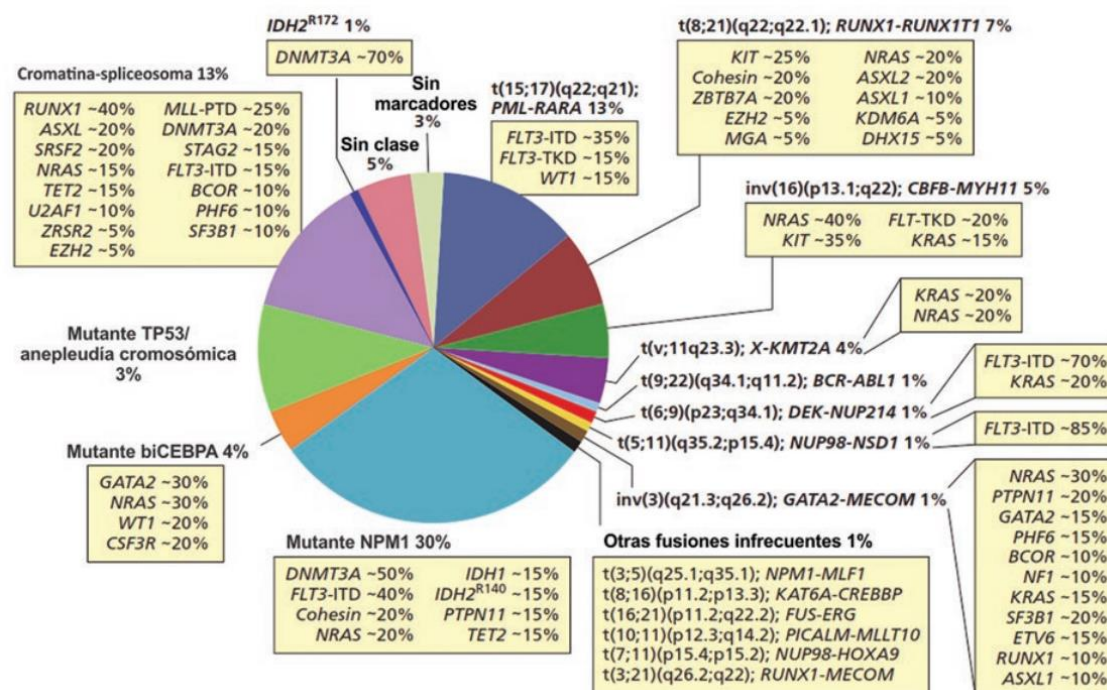


Figura 1. Alteraciones citogenéticas y mutaciones recurrentes de pacientes adultos de LMA. Tomada de 4.

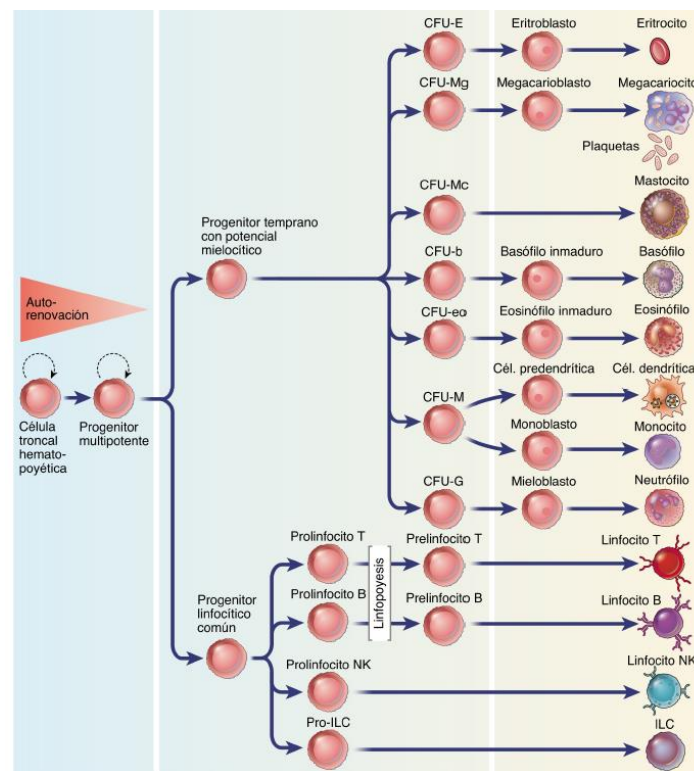
La volatilidad genética de esta enfermedad dificulta enormemente su tratamiento, lo que se traduce en una alta tasa de pacientes refractarios al tratamiento primario, mucho riesgo de recaída y un alto número de pacientes con un perfil de alto riesgo. Todo ello hace que la tasa de supervivencia global a 5 años sea del 29,5%.<sup>5</sup> No obstante, los pronósticos de la LMA están estrechamente ligados a las características genéticas de la enfermedad, y el tratamiento recibido y el pronóstico varían de un paciente a otro como veremos más adelante.

### 1.1.1. Origen de la leucemia mieloide aguda

La hematopoyesis es el proceso mediante el que se forman los componentes celulares de la sangre. Es un mecanismo que el organismo lleva a cabo desde la etapa embrionaria, inicialmente en el saco vitelino, para posteriormente realizarse en el hígado y terminar por establecerse en la médula ósea donde continúa a lo largo de toda la vida adulta.<sup>6</sup> Las células encargadas de prosperar este mecanismo son las células madre hematopoyéticas (HSC de sus siglas en inglés *hematopoietic stem cells*). Las HSC se localizan en un nicho perivascular, predominantemente compuesto por células mesenquimales y endoteliales, y tienen la capacidad de producir de forma continua progenitores no comprometidos que pueden multiplicarse y/o diferenciarse a células completamente funcionales de todos los distintos linajes de la sangre. Este proceso, vital para la supervivencia del organismo que necesita reposición de eritrocitos y células del sistema inmunitario durante toda su vida, se perpetúa gracias a la capacidad de autorrenovación de las HSC, que son las células más inmaduras del esquema hematopoyético y que actúan como fuente de reposición de la que van generándose progenitores cada vez más comprometidos hacia los diferentes linajes hematopoyéticos conformando un diagrama hematopoyético jerárquico (Figura 2).

La leucemia mieloide aguda se origina por una mutación en una HSC o bien una célula progenitora del sistema hematopoyético. La célula que origina la leucemia o COL (de sus siglas en inglés *cell of origin of leukemia*) debe tener capacidad de autorrenovación y un mayor potencial proliferativo que las células sanas. Así pues, la hipótesis que se baraja actualmente es que o bien la célula HSC sufre una mutación que descontrola su capacidad proliferativa o bien la mutación recae sobre una célula progenitora que adquiere capacidad de autorrenovación.<sup>7</sup> Ahora bien, los estadios de diferenciación de la hematopoyesis no son estancos y este proceso se asemeja más a una

transición constante que a una sucesión de fases o estados, por lo que este proceso de transformación tumoral es más diverso de lo que *a priori* parece. La evolución del clon leucémico es un proceso multietapa que depende del fondo genético de la célula mutada, de las mutaciones adquiridas y de la presión del microambiente en el que se encuentra,<sup>8</sup> lo cual provoca que el escenario de cada leucemia sea prácticamente inigualable.<sup>9</sup> Esta evolución clonal sigue una estructura jerárquica que, en parte, se asemeja a la hematopoyesis normal. De hecho, al igual que en la hematopoyesis normal, la leucemia presenta una población de células madre denominada células madre leucémicas o LSC (de sus siglas en inglés *leukemic stem cells*), con capacidad de autorenovación y de propagar la población leucémica tras ser transplantadas. Las LSC pueden encontrarse en distintos puntos del proceso de evolución del clon leucémico por lo que provienen de la COL, pero no tienen por qué presentar el mismo fenotipo.



**Figura 2. Modelo de hematopoyesis con una estructura jerárquica en árbol.** CFU-E: unidades formadoras de colonias eritroides; CFU-Mg: unidades formadoras de colonias megacariocíticas; CFU-Mc: unidades formadoras de colonias de mastocitos; CFU-b: unidades formadoras de colonias de basófilos; CFU-eo: unidades formadoras de colonias de eosinófilos; CFU-M: unidades formadoras de colonias de monocíticas; CFU-G: unidades formadoras de colonias de granulocíticas; NK: natural killer; ILC: células linfoides innatas. Tomada de <sup>10</sup>.

### 1.1.2. Diagnóstico de la leucemia mieloide aguda

Las manifestaciones clínicas de la LMA son muy variadas entre los distintos pacientes. La mayoría de los pacientes muestran síntomas coincidentes con una aplasia medular -fiebre, infecciones, síntomas relacionados a la anemia, hematomas o sangrado anormal- y un recuento sanguíneo completo alterado por la existencia de citopenias, leucocitosis y/o blastos circulantes. Los cuadros de la enfermedad pueden ser desde estables a muy críticos, en los que se requiere su ingreso en la unidad de cuidados intensivos de forma inmediata. Existen algunas complicaciones que, aunque con baja frecuencia, se pueden producir debido a la LMA: (1) el síndrome de la lisis tumoral ocurre cuando los blastos tumorales se lisan espontáneamente o a causa del tratamiento y vierten todo su contenido al exterior celular, lo cual produce una fuerte liberación de algunas moléculas del interior celular que en altas concentraciones pueden ser tóxicas; (2) leucostasis se refiere a un recuento excesivamente alto de células blancas en sangre que puede provocar un cuadro parejo al de la isquemia o hipoxia; (3) citopenias, que pueden producirse por un descenso en las plaquetas, glóbulos rojos... y son mucho más habituales que las dos anteriores complicaciones. Independientemente de si es estable o crítico, el establecimiento de un diagnóstico de LMA se debe realizar de forma urgente.

Se considera que un paciente está enfermo de LMA cuando presenta un 20% o más de blastos (mieloblastos, monoblastos y megacarioblastos) en médula ósea o sangre. Según las últimas indicaciones, los pacientes con un 10% o más de blastos entran a formar parte de una nueva identidad clínica denominada síndrome mielodisplásico/AML (MDS/AML de sus siglas en inglés *myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukemia*) y en lo referido a diagnóstico y tratamiento deben tratarse como si fueran un caso de LMA ya que se ha visto que muchos de estos pacientes presentan alteraciones moleculares coincidentes con LMA.<sup>11</sup> Para evitar un posible solapamiento con la leucemia mieloide crónica en fase acelerada, la LMA con *BCR/ABL1* sigue requiriendo un 20% de blastos.

Así pues, los procedimientos mínimos necesarios para realizar un diagnóstico son: recuento sanguíneo completo y cuenta diferencial, aspirado de médula ósea sobre el que se realiza un recuento completo e inmunofenotipado de los marcadores de superficie e intracelulares de la población tumoral por citometría de flujo. Además, para establecer un pronóstico y determinar el tratamiento a administrar deben realizarse varios análisis genéticos y se debe tomar la historia médica del paciente en el momento del diagnóstico. Un estudio citogenético que nos permita evaluar las alteraciones cromosómicas y un



cribado de las mutaciones de *FLT3*, *IDH1*, *IDH2*, *NPM1*, *CEBPA*, *DDX41*, *TP53*, *ASXL1*, *BCOR*, *EZH2*, *RUNX1*, *SF3B1*, *SRSF2*, *STAG2*, *U2AF1* y *ZRSR2* son absolutamente obligatorios y deben disponer de resultados a la menor brevedad. Se puede extender con el análisis de la mutación de otros genes como *RAS*, *WT1*, *JAK2*, *CBL*... que pueden resultar útiles para el seguimiento y monitorización de las células leucémicas. En cuanto a la historia médica del paciente, es fundamental conocer si la patología puede derivar de un tratamiento o un MDS previo que, junto con un análisis de la comorbilidad del paciente, resultarán clave para la decisión terapéutica. Además, conocer los antecedentes familiares del paciente y la realización de pruebas de coagulación pueden aportar información sobre si el paciente tenía predisposición germinal a desarrollar la enfermedad.

### **1.1.3. Clasificación y pronóstico**

#### **1.1.3.1. Clasificación French-American-British (FAB)**

Ya hemos mencionado que la característica más relevante de la LMA es su heterogeneidad. En aras de simplificar su abordaje, durante años científicos y clínicos han tratado de proponer sistemas de clasificación de la enfermedad. En 1976, la clasificación FAB (de sus siglas en inglés *French-American-British*) distribuyó a los pacientes en función del tipo de célula del que se origina la leucemia y el grado de maduración de sus blastos, creando un sistema de clasificación que se constituye por 8 grupos que van desde M0 a M7 (Tabla 1). Los grupos de M0 a M5 se originan a partir de precursores de las células blancas de modo que el grupo M0 corresponde a la LMA más indiferenciada y el grupo M5 el de células más maduras. La LMA M6 se origina en formas muy tempranas de los glóbulos rojos y la LMA M7 comienza en formas tempranas de las células que forman las plaquetas.

Sin embargo, la utilidad que ha mostrado la clasificación FAB en la práctica clínica ha sido muy limitada ya que no ha proporcionado ningún tipo de ventaja en el pronóstico y tratamiento de la LMA.

**Tabla 1. Grupos de clasificación FAB de LMA y frecuencia de diagnóstico de cada uno de los grupos.**

Tipo FAB	Nombre	Frecuencia
<b>M0</b>	Leucemia mieloblástica aguda indiferenciada	3%
<b>M1</b>	Leucemia mieloblástica aguda con maduración mínima	10-15%
<b>M2</b>	Leucemia mieloblástica aguda con maduración	25-30%
<b>M3</b>	Leucemia promielocítica aguda	10-15%
<b>M4</b>	Leucemia mielomonocítica aguda	25%
<b>M5</b>	Leucemia monocítica aguda	10%
<b>M6</b>	Leucemia eritroide aguda	3-5%
<b>M7</b>	Leucemia megacarioblástica aguda	3%

### 1.1.3.2. ELN

Desde 2010, se empezó a considerar la idea de añadir las mutaciones de algunos genes a la clasificación pronóstica de los pacientes de LMA, como resultado de las observaciones que demostraban que las mutaciones en *NPM1* y *CEBPA* se asociaban a buen pronóstico y las mutaciones en *FLT3* desencadenaban un pronóstico adverso. Hasta ese momento, el pronóstico de los pacientes se estimaba en base a las recomendaciones propuestas por Chenson *et al.*, que recogían la influencia de algunas alteraciones citogenéticas en el devenir de los pacientes,<sup>12,13</sup> y los cambios cromosómicos que iba reconociendo la Organización Mundial de la Salud (OMS).<sup>14</sup> Es en 2010 cuando por primera vez la *European Leukemia Net* (ELN), un consorcio de investigadores y médicos europeos que se crea con el objetivo de integrar las aportaciones interdisciplinares de ensayos de LMA, propone un sistema de clasificación pronóstico ordenado, basado en las alteraciones genéticas más frecuentes de los pacientes y, además, incluye las mutaciones en *FLT3*, *NPM1* y *CEBPA*.<sup>15</sup> El sistema ELN ha tenido dos actualizaciones en los años 2017<sup>16</sup> y 2022.<sup>11</sup> Su reconocimiento y utilización ha ido ganando acogida, no solo a nivel europeo, sino a nivel cada vez más internacional. En las dos últimas guías, el consorcio ha añadido nuevas mutaciones que han demostrado capacidad pronóstica para clasificar la enfermedad. Igualmente, se han ido matizando las consecuencias de la aparición de dos

de estas mutaciones conjuntamente en un mismo clon leucémico ya que provocan cambios en la clasificación pronóstica en comparación con las mutaciones aisladas. Por ejemplo, los pacientes con mutación en *NPM1* tienen buen pronóstico; sin embargo, si presentan mutaciones en *NPM1* y *FLT3-ITD* el pronóstico se vuelve intermedio. Como puede observarse en la Tabla 2, la ELN propone 3 grupos pronóstico en función de las alteraciones genéticas observadas en los pacientes: favorable, intermedio y adverso. Las tasas de supervivencia a 5 años de los pacientes menores de 60 años, son del 64%, 42% y 20% para favorable, intermedio y adverso respectivamente; mientras que en los pacientes mayores de 60 años la supervivencia disminuye al 37%, 16% y 6%.<sup>17</sup>

**Tabla 2. Clasificación pronóstica de la ELN 2022.** Adaptada de <sup>11</sup>.

Categoría pronóstica	Alteraciones genéticas
<b>Favorable</b>	t (8;21) (q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv (16) (p13.1q22) or t (16;16) (p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> <i>NPM1</i> mutado sin <i>FLT3-ITD</i> <i>CEBPα</i> mutado en bZIP
<b>Intermedio</b>	<i>NPM1</i> mutado with <i>FLT3-ITD</i> <i>FLT3-ITD</i> t (9;11) (p21.3;q23.3); <i>MLL3-KMT2A</i> Alteraciones genéticas no clasificadas como favorables o adversas
<b>Adverso</b>	t (6;9) (p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i> t (v;11q23.3); reordenamiento <i>KMT2A</i> t (9;22) (q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> t(8;16)(p11.2;p13.3); <i>KAT6A-CREBBP</i> inv(3) (q21.3q26.2) o t (3;3) (q21.3;q26.2); <i>GATA2, MECOM(EVI1)</i> t (3q26.2;v); reordenamiento <i>MECOM (EVI1)</i> -5 or del (5q); -7; -17/abn (17p) Cariotipo complejo o monosómico Matación en <i>ASXL1, BCOR, EZH2, RUNX1, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1</i> , o <i>ZRSR2</i> <i>TP53</i> mutado

El trabajo de la ELN para recoger y compilar los descubrimientos más significativos para el manejo de la LMA ha permitido unificar criterios y necesidades a nivel mundial. Aun así, es importante tener en consideración que esta guía es un documento vivo, en constante revisión, que ha experimentado cambios grandes de unas versiones a otras:

incorporación de nuevos conocimientos, pero también ha habido rectificaciones. Nos encontramos ante las primeras versiones de un manual para el manejo clínico de la LMA, una enfermedad muy heterogénea de la que aún se desconoce mucho. En este sentido, algunas limitaciones que es pertinente resaltar son: (1) pese a las más de 250 mutaciones encontradas en LMA solo un pequeño porcentaje de estas está incluido en la clasificación, dejando fuera mutaciones que ocurren en un 10-20% de pacientes como *DNMT3*, *RAS*, *IDH1/2*; (2) a pesar de haber más de 250 genes mutados frente a una veintena de alteraciones citogenéticas son las segundas las más determinantes para establecer el grupo de riesgo de los pacientes; (3) pese a las recientes mejoras, el sistema de clasificación proporciona información limitada en la determinación del tratamiento a aplicar al paciente, de modo que los vínculos entre factores pronóstico y tratamiento son escasos; (4) el grupo intermedio carece de valor informativo ya que, de momento, actúa como un cajón de sastre para clasificar todo aquello que no es ni favorable ni adverso. Por todo ello, es evidente que todavía queda mucho por investigar en torno a la implicación de todas estas alteraciones genéticas en la LMA.

Ahora bien, el análisis funcional exhaustivo de los genes más representativos de la LMA nos permite detectar que, esencialmente, son 6 los procesos celulares cuya alteración resulta clave para desarrollar LMA<sup>18</sup> (Tabla 3):

1. Vías de señalización que regulan la proliferación. Clásicamente se han denominado mutaciones tipo I, aunque esta clasificación ha ido perdiendo validez en los últimos años a medida que se iban encontrando más mutaciones. Las mutaciones que inducen la proliferación están presentes en 2 de cada 3 casos de LMA y alteran vías de señalización que activan la proliferación descontrolada de las células.<sup>19</sup> También se ha descrito que estas mutaciones son eventos mutacionales tardíos en la evolución del clon tumoral.<sup>19</sup> Las mutaciones más frecuentes de este grupo son en *FLT3*, presentes en un 30% de los pacientes como mutaciones puntuales (TKD) o duplicados internos en tándem (ITD), y en la familia *RAS*, *NRAS*, *KRAS*, *PTPN11*, que se encuentra mutada en un 10-15% de los pacientes.
2. Modificadores epigenéticos. Las mutaciones en proteínas de regulación epigenética aparecen en más de un 50% de los casos de LMA.<sup>18</sup> Estas modificaciones se han vinculado a los primeros estadios del proceso evolutivo del clon leucémico. Parece que son mutaciones iniciadoras pero insuficientes para

inducir la transformación tumoral, constituyendo un estadio preleucémico típico en individuos ancianos.<sup>18</sup> Las más habituales son *DNMT3A* en aproximadamente un 20% de los pacientes, *IDH1/IDH2* también en el 20% de los pacientes y *TET2* en un 10-20% de los pacientes. Estas mutaciones alteran la expresión de genes implicados en la decisión de las HSC, provocando un fenotipo de bloqueo de la diferenciación a la par de una mayor capacidad de auto-renovación.<sup>20</sup>

3. *NPM1*. *NPM1* es una chaperona implicada en síntesis de proteínas y replicación de ADN. *NPM1* se encuentra mutada en aproximadamente el 30% de los pacientes de LMA y se asocia a buen pronóstico, excepto si se acompaña de mutaciones en *FLT3-ITD* o *DNMT3A* en cuyo caso el pronóstico empeora.<sup>21</sup>
4. *TP53*. *TP53* codifica para p53, el supresor tumoral más reconocido y ampliamente alterado en distintos tipos de cáncer. Se encuentra mutado con mucha más frecuencia en LMA derivadas de tratamiento o MDS donde aparece en un 10-15% de los casos. Es una de las mutaciones de mal pronóstico (Tabla 2).
5. Espliceosoma. Son modificaciones genéticas en genes vinculados al proceso de *splicing*, regulado por el espliceosoma. Estas mutaciones aparecen en un 10% de los casos de LMA. Estos pacientes presentan blastos con una menor tasa proliferativa, por lo que frecuentemente responden peor a los tratamientos, y se asocian a una baja tasa de supervivencia.<sup>18</sup> Son mutaciones que siempre aparecen en heterocigosis ya que en homocigosis son letales. Por ello, se ha propuesto tratar estos casos con inhibidores del *splicing* cuyo efecto será más potente en células con un alelo mutado.<sup>22</sup>
6. Cohesinas. Las cohesinas son proteínas importantes para la estructura del ADN. El complejo de las cohesinas actúa durante la replicación y reparación del ADN, así como, en la segregación de los cromosomas durante el ciclo celular. Proteínas del complejo de las cohesinas aparecen mutadas en un 6-13% de las LMA.<sup>23</sup> Habitualmente aparecen en heterocigosis y se asocian a un mal pronóstico. Las mutaciones de la cohesina perturban el equilibrio entre la autorrenovación y la diferenciación de las HSC y progenitoras hematopoyéticas.

Siempre se ha pensado que todas las mutaciones que muestran los clones leucémicos son somáticas, aunque algunas mutaciones que predisponen a otros tipos de cáncer también aparecen en LMA: *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *TP53* o *CHEK2*. Cada vez hay más

evidencias que hacen pensar que las personas tienen una predisposición hereditaria en la línea germinal a padecer neoplasias hematopoyéticas.<sup>24</sup>

**Tabla 3. Mutaciones recurrentes de LMA y sus implicaciones funcionales.**

<b>Funcionalidad celular alterada</b>	<b>Genes mutados</b>
<b>Proliferación</b>	<i>FLT3, KRAS, NRAS, KIT, PTPN11, NF1 y DEK-NUP214</i>
<b>Epigenética</b>	<i>DNMT3A, IDH1, IDH2, TET2, ASXL1, DDX41, CEBPA, RUNX1, CBFβ-MYH11, KET6A-CREBBP y MLL/KMT2A</i>
<b>Nucleofosmina</b>	<i>NPM1</i>
<b>p53</b>	<i>TP53</i>
<b>Espliceosoma</b>	<i>GATA2, SRSF2, U2AF1, BCOR, SF3B1 y ZRSR2</i>
<b>Cohesinas</b>	<i>RAD21, STAG1, STAG2, SMC1A y SMC3</i>

### **1.1.3.3. Sistema de clasificación de la Organización Mundial de Salud**

Este sistema de clasificación sigue vigente y su quinta edición se ha publicado recientemente. Presenta una alternativa de clasificación basada en algunas de las alteraciones genéticas frecuentes y sigue proponiendo otra opción de clasificación basada en la morfología y diferenciación, actualizando los criterios propuestos por FAB.<sup>25</sup> Ciertamente, la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) va a la zaga de la ELN en la inclusión de mutaciones a su clasificación. Por ello, en los últimos 3 años las referencias al sistema ELN se han incrementado en contrapartida de un descenso de las referencias a OMS, efecto especialmente notorio en las publicaciones de grupos americanos, que años atrás se encomendaban mayoritariamente a OMS.

### **1.1.3.4. Nuevas alternativas para clasificar LMA: expresión génica**

Hemos descrito que en los últimos 20 años ha habido un gran progreso en el descubrimiento de mutaciones implicadas en la LMA. Esto ha sido gracias al gran avance en las técnicas genómicas de alto rendimiento. Entre estas, los estudios GWAS (*Genome-Wide Association Studies*) tienen como objetivo relacionar variantes genéticas con determinadas patologías y son los que han permitido describir nuevas mutaciones en LMA. Pero también podemos encontrar otras estrategias como los métodos de análisis de

la expresión génica que, por supuesto, también se han aplicado a LMA para caracterizar las diferencias en expresión entre los distintos subtipos de LMA. El diagnóstico y pronóstico por expresión génica ya se está utilizando en clínica en otros tipos de cáncer como el cáncer de mama y colorrectal.

Hemos visto que el mejor sistema de clasificación de la LMA, ELN, presenta algunos problemas: una gran dependencia por las alteraciones citogenéticas, no inclusión de algunas de las mutaciones recurrentes y una gran heterogeneidad en su grupo intermedio. Hasta un 45% de pacientes no presenta alteraciones citogenéticas.<sup>16</sup> Además, algunas de las mutaciones que no se consideran para la clasificación pronóstica de ELN son *DNMT3*, *IDH1/2* o *TET2* que aparecen con una frecuencia de entre el 10-20% en LMA. Por último, todos aquellos pacientes que no cumplen las especificaciones de pronóstico favorable o adverso quedan clasificados como pronóstico intermedio por descarte. Por todo lo anterior, podemos predecir que un alto número de pacientes quedará sin clasificación pronóstica apropiada según los métodos actuales. La aplicación de expresión génica podría proporcionar una alternativa interesante para estos pacientes. El hecho de que las células de la médula ósea y de la sangre sean fácilmente accesibles y fáciles de purificar convierte a las leucemias en un tipo de cáncer en el que implementar los estudios de expresión del genoma completo resulta interesante. Adicionalmente, los costes de este tipo de técnicas se han reducido drásticamente en los últimos 5 años haciendo que, en la actualidad, sean económicamente asequibles para su aplicación clínica.

La expresión génica ha mostrado diferencias en los perfiles de expresión de los distintos subtipos de la LMA.<sup>26</sup> En los últimos años, se han publicado varios estudios que demuestran la aplicabilidad de la técnicas de expresión génica para el diagnóstico de la LMA.<sup>26-29</sup>

#### **1.1.4. Tratamiento de la leucemia mieloide aguda**

El tratamiento de LMA se divide en tres fases: inducción, consolidación y mantenimiento. La primera fase, inducción, tiene como objetivo reducir de una manera rápida y todo lo efectiva que sea posible la población de células leucémicas. La segunda fase, como bien indica su nombre, pretende consolidar el tratamiento de inducción y destruir la fracción de células remanente y más sensible que queda tras el tratamiento de inducción. Tras estas fases se evalúa el porcentaje de blastos remanente y se monitoriza su progresión a través de un parámetro denominado enfermedad mínima residual (MRD,

de sus siglas en inglés *minimal residual disease*) capaz de detectar presencia de células leucémicas en una proporción de  $1:10^4$  -  $1:10^6$  que da información sobre el estado de remisión del paciente y permite establecer mejor los planes de tratamiento y pronóstico. Por último, se aplica una fase de mantenimiento con el objetivo de tratar de reducir las opciones de recaída, que son muy frecuentes en esta enfermedad.

Desde los 70 la terapia comúnmente utilizada en la fase de inducción para tratar la leucemia mieloide aguda ha sido el “régimen 7+3”. El régimen 7+3 se refiere a 3 días de antraciclinas (daunorrubicina 30-60 mg/m<sup>2</sup> intravenosa (IV) diaria o bien idarrubicina 12 mg/m<sup>2</sup> IV diaria × 3 días) y 7 días de citarabina (100-200 mg/m<sup>2</sup> IV en infusión continua diaria durante 7 días). En la fase de consolidación, la recomendación es realizar 3-4 ciclos consecutivos de entre 3 y 12 horas de citarabina en dosis intermedia, entre 500-1500 mg/m<sup>2</sup> IV dependiendo el estado físico del paciente. Por último, la recomendación general para el tratamiento de mantenimiento consiste en tomar azacitidina 300 mg oral a diario durante 14 días. Hasta hace 3-4 años esta terapia no había sido significativamente modificada pese al notable mayor conocimiento que se iba adquiriendo de la enfermedad. Este tratamiento ha sido la terapia de elección en base a los resultados de supervivencia que se alcanzaban en los pacientes. En los pacientes jóvenes las tasas de supervivencia a 5 años son del 60-80%, sin embargo, los resultados son considerablemente inferiores en los pacientes mayores de 60 años donde solo entre un 40-60% alcanzan la remisión completa.<sup>16</sup> Durante más de 40 años no se ha encontrado estrategia que mejorara estos resultados, pero en los últimos 4 años se han aprobado hasta nueve nuevos agentes para el tratamiento de LMA y, aunque el régimen 7+3 siga siendo el estándar de tratamiento, varios de ellos se están considerando en primera línea de tratamiento. Los agentes que se recomiendan actualmente en primera línea de tratamiento son:

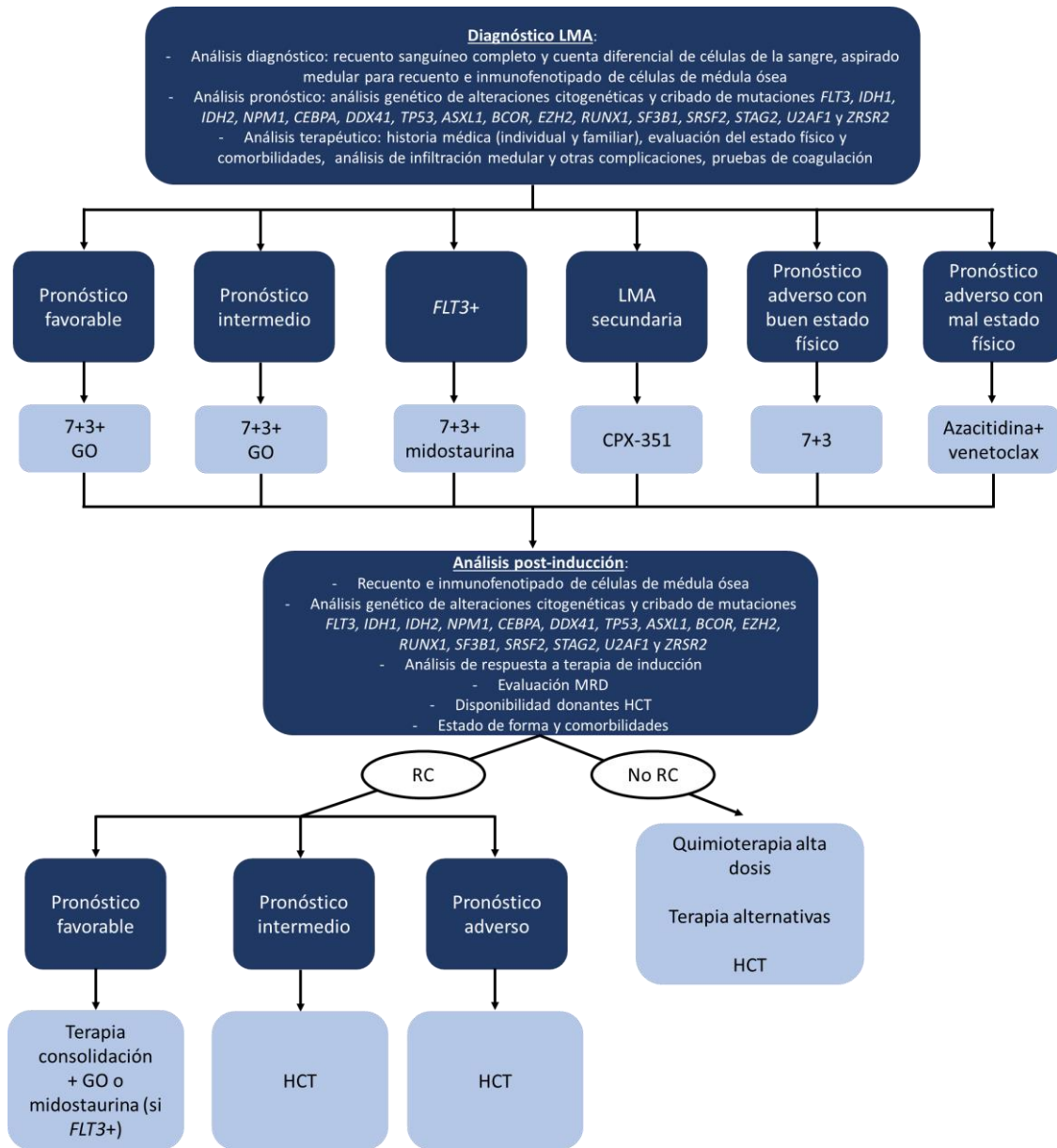
- Gentuzumab-ozogamicina (GO). Según la última recomendación de la ELN, se recomienda aplicar junto con el régimen estándar en pacientes con pronóstico favorable e intermedio a una dosis de 3 mg/m<sup>2</sup> IV los días 1,4 y 7 en la fase de inducción y una única dosis en el día 1 de tratamiento de consolidación. GO es un conjugado anticuerpo-fármaco que se compone por un anticuerpo monoclonal dirigido a CD33, que se encuentra expresado en la mayoría de pacientes de LMA, unido covalentemente al citotóxico N-acetil- $\gamma$ -calicheamicina. La aplicación de GO ha mejorado la supervivencia a 5 años de los pacientes de un 55% a un 77,5%



en pacientes con pronóstico favorable y de un 35,5% a un 40,7% en pacientes de pronóstico intermedio.<sup>30</sup>

- Midostaurina. Midostaurina 50 mg se aplica dos veces al día en pacientes que presenten mutación de *FLT3* tras la aplicación del tratamiento estándar entre el día 8 y 21 de tratamiento de forma oral. Se trata de un inhibidor de *FLT3* que también ha demostrado mejorar la supervivencia de estos pacientes, en comparación con la aplicación única del tratamiento estándar.<sup>31</sup> En los pacientes que presentan resistencia a midostaurina se aplica un segundo inhibidor de *FLT3*, gilterinib, como terapia alternativa.
- CPX-351. Se administra a pacientes con LMA secundaria, es decir, derivada de una mielodisplasia previa, normalmente MDS. Se aplica a 100 U/m<sup>2</sup> IV los días 1,3 y 5 en la fase de inducción más 1-2 ciclos de 65 U/m<sup>2</sup> IV los días 1 y 3 de la fase de consolidación. Se trata de una formulación liposomal de la quimioterapia 7+3 en una proporción de 5:1 de citarabina y daunorrubicina. Mejora sensiblemente la supervivencia del grupo de pacientes de muy mal pronóstico, incrementando de 8% a 18% la supervivencia a 5 años y de 23% a 56%, en caso de recibir trasplante.
- Venetoclax. La quimioterapia de inducción solo se puede administrar de forma segura a individuos en buen estado físico. Según uno de los últimos estudios en este sentido, en pacientes mayores de 66 años solamente el 40% recibió el tratamiento estándar de quimioterapia entre el año 2000 y 2009.<sup>32</sup> Hasta 2018, estos pacientes eran tratados con citarabina a baja dosis o azacitidina, con resultados muy similares. Los pacientes de una edad menor o igual a 60 años presentaban una supervivencia libre de enfermedad a largo plazo de sólo el 40%, mientras que en los mayores de 60 el porcentaje era inferior al 10%, con una mediana de supervivencia global inferior a 1 año independientemente del abordaje terapéutico.<sup>18</sup> Hace 4 años los organismos encargados de la aprobación de fármacos, aceleraron los trámites para que la combinación de venetoclax con azacitidina se aprobará para el tratamiento de estos pacientes a la vista de que esta combinación incrementaba del 13% al 48% los pacientes que alcanzan la remisión completa en comparación con la aplicación individual de azacitidina.<sup>33</sup> Venetoclax se aplica con aumento de dosis progresivo 100 mg el día 1, 200 mg el día 2 y 400 mg del día 3 al 28 por vía oral y en combinación con azacitidina 75 mg/m<sup>2</sup> IV o subcutáneo durante 7 días o decitabina 20 mg/m<sup>2</sup> IV durante 5 días.

Venetoclax es un inhibidor de BCL2 y parece que su efecto sobre el metabolismo puede ser clave en su función mieloablativa.<sup>34</sup>



**Figura 3. Abordaje clínico del diagnóstico y toma de decisión terapéutica de la LMA.** GO: gentuzumab-ozogamicina; MRD: enfermedad residual mínima; HCT: trasplante de células hematopoyéticas; RC: remisión completa. Adaptada de <sup>2</sup>.

Por primera vez en 50 años, las recomendaciones de la ELN 2022 utilizan el pronóstico de los pacientes para determinar la estrategia terapéutica que se va a utilizar. Esto hace que los procedimientos para la determinación pronóstica deban acelerarse y proporcionar los resultados pocos días después del diagnóstico. Aun así, de momento las únicas alteraciones genéticas para las que se ha desarrollado un tratamiento individualizado efectivo son *FLT3*, *IDH* (cuyos inhibidores solo se recomiendan como

terapia alternativa) y t(15;17), que induce la formación de la proteína de fusión *PML-RAR $\alpha$*  ocasionando leucemia promielocítica, y que se trata con ácido transretinoico+tríoóxido arsénico con tasas de remisión del 95%.

Se establece que un paciente de LMA ha alcanzado la remisión completa cuando presenta menos de un 5% de blastos en médula ósea. El tratamiento preferente post-remisión es el trasplante de células hematopoyéticas (HCT de sus siglas en inglés *hematopoietic cell transplant*) ya que es el más efectivo reduciendo el riesgo de recaída. El HCT consiste en la infusión de células madre hematopoyéticas para reconstituir el sistema sanguíneo de un individuo. Generalmente el HCT suele ir precedido por un tratamiento ablativo del sistema hematopoyético preexistente en el individuo. Consiste en un proceso de cuatro pasos: (1) ablación de la médula ósea del receptor, (2) extracción de las HSC del donante, (3) expansión *ex vivo* de las HSC y (4) trasplante de las HSC del donante a la médula ósea del receptor. Ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de varias enfermedades, pero el uso más extendido es para el tratamiento de neoplasias hematológicas.<sup>35</sup> El HCT se ha utilizado durante los últimos 60 años en pacientes leucémicos ocasionando una disminución del 39% en la mortalidad en comparación con los que reciben únicamente quimioterapia.<sup>36</sup> Ahora bien, tiene un riesgo alto; se estima que un 20% de la mortalidad de las leucemias es debido al HCT. Por ello, el HCT se recomienda únicamente a LMA intermedios y adversos, mientras que los pacientes de pronóstico favorable siguen protocolos de mantenimiento. En resumen, el esquema de decisión para el tratamiento de la LMA queda ilustrado en la Figura 3.

#### **1.1.4.1. Tratamiento en LMA refractaria y recaídas**

Pese a los grandes avances de los últimos cuatro años, el número de pacientes refractarios a la quimioterapia o en recaída es muy alto en la LMA. El 20% de los pacientes jóvenes tratados con quimioterapia intensiva presentan respuesta refractaria primaria, es decir, no alcanzarán la remisión completa tras el tratamiento primario.<sup>2</sup> Este porcentaje asciende al 40% en pacientes mayores de 60 años. Además, aproximadamente el 30-50% de los pacientes que alcanzan una remisión completa recaerán tras la fase de consolidación, porcentaje que disminuye al 20-30% si reciben trasplante alogénico.<sup>2</sup> En estos casos es importante realizar un segundo estudio genético ya que las células leucémicas responsables de la recaída o remanentes postratamiento no tienen por qué tener las mismas características genotípicas que las células leucémicas primarias. El

abordaje de estos pacientes es muy individualizado y no todos los centros tienen las mismas consideraciones. La estrategia general es utilizar un segundo régimen de inducción con alta dosis de quimioterápicos siguiendo protocolos como MEC (metotrexato, etopósido, citarabina) o FLAG-IDA (fludarabina, citarabina, daunorrubicina, G-CSF), entre otros. El 50% de los individuos que han tenido periodos más largos libres de enfermedad, pronóstico favorable y/o jóvenes suelen volver a alcanzar la remisión completa, pero tomando la totalidad de la población solo el 20-30% vuelve a estar libre de enfermedad.<sup>2</sup> En función de los resultados del estudio genético, también se puede proponer la utilización de otros fármacos como gilterinib para los pacientes con *FLT3* mutado refractarios a midostaurina, ivosidenib y enasidenib inhibidores específicos de *IDH1* e *IDH2* respectivamente para los casos con mutaciones en estos genes o azacitidina+venetoclax que ha demostrado una eficacia muy variable por lo que requiere de más investigaciones para definir en qué pacientes resulta una estrategia interesante.<sup>37</sup> A la vista de las cifras, es evidente que algunos grupos de pacientes siguen siendo muy vulnerables a la LMA y sigue siendo necesario el desarrollo de nuevas alternativas farmacológicas.

## **1.2. El metabolismo, una diana incipiente frente a la leucemia mieloide aguda**

La principal diferencia entre las células normales y las células tumorales es su tasa de crecimiento. Las células tumorales crecen y se dividen de forma acelerada. El metabolismo es un conjunto de reacciones químicas ordenadas que permiten a las células obtener energía a partir de nutrientes y sintetizar los elementos básicos para el crecimiento. Concretamente, se denomina catabolismo a la degradación de macromoléculas complejas a moléculas más simples y anabolismo a las rutas biosintéticas que generan macromoléculas complejas (lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos) a partir de unidades más sencillas. Evidentemente, el metabolismo sufre variaciones en el proceso de transformación tumoral para satisfacer e incluso superar las exigencias bioenergéticas y biosintéticas del crecimiento celular continuo propio de las células cancerosas.

Las células animales pueden utilizar principalmente cinco fuentes de energía: glucosa, ácidos grasos, aminoácidos, cetonas y lactato.<sup>38</sup> Las tres primeras, glucosa, ácidos grasos y aminoácidos provienen esencialmente de los nutrientes provenientes de la dieta. Cetonas y lactato se producen a partir de los anteriores de forma transitoria y no son

almacenados. Los distintos tejidos del organismo, y más concretamente los tipos celulares de cada tejido, utilizan predominantemente unas u otras fuentes de energía. Por ejemplo, el cerebro utiliza predominante la degradación de la glucosa para obtener energía y solo en condiciones de deprivación de glucosa puede recurrir a la lisis de cetonas. Entre los distintos tipos de células de la sangre, los eritrocitos dependen únicamente de la glucosa para producir energía debido a que no presentan mitocondrias, necesarias para el procesamiento del resto de fuentes energéticas. Otros factores también pueden determinar la preferencia de las células por unas u otras vías metabólicas. Entre otros, su programación genética o el microambiente en el que se encuentren las células (por ejemplo, las concentraciones de oxígeno o la disponibilidad de nutrientes) pueden condicionar la fuente de energía a utilizar.

### 1.2.1. Glucólisis

El metabolismo se organiza en distintas vías metabólicas con reacciones químicas acopladas con el objetivo de maximizar la captación de energía y prevenir una combustión descontrolada de los nutrientes (Figura 4). La glucosa entra al interior celular por difusión facilitada a través de los transportadores GLUT o los transportadores de sodio-glucosa (SGLT, de sus siglas en inglés *sodium-glucose link transporters*). Una vez dentro, es fosforilada inmediatamente por la hexoquinasa en una reacción altamente exergónica que la transforma en glucosa-6-fosfato, una molécula polar y de mayor tamaño que ya no difunde a través de la membrana. La glucosa-6-fosfato es un punto de intersección de varias rutas metabólicas de modo que podría dirigirse a: 1) la ruta de las pentosas fosfato si la célula percibe necesidad de nucleótidos, NADPH o intermedios glucolíticos como fructosa-6-fosfato o gliceraldehído-3-fosfato; 2) la glucogenogénesis convirtiéndose a glucógeno mediante la glucógeno sintasa si requiriera almacenar glucosa; o 3) la glucólisis y seguir la oxidación de la glucosa para obtener energía. Por ello, este punto, el de la reacción catalizada por la hexoquinasa, está altamente regulado y resulta clave para determinar las preferencias energéticas requeridas por la célula. Además de la hexoquinasa, hay otros tres puntos calientes de regulación en el metabolismo de la glucosa. En primer lugar, la fosfofructoquinasa (PFK) que cataliza la reacción de fructosa-6-fosfato a fructosa-1,6-bifosfato, cuya energía libre es muy negativa favoreciendo la generación de fructosa-1,6-bifosfato aunque esta se acumule. Además, la PFK se regula a nivel alostérico por ATP de modo que altos niveles de ATP disminuyen su afinidad por fructosa-6-fosfato e inactivan la función de la enzima. En segundo lugar,

la enzima piruvato quinasa (PK), que cataliza la conversión de fosfoenolpiruvato a piruvato, tiene hasta cuatro isoformas con distinta regulación que se expresan dependiendo del tipo celular.<sup>39</sup> PKM1 tiene actividad constitutiva y se expresa en tejidos con alta demanda catabólica como los músculos, el corazón o el cerebro. Las otras tres isoformas PKM2, PKL y PKR tienen baja afinidad a fosfoenolpiruvato, que puede verse aumentada por modificación alostérica mediada por fructosa-1,6-bisfosfato. Otros metabolitos no-glucolíticos y aminoácidos pueden también regular la actividad de las isoformas de PK. Por último, el complejo piruvato deshidrogenasa, que está compuesto por tres enzimas (E1, E2 y E3) que actúan secuencialmente para transformar el piruvato en acetil-CoA, la piruvato deshidrogenasa quinasa (PDK) y la piruvato deshidrogenasa fosfatasa (PDP). PDK y PDP regulan la actividad de piruvato deshidrogenasa (PDH). La subunidad E1 contiene varios residuos de serina que pueden fosforilarse por PDK e inactivar la actividad de PDH, acción que puede revertirse por la PDP. Así pues, en este caso son las enzimas PDK y PDP las que son susceptibles de regulación alostérica y transcripcional como punto de control de la actividad PDH. PDK puede activarse por la presencia de ATP, NADH o acetil-CoA, así como activar su expresión a nivel transcripcional por PPAR $\alpha$ , señales indicativas de potencial energético suficiente.<sup>38</sup> Por el contrario, PDP se activa por la presencia de Mg<sup>2+</sup>, indicativo de utilización de ATP, o por la presencia de Ca<sup>2+</sup>, que se incrementa al procesos que requieren mucha energía como la contracción, y por otras moléculas indicativas de falta de energía como AMP y CoA.

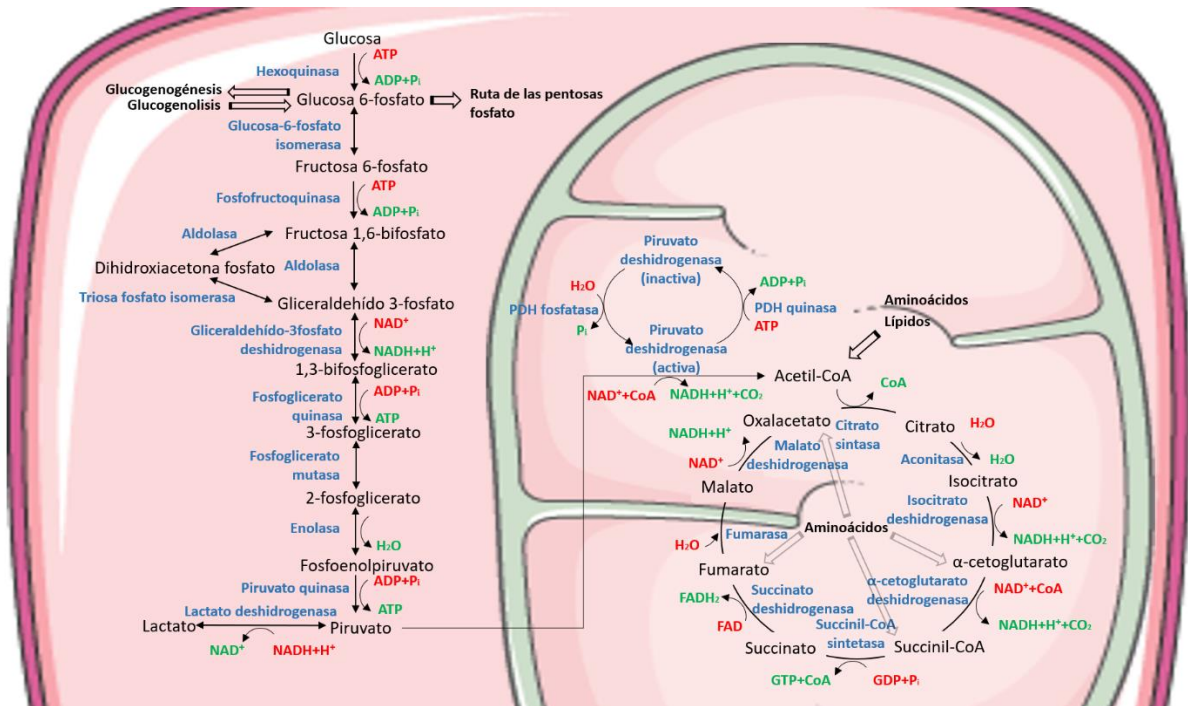
Por lo general, las células oxidan la glucosa al máximo favoreciendo su entrada en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Sin embargo, algunas células bien porque no tienen mitocondrias como los eritrocitos, bien por no tener niveles de oxígeno suficientes o bien por su propia programación metabólica realizan la fermentación láctica; es decir, la reducción del piruvato a lactato por la lactato deshidrogenasa. Este proceso resulta energética menos rentable ya que genera un rendimiento de 2 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa, a diferencia de las 36 moléculas de ATP que se consiguen con la oxidación completa de la glucosa en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA de sus siglas en inglés *tricarboxylic acid*) y el posterior procesamiento de los NADH generados por el ciclo de los TCA en la cadena transportadora de electrones (ETC, de sus siglas en inglés *electron transport chain*). A pesar de ello, las células tumorales clásicamente se han caracterizado por llevar a cabo predominantemente la fermentación láctica, lo que se

ha denominado efecto Warburg en honor a su descubridor en 1956.<sup>40</sup> Se han barajado multitud de hipótesis para explicar este efecto y las últimas aproximaciones se inclinan por indicar que las células prefieren usar este metabolismo ya que obtienen el ATP de forma más rápida y se favorecen la activación de rutas biosintéticas como la ruta de las pentosas fosfato.<sup>41</sup> Además, como consecuencia de la mayor utilización de la ruta de las pentosas fosfato, se produce NADPH que confiere una mayor protección antioxidante a estas células. En la actualidad ya sabemos que pese a tener una preferencia por la glucólisis aeróbica -aeróbica por darse incluso en presencia de oxígeno- la principal característica metabólica de las células tumorales es que son metabólicamente flexibles, habiendo tantos estados metabólicos como condiciones en las que se puede desarrollar el cáncer.<sup>42</sup>

### **1.2.2. Ciclo de los ácidos tricarboxílicos**

Las células tumorales presentan una reprogramación metabólica que no solo consta de la hiperactivación de la glucólisis aerobia. Otras características comunes que se observan en un gran número de tumores son: 1) incrementada dependencia de la glutamina, 2) mayor flujo a través de la ruta de las pentosas fosfatos, 3) mayor entrada de lípidos a la par de lipogénesis y síntesis de colesterol, 4) metabolismo de los aminoácidos alterado y 5) utilización de sustratos alternativos como el lactato o el acetato.<sup>43</sup> Todas estas alteraciones confluyen modificando el ciclo de los TCA, que es el promotor central de la síntesis de ATP y de las rutas biosintéticas. El ciclo de los ácidos tricarboxílicos, también conocido como ciclo de Krebs, se lleva a cabo en la matriz mitocondrial. Consta de varias reacciones encadenadas en las que varios ácidos orgánicos se oxidan con el objetivo final de transferir  $H^+$  a  $NAD^+$ , que puede ser transformado en energía en la ETC (Figura 4). También existen 3 puntos calientes en la regulación del ciclo de los TCA. En primer lugar, la actividad de la citrato sintasa que cataliza la condensación de acetyl-CoA y oxalacetato en citrato. Esta enzima está modulada negativamente por NADH, succinil-CoA, citrato y ATP y positivamente por ADP. Además, posteriormente el citrato puede escapar del ciclo de Krebs y salir de la mitocondria para ser utilizado en la síntesis de lípidos si las necesidades energéticas de la célula son bajas. En segundo lugar, la actividad de la isocitrato deshidrogenasa, que se trata del primer paso del ciclo de los TCA donde se sintetiza NADH como resultado de la descarboxilación oxidativa del isocitrato a  $\alpha$ -cetoglutarato. La actividad de esta enzima se incrementa ante la presencia de ADP y  $Ca^{2+}$  y se reduce si se le une ATP. Por último, la  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa descarboxila

el  $\alpha$ -cetoglutarato en succinil-CoA y es regulada negativamente por NADH y el propio succinil-CoA, constituyendo en bucle de regulación negativa, y positivamente por  $\text{Ca}^{2+}$ .



**Figura 4. Metabolismo de la glucosa.** Reacciones que se suceden en el metabolismo de la glucosa hasta la oxidación completa de esta. En azul las enzimas implicadas en cada reacción, en rojo los sustratos secundarios de cada reacción, en verde los productos secundarios de cada reacción. En negrita, las rutas catabólicas y anabólicas que pueden interactuar con el metabolismo de la glucosa.

### 1.2.3. Otras fuentes de energía distintas a la glucosa

Como indicábamos previamente, la reprogramación que sufren las rutas metabólicas de las células tumorales termina desencadenando cambios en el ciclo de los TCA. Las células tumorales requieren de una alta producción de lípidos para abastecer la síntesis de nuevas membranas necesarias para su crecimiento celular. Por ello, incrementan la entrada y síntesis de lípidos pero también derivan gran parte de su acetil-CoA hacia la biosíntesis de lípidos. De hecho, enzimas como la acetil-CoA sintetasa 2 (ACSS2), la ATP-citrato liasa (ACLY) y la ácido graso sintasa (FASN), dirigidas a incrementar y direccionar acetil-CoA a la síntesis de ácidos grasos, se encuentra frecuentemente reguladas al alza en diversos tipos de tumores.<sup>44</sup> Como resultado, las células tumorales disponen de menor cantidad de acetil-CoA para mantener el ciclo de los TCA por lo que contrarrestan su ausencia metabolizando mayores cantidades de glutamina que puede suplementar el ciclo de los TCA en forma de  $\alpha$ -cetoglutarato.<sup>45</sup> La glutamina se transforma en glutamato por la glutaminasa. El glutamato puede dirigirse a diversas funciones celulares entre las que podemos encontrar suplementar el  $\alpha$ -cetoglutarato del



ciclo de los TCA, al que puede transformarse gracias a la enzima alanina-aminotransferasa. Aparte de la glutamina, otros aminoácidos pueden procesarse y transformarse en distintos intermediarios del ciclo de los TCA: histidina, prolina y arginina pueden transformarse en glutamato; valina, isoleucina y metionina pueden entrar a formar parte del ciclo como succinil-CoA; fenilalanina y tirosina como fumarato; y, por último asparagina puede transformarse en aspartato y este en oxalacetato.<sup>38</sup> Se han descrito muchas y diversas alteraciones en el metabolismo de los aminoácidos en cáncer.<sup>46</sup> Lo que sabemos seguro es que todas ellas estarán alterando el equilibrio energético de las células tumorales. También algunos metabolitos como el lactato o el acetato, que generalmente se consideran productos de desecho del metabolismo celular, se ha visto que pueden procesarse como fuentes de energía en las células tumorales. Recientemente se ha descubierto que los cánceres de páncreas, mama y pulmón utilizan el lactato para el ciclo de los TCA, incluso preferentemente a la glucosa.<sup>43,47,48</sup> Por otro lado, el acetato, producido a partir de fermentación microbiana, oxidación del alcohol u obtenido a partir de la dieta, puede transformarse en acetil-CoA por la acetil CoA sintetasa (ACCS). La forma citoplasmática de la enzima, ACCS2, como hemos descrito previamente, se encuentra incrementada en varios tipos de cáncer provocando cierta dependencia por el acetato, lo cual ha llevado a proponer a esta enzima como diana terapéutica efectiva.<sup>49</sup>

#### **1.2.4. Fosforilación oxidativa**

Se calcula que, de media, una célula obtiene aproximadamente el 70% de su ATP del metabolismo mitocondrial y es que, tras el ciclo de los TCA, de cada molécula de glucosa se han obtenido 10 moléculas de NADH, 2 moléculas de FADH<sub>2</sub> y 4 moléculas de ATP (2 de ATP y 2 de GTP). Todas esas moléculas de NADH y FADH<sub>2</sub> donarán sus electrones a la ETC y terminarán por convertirse en aproximadamente 36 moléculas de ATP por la ATP sintasa o complejo V. Este proceso se denomina fosforilación oxidativa (OXPHOS). El proceso se lleva a cabo en la membrana mitocondrial interna donde se localizan los 4 complejos de la ETC y la ATP sintasa. Los NADH y FADH<sub>2</sub> procedentes del ciclo de los TCA o importados del citoplasma transfieren su energía en forma de electrones a los complejos I y II, respectivamente. Ambos complejos, I y II, son flavoproteínas que contienen un grupo FAD o FMN capaces de aceptar electrones. Desde el complejo II los electrones se transfieren al complejo III mediante la coenzima Q y, por último, viajan hasta el complejo IV que tiene la capacidad de reducir una molécula de oxígeno en 2 de

agua. La coenzima Q y los complejos III y IV contienen grupos hemo con un ion de hierro  $\text{Fe}^{2+}$  capaz de admitir electrones. Cada uno de estos complejos acepta los electrones y reduce al siguiente miembro de la cadena utilizando parte de la energía del flujo de electrones para bombear protones de la matriz mitocondrial al espacio intermembrana. Así pues, el complejo I bombea  $4\text{H}^+$ , el complejo III otros 4 y el complejo IV bombea 2 protones de modo que se genera un gradiente de protones cuya fuerza protón motriz impulsa el paso de protones a través de la ATP sintasa que aprovecha esta energía para transformar una molécula de ADP en ATP cada 3.3 protones, aproximadamente.

Pese a que el efecto Warburg existe y es frecuente en células tumorales, la alta flexibilidad metabólica de estas ha abierto el foco a estudiar otras rutas metabólicas que nos permitan entender las estrategias de obtención de energía de estas células. OXPHOS también se encuentra alterado en cáncer. De hecho, las células madre cancerosas, así como muchas células resistentes a la terapia, presentan un metabolismo OXPHOS dependiente.<sup>50</sup> A continuación, describiremos el metabolismo de las células leucémicas, concretando en lo que se conoce sobre LMA, lo cual nos permitirá definir con mayor precisión las rutas y dianas metabólicas de mayor interés en la patología en estudio en esta tesis.

### **1.3. Metabolismo en leucemia mieloide aguda**

Los distintos tipos celulares presentes en la sangre tienen diferentes particularidades metabólicas que les permiten adaptarse a su entorno y desempeñar su funcionalidad con el máximo de garantías. Previamente destacábamos el ejemplo de los eritrocitos, que no presentan mitocondrias para evitar utilizar el oxígeno que transportan para su propio metabolismo y, consecuentemente, son totalmente dependientes de la glucólisis para la obtención de energía. También hemos descrito que la evolución del clon leucémico es un proceso complejo y altamente variable lo cual deriva en fenotipos muy dispares donde, en ocasiones, el metabolismo sufre modificaciones. Sin embargo, se observan patrones metabólicos comunes entre las células implicadas en el desarrollo de la leucemia. Resulta pertinente describir estos aspectos comunes ya que son potencialmente utilizables como dianas terapéuticas, como se describirá más adelante.

### 1.3.1. Células madre hematopoyéticas

La característica distintiva de las HSC es su capacidad de autorrenovación, función que pueden desempeñar gracias a encontrarse en un estado de quiescencia que les permite diferenciarse o proliferar solamente en las condiciones que se requiera. Por tanto, una de las prioridades de las HSC es mantenerse en estado quiescente. Para ello, se supone que el metabolismo glucolítico es la fuente de energía más apropiada. La glucólisis cumple todos los requisitos que necesitan las HSC: baja demanda energética, adaptabilidad a su nicho -predominantemente hipóxico- y menor producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) debido a la no utilización de la ETC, que como veremos más adelante supone un estímulo prodiferenciador. Durante mucho tiempo, se consideró que las HSC tenían un bajo contenido mitocondrial. Sin embargo, se ha demostrado que el contenido mitocondrial de las células progenitoras multipotentes (MPP) y de las HSC es similar. No obstante, la capacidad respiratoria de las MPP supera a la de las HSC.<sup>51</sup> Una posible explicación es que las HSC estén expuestas a un elevado recambio mitocondrial y mitofagia, pero ambos son comparativamente bajos en las HSC en comparación con las MPP. Nuevas evidencias sugieren que las HSC presentan más mitocondrias inmaduras sometidas a un complejo proceso de degradación lisosomal.<sup>52,53</sup> De hecho, Liang *et al.* han identificado subpoblaciones de HSC con diferente metabolismo.<sup>53</sup> Estos últimos descubrimientos apuntan a la existencia de una población minoritaria muy inmadura y metabólicamente inactiva y una población metabólicamente activa más abundante que obtiene ATP derivado principalmente de la glucólisis, pero también de la ruta ciclo de los TCA-ETC.<sup>53</sup> Aunque las HSC se habían clasificado como glucolíticas, los investigadores han empezado a revelar la necesidad del metabolismo mitocondrial para la homeostasis de las HSC.<sup>53,54</sup> Por ejemplo, la restricción glucolítica es necesaria para la potencia de repoblación de las HSC.<sup>53</sup> Muchos reguladores maestros del metabolismo han demostrado afectar a la decisión de destino de las HSC a través de cambios metabólicos. Algunos de ellos son la quinasa hepática B1 (LKB1),<sup>55</sup> PI3K-AKT-mTOR,<sup>56</sup> la proteína quinasa activada por AMP (AMPK)<sup>55</sup> y la proteína tirosina fosfatasa mitocondrial 1 (PTPMT1).<sup>57</sup> Entre estas vías de señalización y otras, la que se ha demostrado con más frecuencia como responsable del destino metabólico de las HSC es HIF1/2 $\alpha$ .<sup>58</sup> La supresión de HIF1 $\alpha$  provoca el viraje metabólico de glucólisis a OXPHOS a la par que un deterioro de la capacidad de reconstitución de las HSC.<sup>59</sup> Ahora bien, algunos investigadores empiezan a cuestionar la implicación de HIF1/2 $\alpha$  en el comportamiento

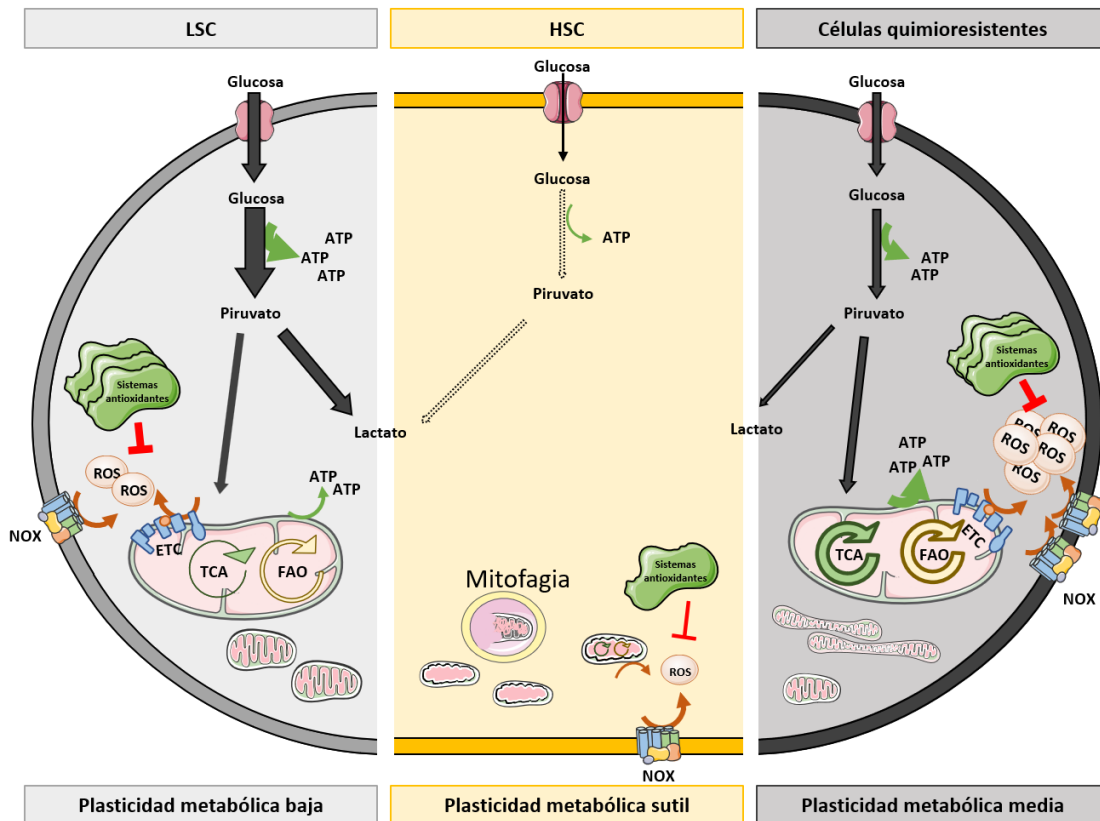
metabólico de las HSC, demostrando que el control ejercido por HIF1/2 $\alpha$  sobre el metabolismo de las HSC no es decisivo<sup>60</sup> y que HIF1/2 $\alpha$  no es necesario para el mantenimiento autónomo de las HSC.<sup>61,62</sup>

### 1.3.2. Células madre leucémicas (LSC)

Dicho esto, hay algunos eventos clave en la vida de las HSC que sabemos que se acompañan de un cambio metabólico hacia la activación del ciclo de los TCA-ETC: la expansión clonal que se da durante el periodo embrionario en el hígado,<sup>59</sup> la activación de la proliferación<sup>63</sup> o diferenciación,<sup>57</sup> la transformación tumoral y el propio envejecimiento.<sup>59</sup> Estos procesos requieren de altas cantidades de energía y algunos intermediarios metabólicos por lo que recurren a OXPHOS, pero ha de considerarse que el incremento de OXPHOS también se acompaña de una subida de ROS. Las LSC deben controlar sus niveles de ROS con mucha precisión para mantener los beneficios del aumento de la OXPHOS sin perder su potencial quiescente. La principal barrera contra las ROS en las LSC es el aumento de la expresión de genes antioxidantes,<sup>64</sup> aunque se ha descrito que células del microambiente de la médula ósea podrían transferir moléculas antioxidantes a las LSC.<sup>65</sup> Todo esto indica que las LSC y las HSC presentan características metabólicas distintas.<sup>66</sup> En esencia, las LSC de la LMA -principalmente quiescentes con bajos niveles de ROS- recurren a la OXPHOS y son incapaces de utilizar la glucólisis cuando se inhibe el metabolismo mitocondrial.<sup>67</sup> Además, alimentan la ETC con productos del catabolismo de aminoácidos,<sup>68</sup> lo que hace que la actividad de la OXPHOS sea aproximadamente tres veces superior a la de sus homólogas sanas.<sup>69</sup> Como discutiremos más adelante, este rasgo diferencial de las LSC se ha utilizado para atacar de forma específica a estas células que son consideradas el principal repositorio de células leucémicas.

Es más, durante años se ha considerado que las LSC eran las células responsables de las recaídas. Recientemente, Farge *et al.* han descrito que ni las LSC ni las células inmaduras ni las células quiescentes se localizan entre las células en recaída.<sup>70</sup> Las células de recidivas desarrollan una firma génica particular que activa OXPHOS y, junto con un aumento de la masa mitocondrial en su citoplasma, da lugar a la activación de la ETC y a niveles elevados de ROS. Estas células dependen de la oxidación de ácidos grasos para alimentar OXPHOS<sup>71</sup> y presentan una expresión elevada de *CD36*, un transportador de ácidos grasos, como herramienta para evadir la apoptosis inducida por los tratamientos.<sup>70</sup>

Esto indica que la dependencia de la OXPHOS ejercida por las LSC es compartida con las células quimiorresistentes, pero no con las HSC sanas (Figura 5). Por ello, este mecanismo de obtención de energía se postula como una interesante estrategia terapéutica.

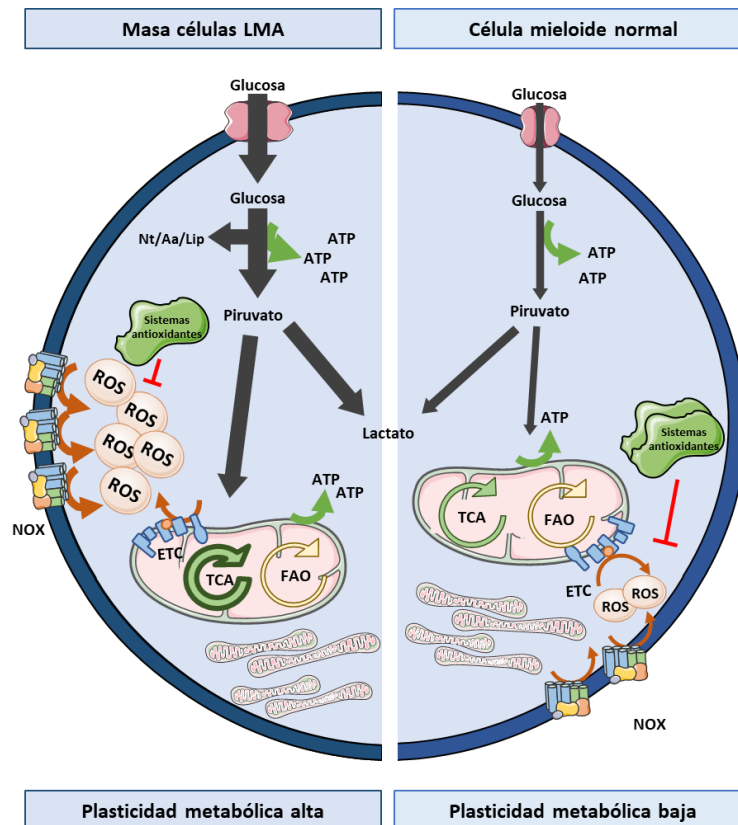


**Figura 5. Estado redox y metabólico de las HSC frente a las LSC y las células quimiorresistentes.** Las HSC se caracterizan por una baja actividad metabólica y bajos niveles de ROS. Los bajos niveles de ATP que necesitan proceden de la glucólisis, ya que tienen mitocondrias inmaduras que sufren degradación. Los bajos niveles de NOX y de metabolismo mitocondrial podrían explicar los bajos niveles de ROS de las HSC, que no requieren sistemas antioxidantes elevados para mantenerlos bajo control. Sin embargo, las LSC obtienen energía de forma activa principalmente por glucólisis (flecha gruesa) pero también a partir del ciclo de los TCA y FAO (flechas finas). Este metabolismo activo provoca la producción de ROS que son eliminadas por la sobreexpresión de sistemas antioxidantes. En el lado derecho de la figura, las células quimiorresistentes también producen ATP por glucólisis, aunque muestran mitocondrias maduras y fusionadas que producen una OXPHOS elevada, siendo alimentadas por el ciclo de los TCA y FAO hiperactivadas. La OXPHOS y la NOX aumentadas dan lugar a niveles elevados de ROS que no pueden extinguirse a pesar de los elevados sistemas antioxidantes. ETC: cadena transportadora de electrones; FAO: oxidación de ácidos grasos; HSC: células madre hematopoyéticas; LSC: células madre leucémicas; NOX: NADPH oxidasa; OXPHOS: fosforilación oxidativa; TCA: ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Adaptado de Romo-González *et al.*<sup>72</sup>

### 1.3.3. Masa de células leucémicas

Al resto de células leucémicas que no son LSC se les conoce como masa de células leucémicas. Esta población es la mayoritaria y la responsable del desarrollo y progresión

de la LMA. Como hemos descrito que ocurre para las células de otros tumores, la masa de células leucémicas tiene un metabolismo glucolítico muy alto en comparación con las células mieloides sanas, oxidando la mayor parte de la glucosa que consume a lactato por fermentación del ácido láctico (Figura 6).<sup>73</sup> Entre otros grupos, Cheng *et al.* describieron un aumento de la glucólisis en la LMA, pero su trabajo fue más allá al descubrir un panel de seis genes relacionados con la glucólisis que demostraron valor pronóstico para la enfermedad. Más recientemente, Lo Presti *et al.* han descrito que los pacientes con LMA presentan metabolomas diversos en función de sus alteraciones citogenéticas y moleculares.<sup>74</sup> La glucólisis se promueve en aquellos casos de LMA en los que la leucemia es inducida por oncoquinasas como FLT3-ITD<sup>75</sup> o BCR-ABL.<sup>76</sup> Sin embargo, en otras translocaciones típicas de la leucemia -por ejemplo, MLL-AF9- la OXPHOS se produce preferentemente. De hecho, la tendencia general de las células cancerosas es inducir en exceso la glucólisis, mientras que las mitocondrias siguen funcionando como en las condiciones no patológicas,<sup>77</sup> lo que demuestra que las células siguen utilizando el metabolismo mitocondrial y pueden recurrir a su uso excesivo si es necesario. De hecho, las células de LMA tienen más mitocondrias pero con una capacidad respiratoria alterada a causa de una menor capacidad respiratoria de reserva por mitocondria que termina provocando acumulación de ROS.<sup>78</sup> En cualquier caso, se sabe que la contribución de ATP de las mitocondrias de las células leucémicas es similar a la de las células normales en la mayoría de los tipos de leucemia. Todavía se necesitan más estudios metabólicos para describir las condiciones que llevan a las células leucémicas a elegir qué fuente del ciclo de los TCA contribuye más a esta normal actividad de OXPHOS, ya que tanto la oxidación de aminoácidos<sup>79</sup> como la de ácidos grasos<sup>80</sup> han sido implicadas, demostrando una gran adaptabilidad de su metabolismo a las condiciones ambientales. Esta flexibilidad metabólica empieza a describirse en todas las poblaciones que hemos descrito previamente -en la masa de células,<sup>81</sup> LSC<sup>82</sup> y células quimiorresistentes<sup>83</sup>- y es importante tenerla en cuenta porque dificulta la posibilidad de utilizar el metabolismo como diana terapéutica.<sup>84</sup>



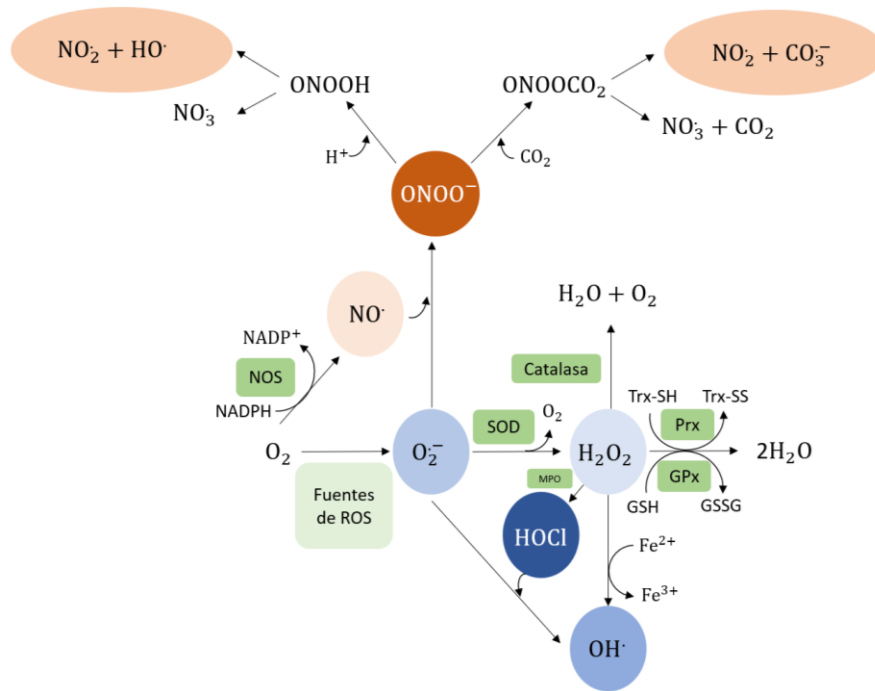
**Figura 6. Estado redox y metabólico de las células de leucemia mieloide aguda frente a sus homólogas sanas.** Las células mieloideas sanas obtienen ATP de la glucólisis y de OXPPOS de forma equilibrada. Producen niveles moderados de ROS que podrían ser variables dependiendo del estado de diferenciación. Sin embargo, las células leucémicas de LMA sobreestiman la glucólisis y la OXPPOS impulsada por el ciclo de los TCA (flechas gruesas) para satisfacer sus necesidades de proliferación en términos de energía y síntesis de macromoléculas (Nt, Aa y Lip). Este metabolismo exacerbado, junto con los elevados niveles de NOX, significa que estas células están expuestas a un elevado estrés oxidativo. Las células de LMA tienen niveles bajos de sistemas antioxidantes. Aa: aminoácidos; LMA: leucemia mieloide aguda; ETC: cadena de transporte de electrones; FAO: oxidación de ácidos grasos; Lip: lípidos; NOX: NADPH oxidasa; Nt: nucleótidos; OXPPOS: fosforilación oxidativa; TCA: ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Adaptado de Romo-González *et al.*<sup>72</sup>

#### 1.4. Especies reactivas del oxígeno, ¿consecuencias del metabolismo o un mecanismo celular independiente?

##### 1.4.1. Especies reactivas del oxígeno

Por todo lo previamente descrito se está comenzando a considerar que el metabolismo mitocondrial sea, no solo una consecuencia pasiva, sino un inductor activo de la tasa quiescencia/diferenciación de las células madre hematopoyéticas.<sup>63</sup> En este sentido, uno de los principales productos de la actividad del metabolismo mitocondrial ha sido muy vinculado a la diferenciación hematopoyética y a la transformación leucémica: las especies reactivas del oxígeno (ROS de sus siglas en inglés *reactive oxygen species*).<sup>85</sup> Las ROS son un conjunto de moléculas pequeñas que contienen un átomo de oxígeno y

que son altamente reactivas pudiendo dañar ADN, ARN, lípidos y proteínas. Las ROS también pueden reaccionar fácilmente con una molécula de óxido nítrico ( $\text{NO}\cdot$ ) formando nuevas moléculas, también con alta reactividad, que se denominan especies reactivas del nitrógeno (RNS de sus siglas en inglés *reactive nitrogen species*) por contener un átomo de nitrógeno. Es frecuente encontrar el término RONS para referirnos a todo el conjunto de ROS y RNS, aunque comúnmente se habla preferentemente de la producción de ROS ya que la presencia de ROS en la célula suele ser mayor que la de RNS (Figura 7).



**Figura 7. Procesos de conversión de las especies reactivas del oxígeno y nitrógeno (RONS).** En azul las especies reactivas del oxígeno (ROS) y en naranja las especies reactivas del nitrógeno (RNS). El tono de la molécula es mayor cuanto mayor sea su reactividad. En verde las enzimas que participan en las reacciones de conversión de unas moléculas a otras. SOD: superóxido dismutasa; Prx: peroxirredoxina; Trx: tiorredoxina; Gpx: glutatión peroxidasa.

La producción mayoritaria de ROS en la célula deriva del metabolismo celular donde las ROS se producen como productos secundarios. El principal productor de ROS en la célula es la ETC.<sup>86</sup> Es frecuente que los complejos de la ETC tengan pequeñas fugas de electrones que derivan en la generación de ROS. Se ha descrito que los complejos I y III de la ETC son los que mayores tasas de escape de electrones tienen en condiciones aisladas, mientras que los complejos II y IV se muestran mucho más eficientes en el transporte de electrones. Sin embargo, en condiciones fisiológicas los complejos forman asociaciones entre ellos para potenciar su actividad, conformando lo conocido como supercomplejos. Así pues, estas observaciones deben considerarse con precaución. Otras



enzimas metabólicas que se conoce que generan ROS mitocondriales como producto secundario de su funcionalidad son la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, el citocromo P450, la piruvato y  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasas, la aconitasa, o la ubiquinona oxidorreductasa, entre otras. Sin embargo, la producción de ROS no es exclusiva de la mitocondria. Varias enzimas con diferente localización subcelular también producen ROS en la célula: óxido nítrico sintasa desacoplada, xantina oxidasa, lipooxigenasas, monooxigenasas... es decir, preferentemente aquellas que tienen actividad oxidasa.<sup>87</sup> De entre todos estos sistemas, destaca uno cuya función principal es la producción de ROS. La familia de enzimas nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasas (NOX), es el único sistema celular especializado en la producción de ROS.

#### 1.4.2. Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasas

La familia de las NOX se constituye por 7 miembros NOX1-5, DUOX1 y DUOX2. Todos ellos catalizan la transferencia de un electrón desde el NADPH a una molécula de oxígeno dando lugar a una molécula de superóxido ( $O_2^-$ ) y otra de  $NADP^+$ . Los 7 miembros de la familia son proteínas transmembrana constituidas por una región transmembrana conformada por 6 hélices  $\alpha$  y una región terminal deshidrogenasa citosólica donde se localizan las zonas de unión a NADPH y FAD. La transferencia del electrón, que terminará por reducir al oxígeno, comienza al unirse el NADPH en el sitio de unión previamente mencionado; seguidamente, el electrón se transferirá al FAD y, posteriormente, a uno de los grupos hemo que se encuentran en la zona central de la región transmembrana de la proteína. Solamente cuando haya disponible una molécula de oxígeno, el electrón pasará de un grupo hemo al otro y terminará reduciendo la molécula de oxígeno. En el caso de NOX4, DUOX1 y DUOX2, el  $O_2^-$  se transforma inmediatamente en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) antes de salir del complejo. Se desconoce el mecanismo implicado en esta conversión, aunque sí se sabe que al menos en NOX4 el lazo E que conecta la quinta y sexta hélice transmembrana y, que es distinto en dicha isoforma, está implicado.<sup>88</sup> Para ser totalmente activos y llevar a cabo su función, todos los miembros de la familia requieren de una o varias moléculas activadoras. Pese a que la secuencia de todas las NOX está altamente conservada, cada isoforma requiere de distintas moléculas para su activación. La existencia de hasta 6 proteínas necesarias para la activación completa de alguno de los complejos y el hecho de que la mayoría de estas proteínas sean exclusivas para la activación de NOX, refleja la importancia que tiene la regulación de la actividad de estas proteínas para la célula. Dos son las moléculas

activadoras más representativas puesto que separan a la familia en dos grupos:  $p22^{phox}$  y  $Ca^{2+}$ . NOX1-4 requieren de  $p22^{phox}$  para su actividad, mientras que NOX5 y DUOX1-2 necesitan la unión de  $Ca^{2+}$  para su activación. Sin embargo, para la completa activación de algunos miembros de la familia de las NOX son necesarias más subunidades. Nos centraremos en describir las requeridas por NOX2 (Figura 8). NOX2 fue el primer integrante de la familia que se describió y, a raíz de esto, el que se ha utilizado como referencia. Se identificó en los años 70 en fagocitos como la proteína responsable del estallido respiratorio.<sup>89</sup> Cuenta con 5 subunidades reguladoras:

- $p22^{phox}$  (codificado por el gen *CYBA*). Junto con la subunidad catalítica de NOX2,  $gp91^{phox}$  (codificado por *CYBB*), forma el citocromo  $b_{558}$ . Son las dos únicas proteínas transmembrana del complejo. Estas dos subunidades están íntimamente relacionadas ya que se estabilizan mutuamente.<sup>90</sup> Además,  $p22^{phox}$  contiene el punto de anclaje de  $p47^{phox}$  y, por tanto, constituye el punto de unión con el resto de subunidades del complejo.  $p22^{phox}$  se fosforila por PKC, lo cual desencadena la unión de  $p47^{phox}$  y la activación del complejo.
- $p47^{phox}$  (codificado por *NCF1*). Es la subunidad organizadora del complejo ya que une las subunidades citosólicas  $p47^{phox}$ ,  $p67^{phox}$  y  $p40^{phox}$  -complejo citosólico, que puede encontrarse unido e inactivo en ausencia de estímulo- con el citocromo  $b_{558}$ . Regularmente,  $p47^{phox}$  se encuentra inactivo en la célula ya que tiene un dominio autoinhibitorio.<sup>91</sup> Solo en presencia de estímulos se activa su fosforilación, que puede estar mediada por diferentes quinasas -PKC la más descrita-, y se induce su transporte a membrana para promover su unión a  $p22^{phox}$ . Algunos estudios cuestionan que la presencia de  $p47^{phox}$  sea esencial para la activación del complejo, aportando nueva información sobre su papel como mediador de la interacción de otras subunidades.<sup>92</sup> La proteína NoxO1 es una proteína homóloga a  $p47^{phox}$  que ejerce una función similar en los complejos NOX1 y NOX3.
- $p67^{phox}$  (codificado por *NCF2*). Pese a que todos los estudios del complejo NOX2 definen a esta subunidad como la principal clave en la activación del complejo, aún hay mucho desconocimiento alrededor de su función. Parece que, del mismo modo que  $p47^{phox}$ ,  $p67^{phox}$  tiene una región autoinhibitoria, pero se desconoce su mecanismo y regulación. Asimismo, las últimas investigaciones indican que la unión de  $p67^{phox}$  al citocromo  $b_{558}$  induciría un cambio conformacional de  $gp91^{phox}$  acercando las zonas de unión a NADPH y FAD,<sup>92</sup> lo cual favorecería el paso de

- electrones de la primera a la segunda, y activaría la función del complejo. En los complejos NOX1 y NOX3 la funcionalidad de p67<sup>phox</sup> se lleva a cabo por NoxA1.
- p40<sup>phox</sup> (codificado por *NCF4*). Ha sido la última de las subunidades descubiertas, por lo que se conoce poco de su participación en el complejo. Se une al complejo a través de p67<sup>phox</sup> y su fosforilación por PKC aumenta su afinidad a esta subunidad.<sup>93</sup> Su función parece meramente reguladora.
  - Rac (codificado por *RAC1*). Es una GTPasa pequeña que pertenece a la familia de las GTPasas Rho. Todas las GTPasas pequeñas, incluida la familia Rho, funcionan alternando entre los estados activo unido a GTP e inactivo unido a GDP. Rac en estado activo es necesario para completar la unión de p67<sup>phox</sup> al complejo NOX2 o NOX3 y NoxA1 a NOX1 o NOX3.<sup>94</sup> Se ha visto que la regulación por oxidación de Rac puede establecer un bucle de regulación positiva que mantiene el complejo NOX2 activo.<sup>95</sup>

Aparte de las mencionadas, DuoxA1 y DuoxA2 participan en el transporte y estabilización de DUOX1 y DUOX2, respectivamente.

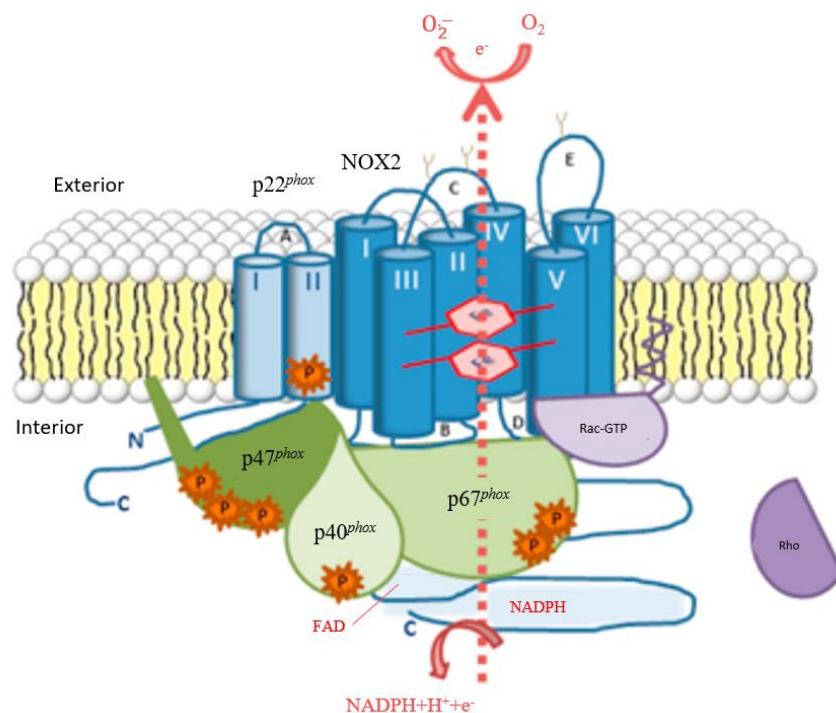


Figura 8. Complejo NOX2 activo. Adaptada de <sup>96</sup>.

La información que extraemos de lo anteriormente descrito es que las NOX son una familia de 7 enzimas con la misma función, pero con distintos mecanismos de regulación lo cual permite a la célula controlar su activación por distintos mecanismos moleculares

consiguiendo gobernar el cómo y cuándo de su funcionalidad de forma rigurosa. Otra manera que tiene la célula de regular el efecto de las NOX es su localización subcelular y, a mayor escala, tisular. En cuanto a la localización subcelular, todos los complejos de las NOX se han localizado en membrana plasmática, de hecho, NOX3, DUOX1 y DUOX2 solo se han encontrado en esta membrana celular. Sin embargo, el resto de miembros de la familia también aparecen en otros orgánulos. Por ejemplo, NOX1, NOX2, NOX4 y NOX5 se han encontrado también en retículo endoplásmico y en las membranas nucleares<sup>97</sup> y, recientemente, se ha demostrado que NOX4 también puede localizarse en la membrana mitocondrial interna y actuar como sensor energético con capacidad de modificar enzimas clave que podrían reprogramar el metabolismo de la célula.<sup>98</sup> A nivel tisular, la mayoría de las NOX se expresan en una gran variedad de tejidos, pero resulta significativo que en ciertos tejidos la expresión de alguna de las isoformas de las NOX es abundantemente mayoritaria. Por ejemplo, NOX2 tiene altos niveles de expresión en tejidos con mucha presencia de células hematopoyéticas como médula ósea, bazo y nódulos linfáticos. NOX3 tiene mucha presencia en el oído interno, donde resulta fundamental para una correcta biosíntesis de la otoconia y el mantenimiento del equilibrio corporal. NOX4 es la isoforma de NOX más expresada en riñón, donde parece estar implicada en la generación de nefropatías, aunque aún se desconocen los mecanismos. El ARNm de NOX5 se expresa en los espermatozoides de los testículos y en las áreas ricas en linfocitos B y T del bazo y los ganglios linfáticos. DUOX1 y DUOX2 se expresan mayoritariamente en el tiroides, donde han demostrado tener un papel importante en la síntesis de hormonas tiroideas. Por último, NOX1 no ha mostrado una expresión tan distintiva en ningún tejido, aunque principalmente aparece en colon, próstata, útero y músculo liso vascular. El diferente patrón de expresión que presentan las NOX evidencia distintos roles fisiológicos de estas enzimas en los tejidos donde actúa.

#### **1.4.3. Las especies reactivas del oxígeno están implicadas en señalización celular**

La existencia de una familia de enzimas específicamente productora de ROS puso en entredicho la creencia de que las ROS fueran meros desechos metabólicos. Hace poco más de dos décadas, se comenzó a discernir el posible papel que las ROS realmente tienen en la biología celular. En la actualidad, sabemos que las ROS participan en la regulación de multitud de vías de señalización como NF- $\kappa$ B, MAPKs, Nrf2, PI3K-Akt... una lista que sigue ampliándose día a día con nuevas proteínas que se descubren bajo la regulación

de ROS. Tras veinte años estudiando esta cuestión, todavía hoy tenemos muchas incertidumbres sobre cómo las ROS pueden modificar de forma específica a determinadas proteínas. Hay varios factores que afectan a la capacidad de las ROS para modular la señalización:

- Su reactividad. Moléculas como el ácido hipocloroso y el peroxinitrito son altamente reactivos, con capacidad indiscriminada de oxidar cualquier molécula a su alcance. Por la dificultad que implica controlar su acción, no van a poder actuar como moléculas señalizadoras. Al contrario, el óxido nítrico tiene una reactividad muy baja que hace totalmente imposible que actúe en condiciones fisiológicas.
- La cinética de las reacciones biológicas. Los estudios de reactividad comúnmente se llevan a cabo en condiciones aisladas con un único sustrato. Con un único sustrato no hay alternativas, mientras que fisiológicamente la competición entre numerosas dianas potenciales y las condiciones a las que se desarrolla la reacción determinan los parámetros de esta. Por ejemplo, la afinidad del superóxido por la superóxido dismutasa (SOD) es tan alta que en cuanto se produce en la célula inmediatamente es transformado a peróxido de hidrógeno, por lo que oxida relativamente pocos compuestos *in vivo*. En cambio, el  $H_2O_2$  ha demostrado tener una vida media larga y alta reactividad únicamente con los tioles con baja  $pK_a$  en condiciones fisiológicas, como son los de las tirosina fosfatasas o las peroxirredoxinas.<sup>99</sup> De este modo, una producción controlada de  $H_2O_2$  oxidaría únicamente a las proteínas con alta afinidad al  $H_2O_2$  pero no provocaría una oxidación masiva.

- El lugar donde se producen las ROS. La producción específica de ROS, y por tanto la que presumiblemente será la responsable de la señalización mediada por ROS (o señalización redox), es la que se da por las NOX. Las NOX son proteínas que se han encontrado mayoritariamente en la membrana plasmática. Como se observa en la Figura 8, su disposición en la membrana plasmática provoca que las ROS generadas se expulsen al exterior celular. Sin embargo, su función señalizadora la realizan en el citoplasma por lo que es fundamental entender cómo se transportan las ROS. En el resto de orgánulos donde se expresan las NOX ocurre lo mismo: las ROS se expulsan a un compartimento distinto al que van a desarrollar su función. La molécula de superóxido que se produce en la

mayoría de las NOX está cargada negativamente y requeriría del uso de transportadores para atravesar la membrana. Mientras,  $H_2O_2$  difunde libremente a través de la membrana, lo cual le da cierta ventaja con respecto a la mayoría de las ROS que tienen carga.

Asimismo,  $H_2O_2$  se ha postulado como la RONS más probable para realizar la función de señalización redox por su moderada reactividad, su libre transporte a través de las membranas celulares y su larga vida media. Sin embargo, no todas las proteínas que se oxidan tienen tioles con baja  $pK_a$  como para ser diana de  $H_2O_2$ . Una posibilidad que no se ha contrastado es que las piroredoxinas actúen como intermediarios o sensores de  $H_2O_2$  mediando la oxidación de otras proteínas.<sup>99</sup> Queda aún mucho por explorar acerca de la biología de las RONS.

Las proteínas susceptibles de ser oxidadas son aquellas con residuos de cisteína, metionina o residuos aromáticos preferiblemente expuestos o bien las metaloproteínas. De todos estos, la oxidación de los residuos de cisteína ha sido la más estudiada puesto que estos residuos suelen desempeñar funciones clave en la funcionalidad de las proteínas. Entre las funciones más conocidas se encuentran la defensa antioxidante, la catálisis, la estructura de las proteínas y la detección y regulación redox. Las cisteínas tienen cuatro estados de oxidación en los que consecutivamente este residuo va perdiendo electrones: radical tiol, ácido sulfénico, ácido sulfínico y ácido sulfónico. Las modificaciones a ácido sulfénico y sulfínico de la cisteína pueden revertirse mientras que la oxidación hasta ácido sulfónico resulta irreparable e implica que la proteína deba ser degradada por el proteasoma.

Sin embargo, este mecanismo anárquico contrasta con el férreo control de otros programas post-transcripcionales sometidos a regulación enzimática como la fosforilación, ubiquitinación... y no se ajusta a las reglas de un sistema regulador apropiado: reversibilidad, especificidad y sensibilidad a los cambios en el medio intra y extracelular.<sup>100</sup> Por ello, algunos autores apoyan la opción de dos procesos intermedios controlados: S-glutationilación y S-nitrosilación. Estas reacciones consisten en la adición de un glutatión (GSH) o un nitrosilo al tiol de la cisteína, formando un puente disulfuro entre proteína y GSH o una unión covalente S-NO, respectivamente. Se ha visto que esta modificación puede ser bien activadora o inhibidora de la actividad y la función dependiendo de la proteína. Tradicionalmente, se ha creído que GSH/GSSG y NO/GSNO

intercambian electrones espontáneamente con ROS y proteínas, ya que las reacciones son termodinámicamente favorables. Sin embargo, estas reacciones ocurrirían demasiado lenta e inespecíficamente como para producirse en un contexto real por lo que dependen de enzimas,<sup>101</sup> haciendo de la S-glutacionilación y la S-nitrosilación claros candidatos a procesos reguladores redox. Sin embargo, dada la falta de sondas específicas para diferentes ROS, así como la labilidad de estos ligandos, es muy difícil determinar qué proceso de oxidación es responsable de una modificación en la función de una enzima,<sup>102</sup> por lo que la investigación de estos procesos es difícil y todavía tiene largo recorrido.

#### **1.4.4. Sistemas antioxidantes**

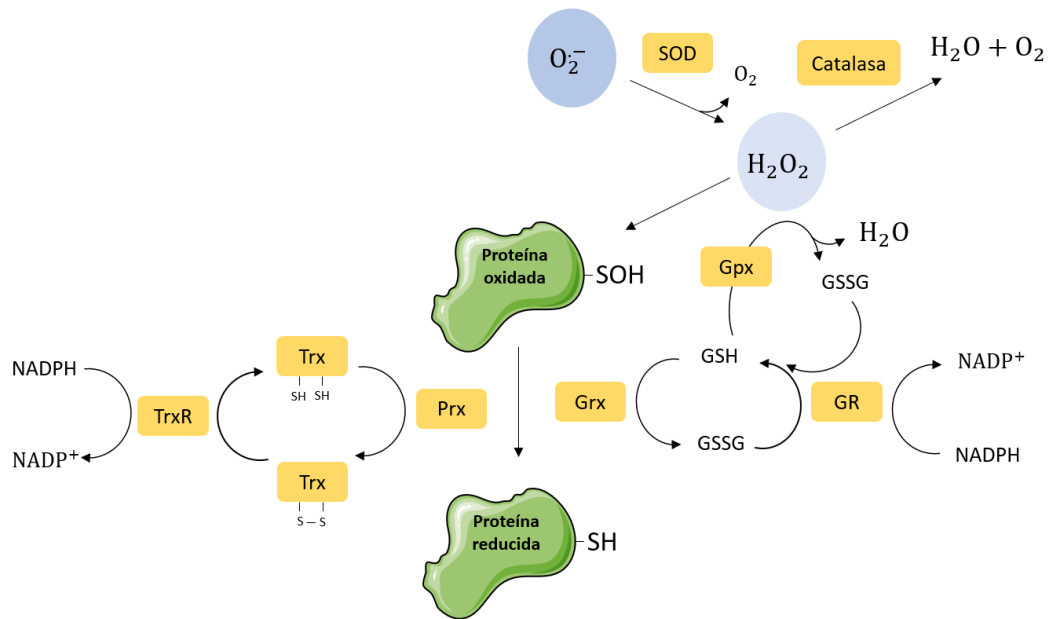
Acabamos de describir que la regulación de proteínas por oxidación es un proceso reversible. Para garantizar esta reversibilidad el organismo ha desarrollado una serie de sistemas que lo protegen de las condiciones de estrés oxidativo. El denominado sistema antioxidante es un conjunto de moléculas con capacidad de mitigar o reducir la reactividad de las moléculas oxidantes presentes en el organismo. Está formado por antioxidantes enzimáticos, moléculas hidrofílicas como glutatión, ascorbato, urato o flavonoides y moléculas lipofílicas como carotenoides (entre otros, vitaminas), ubiquinol o tocoferol. Algunos de estos son ingeridos en la dieta (flavonoides, vitaminas, otros carotenoides), pero otros son sintetizados de forma endógena. De este modo, el organismo tiene dos maneras de regular a estos mecanismos: controlando su síntesis o controlando su actividad. En este punto es donde los antioxidantes enzimáticos ganan interés (Figura 9). A continuación, describiremos brevemente las principales características de los antioxidantes enzimáticos:

- Superóxido dismutasa (SOD). Su acción implica la dismutación de dos moléculas de  $O_2^-$  en  $H_2O_2$  y  $O_2$ . Hay tres tipos de SOD en la célula con distinta localización subcelular: CuZnSOD en el citoplasma, MnSOD en la mitocondria y SOD extracelular.
- Catalasa. La catalasa convierte el  $H_2O_2$  en agua y  $O_2$ . Ejerce su acción gracias a un grupo hemo que tiene en su centro activo que le permite llevar la reacción en dos pasos: un primero donde toma una molécula de  $H_2O_2$  y la reduce a agua y un segundo paso donde toma una nueva molécula de  $H_2O_2$  y cede los electrones que había captado expulsando agua y  $O_2$ .

- Peroxirredoxinas (Prx). Es una gran familia de enzimas con capacidad de procesar grupos peróxido de proteínas o  $H_2O_2$  y transformarlos a grupos alcohol o agua respectivamente. Pueden llevar a cabo su función gracias a un residuo de cisteína altamente conservado en su sitio activo y una cisteína de apoyo, con la que normalmente forma un puente disulfuro de estabilización tras oxidarse. Consta de 6 subfamilias que se diferencian en la localización de la cisteína de apoyo y en su forma de oligomerizar. Es susceptible de hiperoxidarse, (es decir, aceptar dos átomos de oxígeno) y, en tal caso, podría reciclarse gracias a la acción de sulfirredoxina. Como hemos dicho previamente, cada vez son más los estudios de grupos que trabajan en sistemas antioxidantes que focalizan la atención sobre las peroxirredoxinas. Esto es debido a que sus características de afinidad al  $H_2O_2$ , su capacidad de interactuar con la oxidación de las proteínas y su resistencia a la hiperoxidación los hacen tremendamente útiles como intermediarios de la señalización redox.<sup>103</sup>
- Tiorredoxinas (Trx). Son enzimas que pueden reducir eficazmente los enlaces disulfuro de las proteínas generados por el  $H_2O_2$ . De hecho, también actúan en el ciclo de reciclaje de las Prx, reduciendo los grupos de cisteína oxidados del Prx para formar un nuevo enlace disulfuro en el centro altamente conservado de las Trx. A su vez, las Trx se regeneran gracias a la reducción de sus cisteínas por la Trx reductasa (TrxR) y el NADPH.
- Sistema glutatión. Ha lugar a hablar detalladamente de este sistema antioxidante por lo que dedicaremos el siguiente apartado al completo.

El complejo intrincado de sistemas antioxidantes refleja la importancia evolutiva de evitar un fuerte incremento en la producción de ROS, que provocaría un aumento del estrés oxidativo lo que podría derivar en daño del ADN, peroxidación lipídica y alteración del funcionamiento de las vías de señalización por un aumento en los tioles oxidados.





**Figura 9. Sistemas antioxidantes enzimáticos.** SOD: superóxido dismutasa; Prx: peroxirredoxina; Trx: tioredoxina; TrxR: tioredoxina reductasa; Grx: glutarredoxina; Gpx: glutatión peroxidasa; GR: glutatión reductasa. Adaptada de <sup>104</sup>.

#### 1.4.5. Sistema glutatión

El glutatión (GSH) es el tiol más abundante en el citoplasma de las células, se mantiene a una concentración entre 0,5-10mmol/l en células animales.<sup>105</sup> Por ello, es considerado una de las primeras y más importantes barreras frente al estrés oxidativo. GSH es un tripéptido formado por glutamato, cisteína y glicina. Su síntesis consta de dos etapas ATP dependientes consecutivas, una primera en la que la  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetasa (GCS) une glutamato y cisteína y una segunda reacción catalizada por GSH sintetasa a través de la cual se incorpora glicina a la  $\gamma$ -glutamilcisteína. A nivel endógeno, se ha comprobado que la GCS es de las dos enzimas la más determinante controlando el ratio de síntesis de nuevo GSH.<sup>106</sup> Su expresión se activa por factores de transcripción de respuesta a estrés oxidativo como NRF2, ARE, NF- $\kappa$ B, AP-1 entre otros. La síntesis de *novo* de GSH también puede verse afectada por los niveles de sus precursores y por la retroalimentación negativa que ejerce GSH sobre la GCS. En la mayoría de los tipos de células, estas reacciones tienen lugar exclusivamente en el citosol.<sup>107</sup> No obstante, a pesar de la localización subcelular restringida de la biosíntesis del GSH, se cree que el glutatión está presente en la mayoría de los compartimentos subcelulares. El glutatión es una molécula cargada negativamente a pH fisiológico y no puede difundirse libremente a través de las bicapas lipídicas. Así pues, en conjunto, estas observaciones implican que

deben existir transportadores capaces de mediar la importación y/o exportación de GSH. Sin embargo, se desconoce la identidad, localización y mecanismo de la mayoría de los transportadores de glutathione que presumiblemente existen,<sup>107</sup> haciendo de este un campo interesante para futuras investigaciones.

Los tres aminoácidos requeridos para la síntesis de GSH pueden obtenerse exógenamente o sintetizarse a partir de otras fuentes de carbono. El glutamato se obtiene de la glutamina u otros aminoácidos, como se ha descrito previamente. La glicina puede producirse a partir de serina o treonina.<sup>108</sup> La serina puede crearse de *novo* a partir de la glucosa a través de una serie de enzimas que convierten el 3-fosfoglicerato en serina.<sup>108</sup> Por su parte, la cisteína puede sintetizarse por transulfuración a partir de la metionina. Hay datos convincentes que apoyan que la cisteína es generalmente el aminoácido limitante para la síntesis de GSH en humanos.<sup>105</sup> Por lo tanto, los factores clave que regulan la producción intracelular de GSH serán: la dieta, el transporte de membrana de cisteína y metionina, y la regulación de la vía de transulfuración, que se encuentra particularmente activa en hígado.

GSH tiene diversas funciones a nivel fisiológico. Es sustrato de la formaldehído deshidrogenasa donde participa en la metabolización de formaldehído, un metabolito carcinogénico que se produce como producto secundario en el metabolismo de la metionina, colina y metanol mayoritariamente. Participa en la transformación de prostagladina H<sub>2</sub> en D<sub>2</sub> y E<sub>2</sub>. Pero principalmente es utilizado por la célula para la neutralización de radicales libres y otras ROS y controlando vías de señalización redox por medio de la S-glutathionilación y la S-nitrosilación.

El sistema glutathione consta de tres enzimas (Figura 9): glutathione peroxidasa (Gpx), glutathione reductoxinas (Grx) y glutathione reductasa (GR). El peróxido de hidrógeno producido endógenamente es reducido por GSH en presencia de Gpx, que es selenio dependiente. En el proceso, el GSH se oxida a GSSG, que puede reducirse de nuevo a GSH para ser nuevamente utilizado. Este proceso lo lleva a cabo la GR a expensas del NADPH. Los grupos tiol oxidados de las proteínas pueden ser recuperados por las Grx, que utilizarán GSH para regenerarse. El GSSG producido podrá ser igualmente reducido por GR. Otros peróxidos orgánicos, por ejemplo los derivados de la peroxidación lipídica, también pueden ser reducidos por la Gpx y la GSH S-transferasa. Precisamente, las GSH S-transferasas son enzimas con actividad paralela a este sistema. Su función consiste en conjugar un grupo glutathione a compuestos electrofílicos. Así, participan en la

detoxificación de productos xenobióticos, pero también realizan una importante función modulando la actividad de las proteínas ya que son las responsables del proceso de S-glutationilación.<sup>101</sup> Las enzimas de la familia de las Trx, especialmente las Grx, catalizan eficazmente la deglutationilación.<sup>101</sup>

#### 1.4.6. Especies reactivas del oxígeno en hematopoyesis y leucemogénesis

Las ROS han demostrado tener un papel importante en la generación de células hematopoyéticas maduras, normales y leucémicas.<sup>85</sup> Ambos casos, normal y aberrante, dependen de las células progenitoras de la médula ósea. Son de especial importancia las HSC o LSC por su naturaleza iniciadora y con capacidad de renovación de la médula ósea. Sus principales características son la autorrenovación y la quiescencia para lo cual estas células se sitúan en un nicho de condiciones muy específicas que les permiten llevar un metabolismo bajo, con bajos niveles de estrés. La inducción extrafisiológica de estrés oxidativo perjudica la capacidad de reconstitución de las HSC.<sup>109</sup> Al igual que someter a las células a trasplantes seriados, que se ha visto que incrementa los niveles de ROS y daña la funcionalidad de las HSC.<sup>110</sup> Sin embargo, suprimir totalmente los niveles de ROS conlleva que las HSC pierdan su capacidad de diferenciación y consecuentemente de reconstitución.<sup>111</sup> Se ha visto que dentro del conjunto de HSC, hay poblaciones con baja capacidad de diferenciación, más especializadas en mantener HSC remanente, denominadas *long-term* HSC (HSC a largo plazo) y poblaciones más dispuestas para la diferenciación, con mayor capacidad de reconstituir, denominadas *short-term* HSC (HSC a corto plazo). Las primeras tienen menores niveles de ROS que las segundas.<sup>110</sup> Con todo lo descrito queda claro que mantener niveles de ROS equilibrados es fundamental para el correcto funcionamiento de las HSC. En este sentido, se han encontrado varios genes clave en el mantenimiento de los niveles de ROS en las HSC<sup>72,85</sup>: los factores de transcripción FoxO, *HIF1α*, el complejo 1 de la esclerosis tuberosa (*TSC1*), *p53*, el gen mutado de la ataxia-telangiectasia (*ATM*) y el *BM11* del grupo polycomb. Otro sistema de control de las ROS que comparten HSC y LSC se origina gracias a su interacción con el nicho. Se ha visto que tanto HSC como LSC establecen conexiones con las células de su microambiente para transferirles ROS en caso de sobrecarga oxidativa.<sup>65,112</sup> Y este mecanismo puede darse en las dos direcciones puesto que se ha visto que las células del nicho pueden transferir mitocondrias a las HSC para inducir la diferenciación hematopoyética<sup>113</sup> o moléculas antioxidantes a las LSC<sup>33</sup> para que lidien con sus altos niveles de ROS derivados de su metabolismo OXPHOS dependiente y de las alteraciones

protumorigénicas. Cabe recordar que la principal barrera contra esa mayor cantidad de ROS en las LSC es el aumento de la expresión de genes antioxidantes.<sup>64</sup>

La inducción de la diferenciación hematopoyética se acompaña de un incremento de los niveles de ROS, sin los que el proceso no alcanza su completa activación. Por ejemplo, la megacariopoyesis, que se induce mediante la citoquina TPO, se produce gracias a un incremento de ROS mediado por una NADPH p22<sup>phox</sup> dependiente.<sup>114</sup> Otro ejemplo, es el incremento de ROS inducido por *AKT1* y *AKT2*, que es fundamental para la capacidad reconstitutiva de las LT-HSC.<sup>111</sup> Y es que los niveles de ROS se incrementan durante la diferenciación hematopoyética.<sup>115</sup> Así, los niveles de ROS en los progenitores mieloides son más elevados que en las HSC y menos que en sus sucesores maduros.<sup>116</sup> Publicaciones recientes sugieren la implicación de las NOX en la diferenciación de macrófagos<sup>117</sup> o granulocitos.<sup>118</sup> NOX2 induce la movilización de las HSC<sup>119</sup> y su proliferación<sup>118</sup> y se ha descrito como el regulador de la transferencia de mitocondrias de las células mesenquimales del nicho a las HSC.<sup>120</sup>

Las células cancerosas tienen altos niveles de ROS, aunque se desconoce si como respuesta de las condiciones metabólicas oncológicas o como motor para el desarrollo del fenotipo tumoral. ROS promueve la proliferación celular, activa vías de evasión de la apoptosis y puede inducir quimioresistencia confiriendo al tumor grandes ventajas adaptativas y, en esencia, participando en la transformación tumoral.<sup>121</sup> Las células leucémicas no son una excepción. El estrés oxidativo se ha relacionado con la leucemia linfocítica crónica,<sup>122</sup> leucemia linfocítica aguda<sup>123</sup> y leucemia linfoblástica aguda de células T,<sup>124</sup> leucemia mieloide crónica<sup>125</sup> y LMA.<sup>126</sup> El papel de las ROS en la leucemogénesis y más concretamente en la progresión de los trastornos mieloides ha sido revisado en varias ocasiones,<sup>72,127-129</sup> así que nos centraremos en citar lo que se conoce sobre la influencia de las NOX en este proceso. La incrementada concentración de ROS de múltiples desórdenes hematopoyéticos ha sido vinculada con la actividad NOX: en distintos tipos de LMA,<sup>126</sup> leucemia mieloide crónica,<sup>130</sup> leucemia mielomonocítica crónica,<sup>131</sup> leucemia de células peludas<sup>132</sup> o leucemia de células T.<sup>133</sup> La acción de algunos de los oncogenes más estudiados en leucemia mieloide como *BCR-ABL*,<sup>133</sup> *FLT3-ITD*<sup>134</sup> o *Ras*<sup>135</sup> están mediados por una fuerte activación de las NOX. Concretamente, NOX2 como miembro de la familia de las NOX más representado en las células mieloides, ha demostrado regular la capacidad de autorrenovación de LSC,<sup>136</sup> la expansión de células leucémicas<sup>137</sup> y mecanismos de quimiorresistencia<sup>138</sup> de las células leucémicas de LMA.

### 1.5. Especies reactivas del oxígeno y metabolismo

Por separado, hemos visto la trascendencia de ROS y metabolismo para el desarrollo de las células de la sangre en condiciones normales y leucémicas. Ahora, resulta pertinente profundizar en las conexiones que se han establecido entre estos dos mecanismos, centrándonos en la regulación que la señalización redox ha demostrado sobre el metabolismo.<sup>72</sup> Hay varias enzimas del metabolismo de la glucosa que son dianas de ROS.

A nivel glucolítico, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y PK presentan residuos que han demostrado ser susceptibles de modificación redox. GAPDH es la enzima que cataliza la conversión de gliceraldehído-3-fosfato a 1,3-bisfosfoglicerato (Figura 4). Contiene múltiples residuos de cisteína libres, de los cuales varios están localizados en el sitio activo de la proteína. Cys-152 ha demostrado ser diana tanto de oxidación como de modificaciones postraduccionales derivadas de la oxidación, que provocan la inhibición de su actividad enzimática.<sup>139</sup> Por otro lado, PK, que como se ha descrito previamente, tiene varias isoformas que catalizan la transformación de fosfoenolpiruvato a piruvato y que presentan distinta afinidad a sustrato y distintos mecanismos de regulación. La oxidación de la Cys-358 de PKM2 se asocia a una menor actividad enzimática gracias a promover la conformación dimérica inactiva de la proteína.<sup>140</sup>

Entre las enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos,  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa,<sup>141</sup> isocitrato deshidrogenasa y aconitasa<sup>142</sup> se han visto inhibidas por oxidación, mientras que la succinato deshidrogenasa se activa por glutationilación.<sup>143</sup> Por otro lado, la entrada de glucosa al ciclo de los TCA también está regulada por oxidación. Tanto la PDH como las PDK son susceptibles de oxidación. La PDH<sup>144</sup> y PDK<sup>145</sup> se inactivan en condiciones oxidantes. Como ya se ha descrito, la inhibición de la PDK activará a la PDH. De este modo, los efectos de la oxidación sobre el complejo PDH parecen contradictorios, dando muestra del complejo enredo en que consiste la regulación redox, de la que todavía quedan numerosas cuestiones por descubrir. De cualquier modo, la mitocondria constituye un espacio ideal para los procesos de oxidación y, especialmente de glutationilación, debido a la alta producción de ROS y a una muy elevada concentración de GSH. Además, el bombeo de protones de la ETC al espacio intermembrana provoca la alcalinización de la matriz, lo cual favorece el estado ionizado de los residuos de cisteína de las proteínas mitocondriales.

De hecho, los complejos de la ETC también se han visto modificados por oxidación. Ya hemos hablado del complejo II, la succinato deshidrogenasa, que se activa por glutatiónilación. Pero, al contrario, las ROS también han demostrado ser capaces de reducir el flujo de electrones al inhibir a los complejo I, III, IV y V.<sup>146,147</sup>

### **1.5.1. Especies reactivas del oxígeno y metabolismo en leucemia mieloide aguda**

Tomando todo lo descrito en conjunto, nos encontramos distintos escenarios en las células leucémicas. Las células leucémicas en masa, aunque heterogéneas y muy flexibles, se caracterizan por presentar un metabolismo glucolítico predominante y realizan un menor uso del metabolismo mitocondrial. Asimismo, algunas de las proteínas clave que regulan el flujo en el ciclo los TCA están alteradas en la leucemia. Una baja actividad de la aconitasa,<sup>148</sup> la sobreexpresión de PDK2<sup>149</sup> y PKM2 inactiva,<sup>150</sup> o las relativamente frecuentes mutaciones de IDH<sup>151</sup> dan lugar a una ralentización del ciclo de los TCA. También se produce una disminución de la actividad de los complejos mitocondriales.<sup>78</sup> Por el contrario, los principales inductores de señalización de la glucólisis suelen estar sobreactivados en la leucemia: AMPK,<sup>152</sup> ATM<sup>153</sup> y HIF1 $\alpha$ .<sup>60</sup> Curiosamente, este fenotipo metabólico se expresa conjuntamente con un alta presencia de ROS, que podrían estar induciendo los cambios metabólicos mencionados. En apoyo de esta hipótesis, el complejo II, único complejo cuya oxidación produce un aumento de la actividad, es el único que presenta una actividad más elevada en las células de LMA.<sup>78</sup> Por su parte, las LSC, a diferencia de las células masivas, tienen bajos niveles de ROS, son más dependientes de OXPHOS y requieren de los intermediarios del ciclo de los TCA y de la oxidación de ácidos grasos como fuentes de energía.<sup>68</sup>

En cuanto a las NOX como fuentes de ROS, ya hay dos publicaciones que señalan que las ROS producidas por las NOX regulan el metabolismo celular en LMA.<sup>154,136</sup> La producción de ROS por NOX2 ha demostrado activar la glucólisis incrementando los niveles de 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bifosfatasa, a través del aumento de la expresión de *UCP2* que induce la activación de la vía de las MAP quinasas.<sup>154</sup> Por otro lado, Adane *et al.* observaron que la depleción de NOX2 en LSC reduce el metabolismo de la glucosa y aumenta la dependencia de las células por el metabolismo lipídico.<sup>136</sup>

### 1.5.2. Especies reactivas del oxígeno y metabolismo como estrategias terapéuticas en leucemia mieloide aguda

La gran implicación de ROS y metabolismo sobre el desarrollo y progreso leucémico ha llevado a que en los últimos tiempos se ponga el foco sobre estos procesos para su uso como dianas terapéuticas.

Existe un gran número de estrategias farmacológicas que permiten aumentar o disminuir los niveles celulares de ROS. Aumentar los niveles de ROS llevaría a las células tumorales a una situación de estrés oxidativo incompatible con la viabilidad celular. Tratamientos muy frecuentes como el trióxido de arsénico<sup>155</sup> utilizado para tratar la leucemia promielocítica aguda, la citarabina<sup>156</sup> utilizada para tratar la LMA, o el bortezomib,<sup>157</sup> utilizado para tratar el mieloma múltiple, promueven un aumento de las ROS. En los últimos años se han propuesto nuevas estrategias prooxidantes que han llegado a ensayos clínicos, por ejemplo, inhibidores de los sistemas antioxidantes o activadores de las NOX.<sup>85</sup> Por otro lado, si las células tumorales dependen de altos niveles de ROS para su crecimiento, la reducción de los niveles de ROS también podría ser una estrategia terapéutica adecuada. El interés por la familia de las NOX como diana terapéutica ha aumentado recientemente, donde algunos inhibidores específicos de estas enzimas ya han entrado en ensayos clínicos.<sup>85</sup> Algunas publicaciones apoyan la posibilidad de utilizar NOX2 como diana contra la neoplasia mieloproliferativa,<sup>135</sup> la leucemia mieloide crónica<sup>130,158</sup> y la LMA.<sup>159</sup> Otras fuentes de ROS como la xantina oxidorreductasa<sup>160</sup> o IDH1<sup>161</sup> también se han propuesto como dianas.

Del mismo modo, el metabolismo también está emergiendo como diana terapéutica debido a la eficacia que están presentando algunas nuevas drogas metabólicas en diferentes tipos de leucemia. Dirigirse al metabolismo es un enfoque interesante, teniendo en cuenta que las HSC pueden permanecer quiescentes ante la falta de nutrientes, mientras que las LSC y las células de masa tienen un metabolismo constitutivamente activo debido a las señales oncogénicas. Ya hay tres estrategias aprobadas por la FDA (*Food and Drug Administration*) para el tratamiento de la leucemia cuyo mecanismo de acción implica la modulación del metabolismo. La primera es la asparaginasa para el tratamiento de la leucemia linfocítica aguda (LLA) en 2006. La asparaginasa se prescribe médicamente para la LLA infantil, pero también se administra a pacientes mayores con LLA aunque con menor eficacia.<sup>162</sup> Otra alternativa son enasidenib, un inhibidor de IDH2, e ivosidenib, un inhibidor de IDH1, fueron aprobados en 2017 y 2019 respectivamente para

el tratamiento de pacientes de LMA con mutaciones *IDH2* o *IDH1*. Enasidenib se aprobó para pacientes refractarios y recidivantes tras un trasplante, pero se retiró en 2019 porque no demostró eficacia suficiente. Ivosidenib ha sido aprobado para pacientes con enfermedad de nuevo diagnóstico o refractaria. Por último, venetoclax (VENCLEXTA®) está aprobado para el tratamiento de tres neoplasias hematológicas: (1) pacientes adultos con leucemia linfocítica crónica que hayan recibido al menos un tratamiento previo; (2) pacientes con linfoma linfocítico pequeño que hayan recibido al menos un tratamiento previo; y (3) en combinación con agentes hipometilantes o citarabina a dosis bajas para el tratamiento de adultos con LMA diagnosticados recientemente que tengan más de 75 años, o que presenten comorbilidades que impidan el uso de quimioterapia de inducción intensiva. Los informes recientes apoyan que venetoclax puede sensibilizar las células de LMA a la quimioterapia,<sup>163</sup> probablemente debido a la eliminación de las LSC y ocasionada por su capacidad de suprimir OXPHOS.<sup>34</sup> Otras opciones de tratamiento de la leucemia con el metabolismo como diana se han revisado recientemente.<sup>164,165</sup>

Otra posible aplicación de estos tratamientos es el trasplante de HSC o trasplante de células madre. Como hemos descrito, mantener unos niveles reducidos de ROS es esencial para garantizar la calidad, la supervivencia y la capacidad de reconstitución de las HSC. Por ello, se han probado algunas condiciones antioxidantes para la extracción y expansión de HSC,<sup>116,166</sup> y recientemente se ha propuesto la manipulación metabólica para lograr el mismo objetivo.<sup>35,167</sup>

Teniendo en cuenta todo lo anterior, es razonable pensar que atacar tanto la producción de ROS como el metabolismo podría ser una estrategia antitumoral eficaz. De hecho, se ha demostrado que la inhibición de NOX4 tiene un fuerte efecto sinérgico con el inhibidor de hexoquinasa (HK) 2-deoxi-D-glucosa en células de glioblastoma.<sup>168</sup>







# **OBJETIVOS**



## **2. OBJETIVOS**

La leucemia mieloide aguda es la leucemia más diagnosticada en adultos. Su abordaje clínico es complejo debido, principalmente, a su gran heterogeneidad. Esto ha ocasionado que durante más de 50 años apenas se hayan introducido mejoras en su diagnóstico y tratamiento. Sin embargo, la revolución de las ciencias ómicas ha provocado que en los últimos 4 años el protocolo médico de diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la enfermedad se haya visto notablemente modificado. La reciente inclusión de varias mutaciones en la determinación pronóstica y la aprobación de hasta nueve nuevos agentes terapéuticos denota que la gestión clínica de la LMA está cambiando y que este tema es de actualidad. Pese a ello, la supervivencia a 5 años de la enfermedad sigue siendo inferior al 30%. La LMA sigue necesitando ser investigada para encontrar nuevas herramientas y dianas terapéuticas que mejoren las perspectivas de estos pacientes.

Dos mecanismos moleculares, el metabolismo y la señalización redox, han demostrado estar involucrados en la hematopoyesis normal y en su versión tumorigénica, la leucemogénesis. Además, estos dos procesos se encuentran interconectados, pudiendo las ROS, principales ejecutoras de la señalización redox, regular el metabolismo y, el metabolismo ser el mayor productor de ROS. Con todo, los mecanismos que gobiernan esta relación redox-metabolismo requieren una investigación más profunda. En este sentido, destacan las NOX por ser el único sistema celular cuya funcionalidad principal es la producción de ROS y, por tanto, tentativamente ser las enzimas clave para regular la señalización redox. Concretamente NOX2, el miembro de la familia de las NOX mayoritariamente expresado en células mieloides, ha mostrado capacidad de alterar el metabolismo en LMA.<sup>136,154</sup> De nuevo, los procesos celulares implicadas en esta conexión deben ser más estudiados.

En base a todo esto, el objetivo de esta tesis es profundizar en el conocimiento de la relación entre NOX2 y el metabolismo en la leucemia mieloide aguda y testar si este eje NOX-metabolismo es una diana terapéutica interesante para el tratamiento de la enfermedad. Este objetivo general se abordó a través de los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar las alteraciones metabólicas y del estado oxidativo inducidas por NOX2 en LMA.

## *Objetivos*

2. Evaluar la combinación de inhibidores metabólicos y de las NOX como estrategia terapéutica frente a la LMA en combinación o no con agentes quimioterápicos.
3. Analizar la relevancia de NOX2 y del metabolismo en el abordaje clínico de la LMA.







# **MATERIALES Y MÉTODOS**



### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

A continuación, se describirá detalladamente el material y los métodos experimentales y estadísticos utilizados para el desarrollo de esta tesis.

#### **3.1. Materiales**

##### **3.1.1. Equipamiento**

###### **3.1.1.1. Aparataje**

- Agitadores Roller mix (Ovan) y Navigator Model 128 Roller Bottle Type Blotter Rotator (BioComp Instruments) y Navigator Model 129 Roller Bottle Type Blotter Rotator (BioComp Instruments).
- Plataforma mezcladora BFR25 (Grant Boekel).
- Autoclaves Steam Sterilizer (Raypa) y Autester-G (Selecta).
- Balanza analítica 40SM-200A (Precisa) y balanza granataria Electronic Scale (Want).
- Baños termorregulables Precistern (Selecta) e Isotemp 105 modelo 2240 (Fisher Scientific), y termostato de inmersión SBS TFB serie B (Mettler).
- Campanas de flujo laminar Bio II A (Telstar) y Class II BSC (ESCO).
- Centrífugas GT2R (Thermo Fisher), Allegra 21R Centrifuge (Beckman), 5810R Centrifuge (Eppendorf), IEC MicroCL 17 y Sorvall Legend Micro 21R (Thermo Electron Corporation).
- Citómetros de flujo FACSCalibur, FACSAria III y FACSlyric (BD bioSciences).
- Sistemas de electroforesis vertical y transferencia Mini-PROTEAN 3 Cell (Bio-Rad).
- Sistemas de electroforesis horizontal MultiSUB Mini (Fisherbrand) (Bio-Rad).
- Unidades de corriente PowerPac Basic y PowerPac HC (Bio-Rad).
- Medical X-Ray processor (Kodak).
- Densitómetro CS-9000 (Shimadzu).
- Documentador de geles Gel Doc XR System (compuesto por Universal Hood II, Universal XR Camera w/MZL y Quantity One Software) (Bio-Rad) y documentador de western por fluorimetría ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad).

- Espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) y espectrofotómetro/fluorómetro DS-11 FX+ (DeNovix).
- Fotómetro de microplacas Multiskan FC (Thermo Scientific).
- Lector multidetección de barrido espectral Varioskan Flash y lector de microplacas multimodo Varioskan LUX (Thermo Scientific).
- Incubador de CO<sub>2</sub> Forma Direct Heat 311 (Thermo Scientific) y Fisherbrand CO<sub>2</sub> Incubator 15660667 (Thermo Scientific).
- Irradiador de fuente de cesio Gammacell 1000 Elite.
- Máquina de revelado para western Medical X-ray Processor 102 (Kodak).
- Microscopio Eclipse TS100 (Nikon), y microscopio IX51 con cámara digital DP70 acoplada (Olimpus).
- pH-metro PB-11 Basic Meter (Sartorius) y sensION pH3 Manual (Hach-Lange).
- Tanque de nitrógeno líquido CryoPlus 3 (Thermo Forma).
- Termocicladores Mastercycler EPgradient (Eppendorf) y StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems).
- Neon Transfection System (Invitrogen).
- Seahorse Xfe24 Analyzer.
- Respirómetro de células MT200A unido a un medidor de canal dual/singular SI782 (Strathkelvin Instruments).
- Bruker Avance III de 800,15 MHz (frecuencia de resonancia 1H), equipado con una sonda de RMN de solución TXI de 5 mm o una sonda MAS de alta resolución HCP de 4 mm, y con cambiadores de muestras automáticos asociados con capacidad de refrigeración (Bruker SampleJet y SamplePro).
- Otros aparatos de uso común en el laboratorio.

#### **3.1.1.2. Herramientas informáticas**

- **Microsoft Office 365 ProPlus suite (Microsoft):** para el análisis y representación de los datos y redacción de este documento.
- **Adobe Illustrator:** para la maquetación de las figuras.
- **GraphPad Prism 8 (GraphPad Software):** para la representación de datos.
- **Software R (versión 3.5.2; <http://www.r-project.org>) y Bioconductor (<http://www.bioconductor.org>):** para los análisis bioinformáticos. Todos los cálculos descritos se implementaron utilizando las librerías *affy*,

*GenomicFeatures*, *limma*, *MultBiplotR*, *MASS*, *pROC*, *survminer* y *factorextra*. Las figuras se generaron utilizando las funciones de las librerías de R *geneplotter*, *ggplot* y *plotly*.

- **Software Matlab:** para el análisis y representación de los datos metabolómicos.
- **ChenomX NMR Suite 8 (ChenomX Inc., Edmonton, Canada) y base de datos metabolómicos HMDB:** para la identificación de los metabolitos de los espectros obtenidos por NMR.
- **Servier Medical ART (SMART):** para el diseño de figuras gráficas. Uso bajo la licencia de Creative Commons Attribution 3.0.
- **Base de datos Gene Expression Omnibus (NCBI):** para la búsqueda y descarga de bases de datos con información de expresión génica de pacientes de LMA.
- **Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID de LHRI) y Gene Set Enrichment Analysis from Webgestalt (GSEA de Broad Institute):** para los análisis de ontología genética.
- **Gene Network (<https://www.genenetwork.nl/>) y GeneMania (<https://genemania.org/>):** para la generación de redes funcionales de genes.
- **Meta-chart (<https://www.meta-chart.com/venn>):** para la realización de gráficos de Venn.
- **SnapGene (Dotmatics), Primer3Plus y SeqBuilder (DNASTAR):** para la visualización, gestión y administración de secuencias de oligonucleótidos.
- **CRISPR Custom Guide RNAs (IDT) y Breaking CAS (Centro Nacional de Biotecnología, CSIC):** para el diseño de secuencias de oligonucleótidos.
- **ClustalOmega (EMBL-EBI) y Jalview (<https://www.jalview.org/>):** para realizar alineamientos múltiples.
- **BD CellQuest Pro (BD Biosciences) y BD FACS Suite (BD Biosciences):** para la adquisición de células en el citómetro.
- **FlowJo v10.5.3 (FlowJo, LLC) y Flowing Software 2 (Turku Centre for Biotechnology):** para el análisis de los datos de citometría.
- **CalcuSyn 2.0.0 (Biosoft):** para analizar los datos obtenidos por ensayos MTT y calcular la concentración de inhibidor capaz de disminuir la proliferación celular a la mitad, IC<sub>50</sub> y los índices de combinación (IC) de las sinergias.
- **StepOne Software v.2.1. (Applied Biosystems):** para el análisis de datos de RT-PCR.

- **ImageLab™ 6.0.1. (Bio-Rad):** para la cuantificación de imágenes de western blot.
- **Wave y Seahorse Analytics (Agilent):** para el análisis de los datos obtenidos mediante la herramienta Seahorse.
- **ImageStudio Lite 5.2 (LI-COR):** para la cuantificación de imágenes de western blot.
- **IBM SPSS Statistics v. 26 y v.28 (IBM):** para el análisis estadístico de los datos.
- **Mendeley:** para la gestión de la bibliografía y la inserción de referencias de esta tesis.

### **3.1.2. Soluciones de trabajo**

- Tampón fosfato salino (PBS; pH 7,4)  
NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM.
- Solución de lisis de la serie roja (cloruro amónico; pH 7,4)  
NH<sub>4</sub>Cl 155 mM; KHCO<sub>3</sub> 10 mM; EDTA 0,13 mM.
- Tampón Tris-EDTA (TE; pH 8)  
Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM.
- Tampón Tris-acetato-EDTA (TAE)  
EDTA 50mM; Tris-HCl 2 M; ácido acético glacial 1M.
- Tampón de lisis MLB  
HEPES 25 mM pH 7,5; NaCl 150 mM; Igepal 1% v/v; glicerol 10% v/v; MgCl<sub>2</sub> 10 mM; EDTA 1 mM; NaF 25 mM; Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM.
- Reactivo de Bradford  
Azul brillante de coomasie 0,01% p/v; etanol 95% 0,05% v/v; ácido ortofosfórico 0,1% v/v.
- Tampón de carga para proteínas (2X; pH 6,8)  
Tris 125 mM; SDS 2% p/v; glicerol 5% v/v; azul de bromofenol 0,003% p/v; β-mercaptoetanol 1% v/v.
- Tampón de electroforesis para WB (pH 8,3)  
Tris 25 mM; glicina 200 mM; SDS 0,1% p/v.
- Tampón de transferencia para WB  
Tris 25 mM; glicina 190 mM; metanol 20% v/v.

- Tinción rojo ponceau  
Rojo ponceau 0,1% p/v; ácido acético glacial 5% v/v.
- Tampón Tris Salino-Tween (TBS – Tween; pH 7,5)  
Tris 10 mM; NaCl 100 mM; Tween-20 0,05% v/v.
- Solución de arrastre de anticuerpos  
Tris-HCl pH 6,8 62,5 mM; SDS 2% w/v; β-mercaptoetanol 100 mM.
- Solución 2X de yoduro de propidio  
Yoduro de propidio 1μg/mL y Ribonucleasa A 2μg/ml en PBS 1X.
- Medio LB (pH 7)  
Triptona 1% p/v; extracto de levadura 0,5% p/v; NaCl 1% p/v.
- Medio de cultivo Seahorse (pH 7,4)  
NaCl 0,1M; Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,01M; KCl 5,4mM; MgSO<sub>4</sub> 0,4mM; Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 0,8mM; HEPES 1mM. El HEPES se añade dependiendo del test siguiendo las indicaciones del comercial. Además, se añade glucosa 1M; piruvato 100mM y glutamina 200mM justo antes de realizar el experimento.
- Solución de Cell-Tak  
Cell-Tak 0,06mg/ml (Fisher Scientific, 10317081); bicarbonato sódico 0,1M; NaOH 0,02M.
- Tampón KET (pH 7,2) para oxigrafía  
KCl 125 mM; Pi 5 mM; Tris·HCl 20 mM; EGTA 0,1 mM; BSA libre de grasas 0,1%.
- Tampón actividad citrato sintasa  
Tris-HCl 150mM; 0,1% p/v Triton con DTNB 150μM, Acetil-CoA 100μM.
- Medio de quimioluminiscencia para test de luminol  
Glucosa 5mM; MgCl<sub>2</sub> 1mM; CaCl<sub>2</sub> 0,5mM; BSA 0,05% p/v.
- Medio reacción Amplex Red (KRPB; pH 7,35)  
NaCl 145mM; fosfato de sodio 5,7mM; KCl 4,86mM; CaCl<sub>2</sub> 0,54mM; MgSO<sub>4</sub> 1,22mM; glucosa 5,5mM.

### 3.1.3. Fármacos

Tabla 4. Fármacos utilizados en esta tesis.

Compuesto	Diana	Efecto	Casa comercial	Referencia
<b>2-desoxi-D-glucosa (2-DG)</b>	Hexoquinasa	Inhibidor	Sigma-Aldrich	D6134
<b>Antimicina A</b>	Complejo III	Inhibidor	Sigma-Aldrich	A8674
<b>Apocinina</b>	NOX	Pan-inhibidor	Sigma-Aldrich	A10809
<b>Citarabina (Ara-C)</b>	ADN polimerasa	Inhibidor	MedChem Express	HY-13605
<b>Daunorubicina</b>	Topoisomerasa	Inhibidor	MedChem Express	HY-13062A
<b>Dicloroacetato (DCA)</b>	PDK	Inhibidor	ChemCruz	sc-203275
<b>Diphenyleneiodonium (DPI)</b>	NOX	Pan-inhibidor	ChemCruz	sc-202584
<b>Etomoxir</b>	CPT1	Inhibitor	Fisher Scientific	NC1003732
<b>FCCP</b>	Membrana mitocondrial	Desacoplante	Sigma-Aldrich	C2920
<b>FX-11</b>	LDH-A	Inhibidor	MedChem Express	HY-16214
<b>GKT137831</b>	NOX1, NOX4	Inhibidor	MedChem Express	HY-12298
<b>GSK2795039</b>	NOX2	Inhibidor	MedChem Express	HY-18950
<b>L-metionina sulfoximina</b>	Glutamina sintetasa	Inhibidor	Sigma-Aldrich	M5379
<b>Oligomicina</b>	Complejo V	Inhibidor	Sigma-Aldrich	495455
<b>Oxamato (Ox)</b>	LDH	Inhibidor	Sigma-Aldrich	O2751
<b>Pherphenazine</b>	NOX	Pan-inhibidor	Sigma-Aldrich	P6402
<b>Forbol 12-miristato 13-acetato (PMA)</b>	NOX	Activador	Fisher Scientific	10061403
<b>Rotenona</b>	Complejo I	Inhibidor	Sigma-Aldrich	R8875
<b>VAS2870</b>	NOX	Pan-inhibidor	MedChem Express	HY-12804

### 3.1.4. Material biológico

#### 3.1.4.1. Líneas celulares



**Tabla 5. Líneas celulares utilizadas en esta tesis.** Los medios de cultivo así como el FBS y la Pen-Step son de la casa comercial Biowest. La normocina y el HEK-Blue Selection son de la casa comercial Invivogen.

Línea celular	Proveedor	Referencia	Condiciones de cultivo
HEK-293T	Cedido por C. Trigueros (INBIOMED Foundation, Donosti, España)		DMEM 10% v/v FBS; 1% v/v Pen-Strep
HEK-Blue	Invivogen		RPMI 10% v/v FBS; 1% v/v Pen-Strep; 100 µg/ml Normocina; 1:250 HEK-Blue Selection
HL60	DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH	ACC-3	RPMI 10% v/v FBS; 1% v/v Pen-Strep
KG1α	DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH	ACC-102	RPMI 20% v/v FBS; 1% v/v Pen-Strep
MOLM-13	DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH	ACC-554	RPMI 10% v/v FBS; 1% v/v Pen-Strep
MV4-11	Cedido por J.M. Hernández-Rivas (IBSAL, España)		IMDM 10% v/v FBS; 1% v/v Pen-Strep
NB4	DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH	ACC-207	RPMI 10% v/v FBS; 1% v/v Pen-Strep
OCI-AML2	Cedido por R.Macías (Universidad de Salamanca, España)		α-MEM 20% v/v FBS; 1% v/v Pen-Strep
THP-1	DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH	ACC-16	RPMI 10% v/v FBS; 1% v/v Pen-Strep

**Tabla 6. Principales características de las líneas celulares utilizadas en esta tesis.**

Línea celular	Grupo FAB	Citogenética y mutaciones representativas
HL60	M2	MYC amplificado
KG1α	M0	Resistentes a quimioterapia. Gen de fusión FGFR1OP2-FGFR1
MOLM-13	M5a	FLT3-ITD
MV4-11	M5b	FLT3-ITD
NB4	M3	PML-RARα
OCI-AML2	M4	Mutación DNMT3A R635W
THP-1	M5b	MLL-AF9

### 3.1.4.2. Células mononucleadas de médula ósea de pacientes diagnosticados con leucemia mieloide aguda

Tabla 7. Pacientes con LMA cuyas células mononucleadas de médula ósea han sido utilizadas en esta tesis. Descripción de las características diagnósticas. M se refiere a masculina y F a femenina. NA: dato perdido.

Paciente	Sexo	Edad	Fecha llegada	% blastos en MO	Grupo FAB	Mutaciones	Citogenética
AML1	M	84	18/01/2016	86	NA	NA	normal
AML2	M	81	11/04/2016	22	NA	NA	normal
AML3	M	80	18/04/2016	NA	M5	<i>NPM1</i>	normal
AML4	F	42	23/04/2016	87	M1	<i>NPM1</i>	normal
AML5	M	68	27/04/2016	64	M2	<i>NPM1, WT1</i>	normal
AML6	F	68	31/05/2016	37	M1	NA	-7q
AML7	F	62	11/07/2016	84	NA	NA	-7, -13
AML8	F	54	11/10/2016	73	M3	NA	t(15;17)
AML9	F	54	20/04/2017	NA	M4	NA	i(16),-7
AML10	F	80	22/08/2017	80	M1	NA	NA
AML11	F	71	29/08/2017	NA	M0	NA	-5q, +8
AML12	M	39	22/09/2017	36	M4	<i>WT1</i>	Normal
AML13	F	63	06/10/2017	48	M1	No mutaciones	NA
AML14	F	57	22/01/2018	93	M1	<i>NPM1</i>	+16q
AML15	F	64	22/03/2018	83	M5	<i>NPM1</i>	NA
AML16	M	71	26/09/2018	48	M4	No mutaciones	NA
AML17	F	56	03/12/2018	92	M3	No mutaciones	t(15;17)
AML18	F	55	28/01/2019	42	M3	NA	+9, t(15;17)
AML19	F	54	16/03/2019	51	M4	No mutaciones	i(16)
AML20	M	31	13/06/2019	80	M1	No mutaciones	Normal
AML21	F	30	20/06/2019	21	NA	No mutaciones	-1, -3, -5, t(3q11;7q21), +8
AML22	F	63	24/06/2019	78	M4	<i>IDH2, MPL, DNMT3A, SF3B1, NPM1, CEPBA</i> monoalelico	Normal
AML23	M	68	13/09/2019	40	M0	No mutaciones	+14
AML24	M	35	13/01/2020	83	M5	<i>FLT3-ITD, NPM1, WT1</i>	Normal
AML25	F	22	29/01/2020	81	M5	<i>KRAS</i>	t(10;11), -11, +19
AML26	F	20	05/02/2020	39	M4	No mutaciones	t(9;11),+9

<b>AML27</b>	M	77	17/02/2020	88	M1	<i>NPM1</i>	Normal
<b>AML28</b>	M	75	17/06/2020	59	NA	<i>CEBPA, ASXL1, TET2</i>	t(7;21)
<b>AML29</b>	M	36	21/07/2020	20	M2	<i>RUNX1, DDX41, CEBPA</i> monoalelico	Normal
<b>AML30</b>	F	65	26/01/2021	90	M1	<i>IDH2</i>	+3q, -17, -5, hsr (11q21), 11q23-MLL
<b>AML31</b>	F	44	19/03/2021	57	NA	No mutaciones	Normal
<b>AML32</b>	M	75	20/09/2021	NA	M2	No mutaciones	i(4)
<b>AML33</b>	M	83	27/09/2021	56	M5	No mutaciones	Normal
<b>AML34</b>	M	40	15/11/2021	90	M1	No mutaciones	8, FLT3-ITD
<b>AML35</b>	M	45	19/01/2022	49,4	M4	<i>TP53, BCOR, NF1, WT1</i>	add(2), -5, +8, add(19), +22
<b>AML36</b>	F	56	22/02/2022	NA	NA	No mutaciones	i(16)

**Tabla 8. Individuos sanos cuyas células mononucleadas de médula ósea han sido utilizadas en esta tesis.** M se refiere a masculina y F a femenina.

Sano	Sexo	Edad
Sano1	M	24
Sano2	F	47
Sano3	F	44
Sano4		26
Sano5	F	19
Sano6	M	39
Sano7	M	25

### 3.1.4.3. Bases de datos

El análisis genómico se llevó a cabo a partir de bases de datos de expresión de pacientes de LMA. Se tomaron del repositorio público del Gene Expression Omnibus del NCBI. Se seleccionó GSE15061<sup>169</sup> como base de datos de entrenamiento, mientras que para la validación se utilizaron GSE14468<sup>170</sup>, GSE10358<sup>171</sup>, GSE68833<sup>9</sup>, phs001657.v1.p1 y GSE165656<sup>172</sup> (Tabla 9). Se descartaron las muestras pertenecientes a células de sangre periférica u otras patologías no relacionadas con la LMA (por ejemplo, el síndrome mielodisplásico derivado de la RAEB-t). Se eliminaron 96 muestras tanto del GSE15061 como del GSE14468 debido a la falta de información sobre el pronóstico o alteraciones citogenéticas, o bien por limitaciones computacionales. Los grupos

pronóstico para las muestras del conjunto de datos GSE10358 y GSE68833 se asignaron como se había hecho previamente<sup>170</sup>: favorable (i(16), t(16;16), t(15;17), t(8;21)); adverso (-5/-5q, -7/-7q, t(6;9), t(9;22) o más de 3 alteraciones); o intermedio, constituido por todas las alteraciones restantes. Los datos de expresión génica de un conjunto de datos de validación adicional (phs001657.v1.p1) se obtuvieron de Tyner *et al.*<sup>173</sup> (Tabla 9). Así, el total de muestras de pacientes con información de expresión génica que manejamos fue de 1821.

**Tabla 9. Bases de datos de expresión génica que han sido utilizadas en esta tesis. Fuente: Gene Expression Omnibus (NCBI).**

	Pronóstico	Nº muestras	Total
<b>GSE15061</b>	Sano	73	449
	Favorable	96	
	Intermedio	234	
	Adverso	46	
<b>GSE14468</b>	Favorable	95	406
	Intermedio	232	
	Adverso	79	
<b>GSE10358</b>	Favorable	54	290
	Intermedio	179	
	Adverso	57	
<b>GSE68833</b>	Favorable	30	166
	Intermedio	92	
	Adverso	44	
<b>phs001657.v1.p1</b>	Favorable	117	429
	Intermedio	150	
	Adverso	162	
<b>GSE165656</b>	Favorable	5	81
	Intermedio	46	
	Adverso	30	

### 3.1.4.4. Oligonucleótidos

**Tabla 10. Oligonucleótidos utilizados para el silenciamiento de los genes estudiados.**

Gen diana	Identificador	Secuencia (5'→3')
<b>Luciferasa</b>	Luc	CTGACGCGGAATACTTCGA
<b>CYBB</b>	Nox2#1	GCTATGAGGTGGTGATGTT
	Nox2#2	CAAGACAATTGCAAGTCAA
<b>LDH-A</b>	ldha#1	GATAAGTGGTTTTCCAAA
	ldha#2	GAATGAATGTTGCTGGTGT

<b>LDH-B</b>	ldhb#1	AGATAAGCTTAAAGGAGAA
	ldhb#2	CTAAAATTGTGGCAGATAA

Tabla 11. Oligonucleótidos utilizados para eliminar la expresión NOX2 mediante CRISPR-CAS9.

Gen diana	Dirección	Secuencia (5'→3')
<b>CYBB</b>	Sentido	AGTTCGAAGACAACCTGGACAGG
	Antisentido	TATGAATAGAGGGAACTCCCTGG

Tabla 12. Oligonucleótidos utilizados para PCR.

Gen diana	Técnica de uso	Tª	Dirección	Secuencia (5'→3')
<b>CYBB</b>	PCR	58	Sentido	AGTTCGAAGACAACCTGGACAGG
			Antisentido	TATGAATAGAGGGAACTCCCTGG
<b><math>\beta</math>-ACTINA</b>	qPCR	58	Sentido	CACCACACCTTCTACAATGA
			Antisentido	ACATGATCTGGGTCATCTTC
<b>CYBB</b>	qPCR	58	Sentido	ATGCAGGAAAGGAACAATGC
			Antisentido	GTGCACAGCAAAGTGATTGG
<b>LDH-A</b>	qPCR	58	Sentido	AATATGGCAACTCTAAAGGA
			Antisentido	TGACATCAACAAGAGCAAGT
<b>LDH-B</b>	qPCR	58	Sentido	CAACAGTTCCAAACAATAAGA
			Antisentido	CAAGTTCATCAGCCAGAGA

### 3.1.4.5. Anticuerpos

Tabla 13. Anticuerpos primarios utilizados en esta tesis para western blot.

Diana	Proveedor	Referencia	Dilución
$\beta$ -actina hFAB-rodamina	Bio-Rad	12004164	1:2000
$\beta$ -catenina	BD Transduction Laboratories	#610154	1:500
AKT	Cell signalling	#9272S	1:500
p-AKT (S472/473)	BD Transduction Laboratories	550747	1:1000
GSK3 $\beta$	BD Transduction Laboratories	#610201 (7/GSK-3b)	1:3000

<b>pGSK3β (S9)</b>	Santa Cruz Biotechnology	sc-373800 (F-2)	1:500
<b>pGSK3β (Y216)</b>	BD Transduction Laboratories	#612312 (13A)	1:3000
<b>GAPDH</b>	ThermoFisher Scientific	AM4300 (6C5)	1:40000
<b>GAPDH hFAB-rodamina</b>	Bio-Rad	12004165	1:2000
<b>LDH</b>	Santa Cruz Biotechnology	sc-133123 (H-10)	1:1000
<b>LDH-A</b>	Santa Cruz Biotechnology	sc-137243 (E-9)	1:1000
<b>LDH-B</b>	Santa Cruz Biotechnology	sc-100775 (431.1)	1:1000
<b>c-MYC</b>	Santa Cruz Biotechnology	sc-40 (9E10)	1:5000
<b>NRF2</b>	Abcam	ab-62352	1:100
<b>OXPPOS</b>	Abcam	ab110413	1:1000
<b>p70S6Kα</b>	Santa Cruz Biotechnology	sc-8418	1:1000
<b>p-p70S6Kα (S434)</b>	Cell signalling	9234S	1:1000
<b>PDHE1α</b>	Santa Cruz Biotechnology	sc-377092 (D-8)	1:1000
<b>p-PDHE1α (S293)</b>	Millipore	ABS204	1:1000
<b>Tubulina hFAB-rodamina</b>	Bio-Rad	12004166	1:2000
<b>Vinculina</b>	Santa Cruz Biotechnology	sc-73614 (7F9)	1:3000

Tabla 14. Anticuerpos secundarios utilizados en esta tesis para western blot.

<b>Diana</b>	<b>Proveedor</b>	<b>Referencia</b>	<b>Dilución</b>
<b>α-mouse IgG<sub>x</sub> BP</b>	Santa Cruz Biotechnology	sc-516102	1:5000
<b>α-mouse IgG</b>	Bio-Rad	1706516	1:10000
<b>Goat α-mouse IgG StarBright Blue 700</b>	Bio-Rad	12004159	1:5000
<b>Donkey α-mouse IRDye 680</b>	Licor	925-68071	1:5000
<b>Goat α-mouse IgG IRDye 800</b>	Licor	925-32210	1:5000
<b>α-rabbit IgG</b>	Invitrogen	A16104	1:5000
<b>Goat α-rabbit IRDye 680</b>	Licor	926-68071	1:5000
<b>Donkey α-rabbit IRDye 800</b>	Licor	926-32213	1:5000

## **3.2. Métodos experimentales**

### **3.2.1. Cultivos celulares**

Todas las líneas celulares utilizadas en esta tesis se cultivaron en incubadores de temperatura y concentración de CO<sub>2</sub> controlada, con valores preestablecidos de 37°C y 5% respectivamente. Las condiciones de cultivo para cada línea celular se detallan en la Tabla 5. Cada dos días se midió la concentración a la que se encontraban las células en suspensión por conteo celular, se lavaron con 10ml de PBS 1X y se repuso el medio para mantener unas condiciones ideales de crecimiento de las células, con plena disponibilidad de nutrientes y a una densidad celular controlada. Cada línea celular se mantuvo a distinta densidad celular acorde a su tasa de crecimiento, con valores en torno a 2-4 x 10<sup>5</sup> células/ml. Para las líneas celulares adherentes, HEK-293T y HEK-Blue, se determinó realizar los pases cuando las células estaban en una confluencia de alrededor del 80-90%. En primer lugar, se retiró el medio de la placa y se lavó las células con 10ml de PBS 1X. Las células HEK-293T requieren de la adición de Tripsina-EDTA (Biowest) precalentada a 37°C, una cantidad suficiente para cubrir toda la superficie de la placa para desprenderse. A continuación, se realizó un segundo lavado y se resuspendieron las células en su respectivo medio a baja densidad. Una dilución 1:6 permite mantener las células 3-4 días en cultivo.

De forma periódica se testó la presencia de micoplasmas utilizando el test Plasmotest<sup>TM</sup> (Invivogen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **3.2.2. Aislamiento de células mononucleadas de paciente diagnosticados con leucemia mieloide aguda por gradiente de ficol**

Las muestras de médula ósea de los pacientes diagnosticados con LMA y de los individuos sanos fueron proporcionadas por el Servicio de Hematología del Hospital Universitario de Salamanca, previo consentimiento informado de los pacientes y siguiendo el protocolo de la Declaración de Helsinki. En primer lugar, la muestra se disgregó mediante 3 pasos: 1) inversión 5-8 veces; 2) paso a través de una jeringa de 18G, 5-6 veces consecutivas; 3) paso a través de una jeringa de 21G, 5-6 veces consecutivas. Una vez eliminados los posibles coágulos encontrados en la muestra, se mezcló una parte de médula ósea con 2 partes de medio HBBS (Biowest). Se mezcló hasta tener una solución homogénea y se depositó con cuidado sobre ficol (Fisher Scientific) siguiendo una proporción de 2:3 ficol-muestra diluida en HBBS. Estas soluciones se centrifugaron

durante 30 minutos a 1600rpm 16°C, con la precaución de no poner velocidad de aceleración y deceleración de la centrífuga para evitar el mezclado de la célula. El ficol es un polisacárido ramificado que se disuelve en agua y que permite el paso de las células de la sangre de la línea roja pero no de la línea blanca. De este modo, tras los 30 minutos de centrifugado las células rojas se localizaron en el fondo del tubo tras haber atravesado el ficol y las células de la línea blanca se localizaron sobre el ficol, lo cual nos permitió recogerlas y aislarlas del resto. Se transfirió la capa de células blancas sobre el ficol con una pipeta pasteur a un nuevo tubo y se lavó con 10ml de PBS 1X dos veces consecutivas (1500rpm 10 minutos). A continuación, se cuantificó el número de células aisladas mediante contaje celular y estas se incubaron a una densidad de  $10 \times 10^5$  células/ml en medio RPMI 1640 10% FBS; 1% Pen-Strep a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

### **3.2.3. Cuantificación de la proliferación celular**

#### **3.2.3.1. Tinción de célula viva con MTT**

MTT es un ensayo que desarrolló Mosmann<sup>174</sup> que permite determinar el posible efecto citotóxico de un agente sobre líneas de células tumorales o cultivos primarios. Los ensayos MTT se realizaron en placas de 96 pocillos en las que, durante 48h, se dejaron incubar 200 µl de la línea celular ( $2,5 \times 10^5$  células/ml) o de las células mononucleadas procedentes de pacientes con LMA ( $10 \times 10^5$  células/ml) con diferentes concentraciones de los diferentes inhibidores, a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Tras las 48h, se añadieron 100 µl de PBS 1X para lavar las células. Entonces, las placas se centrifugaron a 4°C y 300xg durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 100 µl de MTT 5 mg/ml (Sigma). Se incubaron las placas durante 1 hora 15 minutos a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Tras la incubación, se lavó de nuevo con 200 µl de PBS 1X y se centrifugó 5 minutos a 300xg y 4°C. De nuevo, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 200 µl de DMSO (Fisher Scientific). Un espectrofotómetro de barrido multipocillo a una  $\lambda$  de 570 nm cuantificó la absorbancia de cada pocillo.

Por comparación con el control, se obtuvo el porcentaje de proliferación:

$$\% \text{ proliferación} = \frac{ABS \text{ células tratadas}}{ABS \text{ células control}} \times 100$$

El cálculo de la concentración capaz de inhibir la proliferación al 50% (IC50) y del índice de combinación (CI, de sus siglas en inglés *Combination Index*) se realizó con



el programa CalcuSyn (Biosoft). El CI permite cuantificar el tipo de interacción que se produce entre los fármacos de modo que:

- Si CI es mayor a 1, los fármacos presentan un efecto antagónico.
- Si CI es igual a 1, los fármacos presentan un efecto aditivo.
- Si CI es menor a 1, los fármacos presentan un efecto sinérgico.

### **3.2.3.2. Tinción de célula viva con CMTMR**

El 5-(y-6)-(((4-clorometil)benzoil)amino)tetrametilrodamina (CMTMR) se trata de un colorante vital que difunde a través de la membrana y una vez dentro de la célula sufre modificaciones estructurales que le impiden volver a salir. Es estable y tiene la particularidad de que no interfiere a nivel fisiológico con la célula. Se retiene en la célula periodos superiores a 72h, entre 3-6 ciclos de división. Al ser un compuesto disuelto en citoplasma, cuando la célula se divide, el contenido de CMTMR es repartido entre las dos células hijas diluyéndose. Por tanto, el procedimiento para la medición de la proliferación celular mediante marcaje con CMTMR consiste en incubar 2ml de células a una concentración de  $2,5 \times 10^5$  células/ml en ausencia o presencia del inhibidor de interés y en medio  $3-5 \mu\text{M}$  de CMTMR (Fisher Scientific). Tras 24h, 48h, 72h, 96h se tomaron  $0,5 \times 10^5$  células. Se lavaron dos veces con PBS y se adquirieron en el citómetro. CMTMR emite a una longitud de onda de 565nm y emite a 541nm.

### **3.2.3.3. Contaje celular**

Se utilizaron dos tipos de tinciones celulares para excluir las células muertas de los contajes celulares de rutina y para medir la proliferación celular por contaje mediante otra estrategia alternativa. La tinción con azul de tripán 0,4% p/v entra en el interior celular de las células muertas tiñéndolas de azul. Este colorante con carga negativa es repelido por las células viables, también con carga negativa en el exterior de su membrana plasmática; mientras, la pérdida de estructura de las células muertas no presenta resistencia a su entrada. Por otro lado, la solución TURKS (1% v/v cristal violeta; 1,5% ácido acético glacial) se utilizó como alternativa para determinar el número de células mononucleadas viables tras la separación por gradiente de ficol. La solución TURKS es una tinción hematológica que destruye la membrana de las células de la línea roja y las plaquetas y tiñe el interior de todas células que han perdido su integridad celular. Esta

alternativa nos permitió contabilizar exclusivamente las células de la línea blanca, obviando las células rojas que no se hayan separado con el gradiente de ficol.

Para realizar estos contajes, se tomó una alícuota para cada condición y se diluyó convenientemente con PBS. A continuación, se añadió azul tripán o bien TURKS a las suspensiones celulares en una proporción de volumen 1:1 y se mezcló hasta conseguir una solución homogénea. Depositando dicha solución sobre una cámara Thoma, se contaron las células utilizando un microscopio.

### **3.2.4. Cuantificación de la viabilidad celular**

#### **3.2.4.1. Anexina/7-AAD**

Se utilizó un kit de Anexina V y 7-AAD (Immunostep) para medir la viabilidad celular de las distintas líneas celulares en presencia y ausencia de diferentes tratamientos. Anexina V se une específicamente a la fosfatidilserina que queda expuesta en el exterior de la membrana plasmática cuando las células comienzan a entrar en apoptosis. El 7-AAD se une al ADN cuando este queda expuesto debido a una pérdida total de la integridad celular, característica de estadios de muerte celular avanzada como la necrosis o la apoptosis tardía. De este modo, consideraremos células vivas aquellas que no se marquen con ninguno de los marcajes, células en apoptosis temprana las que se marquen solo con Anexina V, células necróticas las que se marquen solo con 7-AAD y células en apoptosis tardía aquellas que den positivas en ambos marcajes. Detectamos Anexina V en el canal PE (Abs/Em Max: 490/578 nm) y 7-AAD en el canal PerCP (Abs/Em Max: 540/645 nm).

El procedimiento comenzó con la incubación 2 ml por pocillo de la línea celular en placas de 24 pocillos (a  $2,5 \times 10^5$  células/ml) en ausencia o presencia de los diferentes tratamientos durante 48h. Transcurridas las 48h, se recogieron las células de la placa y se centrifugaron durante 5 minutos a 300xg y 4°C. Se eliminó el sobrenadante y las células se lavaron con 3 ml de PBS 1X, que se centrifugaron durante 5 minutos a 300xg y 4°C, y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 100 µl de Tampón Binding diluido al 10% en PBS. Después, se le añadieron 2 µl de anexina V y 2 µl de 7-AAD a cada uno de los tubos y se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos. Tras los 15 minutos, se almacenaron las muestras en hielo y se adquirieron en el citómetro.

Para el caso de las células mononucleadas de paciente se siguió el mismo protocolo incubando  $1 \times 10^6$  células/ml y marcando solamente con Anexina V.

#### **3.2.4.2. Yoduro de propidio**

Al igual que el 7-AAD, el yoduro de propidio (*propidium iodide* o PI de sus siglas en inglés) es una molécula de unión al ADN que no puede atravesar la membrana celular por lo que solo marcará el material genético de las células que hayan perdido su integridad, es decir, las células muertas. Para evaluar la viabilidad celular, se tomó una alícuota de cada condición de experimentación y se diluyó en una proporción de volumen 1:1 con la solución de partida de yoduro de propidio  $10 \mu\text{M}$ . Se mezcló hasta conseguir una solución homogénea y se incubó durante 10 minutos. A continuación, se adquirieron las muestras incubadas por citometría y se analizó el porcentaje de PI positivas. El PI se excita a 488 nm y emite a una longitud de onda máxima de 617 nm.

#### **3.2.5. Ensayos de colonias**

Una problemática común al tratar las enfermedades hematológicas es la resistencia de las células progenitoras a los distintos tratamientos. En estos casos, los fármacos se presentan eficaces reduciendo la carga de células tumorales, pero con el paso del tiempo los pacientes recaen en la enfermedad por una nueva proliferación maligna con origen en dichas células inmaduras. Las células progenitoras muestran características fenotípicas y genotípicas distintas a las células tumorales de modo que, en ocasiones, dirigir los tratamientos a ambas es complicado. Por ello, es interesante evaluar la eficacia de los tratamientos, no solo a través de ensayos de viabilidad y proliferación que determinen el efecto del tratamiento sobre las células tumorales, sino con otro tipo de ensayos que permitan analizar el efecto sobre las células progenitoras. El ensayo de colonias se ha empleado para determinar el efecto que tienen los distintos tratamientos sobre la capacidad de formar colonias de las células progenitoras de las distintas líneas celulares y las células mononucleadas de médula ósea de pacientes con LMA.

En estos ensayos las células se trataron con los diferentes fármacos durante 48 horas a una densidad de  $2,5 \times 10^5$  células/ml o de  $10 \times 10^5$  células/ml, según se trate de la línea celular o de las células de pacientes respectivamente. Transcurrido este tiempo se contaron, lavaron y resuspendieron  $0,55 \times 10^5$  células en 250  $\mu\text{L}$  de medio Iscove (IMDM 2% FBS; 1% glutamina). Desde este medio se tomó el volumen relativo a una cantidad de 700 células para las líneas celulares y de 14000 para las células de pacientes y se

añadieron a 700  $\mu\text{L}$  de medio semisólido de metilcelulosa (StemMACS<sup>TM</sup> HSC-CFU básico de Miltenyi Biotech para la línea celular, y StemMACS<sup>TM</sup> HSC-CFU completo sin eritropoyetina de Miltenyi Biotech para las células de pacientes). Se agitaron vigorosamente los distintos tubos y con una jeringa de 1 ml y con aguja de 18G, se depositaron 500  $\mu\text{L}$  de la suspensión anterior en el fondo del pocillo de una placa de 24 pocillos evitando que quedaran burbujas. De esta manera cada pocillo tenía una cantidad de 500 células o 10000 células en caso de línea celular o células de pacientes respectivamente. Se incubaron las placas a 37°C, atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub> durante 7 días, si es una línea celular, y 14 días, en el caso de las células de paciente. Trascurrido este tiempo se contaron el número de unidades formadoras de colonias (CFU, de sus siglas en inglés *colony forming unit*) por microscopía óptica con el objetivo 4X.

### **3.2.6. Ensayos de diferenciación celular**

A nivel clínico hay terapias que ejercen su acción induciendo la muerte celular mientras que otras actúan activando los mecanismos de diferenciación celular. Igual de eficaz puede resultar una u otra estrategia. Por ello, evaluar el efecto sobre la diferenciación celular de los tratamientos también resulta interesante. Para analizar si los tratamientos inducen la diferenciación, se siguió el procedimiento detallado a continuación.

Estos ensayos se llevaron a cabo con las líneas celulares de modo que se incubó 1-2ml de células a  $2,5 \times 10^5$  células/ml. Se cultivaron las células durante 48h con los inhibidores. Tras 48h, se recogieron dichas células, se lavaron y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente a una proporción 1:25 con un anticuerpo unido a fluorocromo que reconozca una proteína de membrana característica del linaje celular al que se diferencia cada línea celular. Concretamente en los experimentos presentados en este trabajo, la línea celular tratada fue MOLM-13, que se diferencia a macrófagos. Así pues, tras la incubación se lavaron las células en una ocasión con PBS y se cuantificaron por citometría de flujo los niveles de CD11b, marcador de membrana expresado en la población de macrófagos. Se tomaron los valores de fluorescencia media de la población como medida de diferenciación.

### **3.2.7. Análisis de la expresión génica**

Realizamos análisis de la expresión génica para medir la expresión de *CYBB* en las distintas líneas celulares y para evaluar la eficacia de los silenciamientos en aquellas células en las que no pudo evaluarse por western blot.

#### **3.2.7.1. Extracción de ARN**

La extracción de ARN se llevó a cabo utilizando el reactivo Tri Reagent (Sigma-Aldrich) o Extrazol (NzyTech). Se tomaron mínimo  $2 \times 10^6$  células que se diluyeron en 500  $\mu$ l del reactivo comercial con trizol y se siguieron las recomendaciones del fabricante. Se utilizaron los Espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) y espectrofotómetro/fluorómetro DS-11 FX+ (DeNovix) para evaluar la pureza y cuantificar el ARN extraído, considerándose valores de 260/230 en torno a 2 y de 260/280 en torno a 1,8 aceptables.

#### **3.2.7.2. Retrotranscripción**

La reacción de la polimerasa solo puede utilizar ADN como molde. Por tanto, el ARN extraído debe convertirse a una cadena de ADN. Para ello se llevó a cabo el procedimiento de retrotranscripción que consiste en la transformación de ARN a ADN complementario (ADNc). Este proceso es posible gracias a la enzima retrotranscriptasa; en concreto, en este trabajo se utilizó la enzima comercial SuperScript® II (Invitrogen). En primer lugar, el ARN (4  $\mu$ g) se ligó a un oligonucleótido constituido por una cola de timinas (2  $\mu$ l oligo-dT) en un tubo con un volumen final de 11  $\mu$ l que se incubó durante 10 minutos a 65°C. A continuación, se añadieron al tubo todos los reactivos necesarios para la reacción de retrotranscripción, es decir, 4  $\mu$ l tampón de reacción de la transcriptasa reversa SuperScript® II (Invitrogen), 2  $\mu$ l ditioneitol (DTT, Invitrogen), 1,5  $\mu$ l de mezcla de desoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs, Thermo Scientific) y 0,5  $\mu$ l RNase OUT (Invitrogen) y se ajustó la temperatura del tubo a 42°C durante 5 minutos. A continuación, se añadió 0,5  $\mu$ l de la transcriptasa reversa SuperScript® II y se incubó durante 50 minutos a 42°C. Finalmente, se detuvo la reacción calentando el tubo a 70°C durante 10 minutos.

#### **3.2.7.3. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa**

La q-PCR se realizó en el termociclador StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems) que detecta el fluoróforo SYBR Green, ampliamente extendido para la cuantificación a tiempo real de ADN. SYBR Green se une al ADN de doble

cadena, de modo que cuanto mayor sea la cantidad de ADN de doble cadena presente en la muestra, mayor será la intensidad de fluorescencia de esta.

La mezcla a preparar para desencadenar la reacción de PCR consta de 10ng de ADNc, 5µl de GoTaq qPCR Master Mix (Promega), 0,1µl de ROX (Promega), 0,1µl de oligonucleótido sentido, 0,1µl de oligonucleótido antisentido y hasta 10µl de volumen final de agua destilada. Los oligonucleótidos utilizados para qPCR se detallan en la Tabla 12.

Las condiciones de reacción son las siguientes:

- Amplificación y cuantificación (x40):
  - Desnaturalización: 15 segundos a 95°C
  - Anillamiento: 30 segundos a 58°C
- Calentamiento (x1): aumento de temperatura progresivo desde la temperatura de anillamiento hasta la temperatura de desnaturalización que permite evaluar si la amplificación ha sido específica.

Todas las reacciones de qPCR se llevaron a cabo por triplicado. Siempre se puso un control negativo de reacción que contenía todos los reactivos de la reacción excepto el ADNc que era reemplazado por agua destilada. La cuantificación de los resultados se realizó mediante el método comparativo de ciclo umbral,  $C_t$ , usando la  $\beta$ -actina como control de expresión endógeno.

#### **3.2.7.4. Electroforesis en gel de agarosa**

Al menos la primera vez que se utilizaron cada una de las parejas de oligonucleótidos se realizó una electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR para confirmar que el tamaño de producto de PCR coincidía con el tamaño esperado. Se recomienda un tamaño de amplicón de aproximadamente 100 pares de bases. Consecuentemente, se prepararon geles al 2% p/v de agarosa en tampón TAE que garantizaban la detección y correcta separación de la banda. Con 5-10µl del producto de la reacción de PCR fue suficiente para visualizar la banda del amplicón. Los geles se corrieron durante 45 minutos a 90V y se visualizaron en el documentador Gel Doc XR System (compuesto por Universal Hood II, Universal XR Camera w/MZL y Quantity One Software) (Bio-Rad).

### **3.2.8. Análisis de la expresión proteica**

Rutinariamente, para la cuantificación proteica por western blot se incubaron 5ml de células a una concentración de  $3 \times 10^5$  células/ml durante 16h en presencia o ausencia de los inhibidores metabólicos.

#### **3.2.8.1. Extracción de proteínas**

Para la extracción de proteínas, se tomaron las células en cultivo en las condiciones indicadas ( $1,5 \times 10^6$  células) y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se eliminó el medio de cultivo y se lavó con 1ml de PBS 1X. Tras una segunda ronda de centrifugación, se retiró el PBS y se resuspendió el precipitado en 50-100  $\mu$ l de tampón MLB, al cual se añadió un inhibidor de proteasas en una proporción 1:500. La mezcla se incubó en hielo durante 20 min, se centrifugó a 14800 rpm durante 15 minutos y se recuperó el sobrenadante pasándolo a otro tubo limpio.

#### **3.2.8.2. Cuantificación de proteínas**

La concentración de proteínas se determinó mediante el ensayo de Bradford utilizando concentraciones de albúmina sérica bovina entre 0,01mg/ml y 0,1mg/ml como patrón. Las muestras proteicas se diluyeron en proporciones de 1:80 a 1:120 con agua para garantizar que la absorbancia que proporcionaban se encontraba dentro del rango de la recta patrón previamente descrito. Se mezclaron 20 $\mu$ l de las distintas diluciones patrón, así como de las distintas muestras con 200 $\mu$ l de reactivo de Bradford en placas de 96 pocillos. Se incubaron durante 5 minutos en oscuridad para posteriormente medir la absorbancia de cada uno de los pocillos a 595nm en un lector de microplacas Multiskan FC (Thermo Scientific). Cada muestra se evaluó por triplicado.

#### **3.2.8.3. Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida**

A continuación, se realizó la separación de las proteínas en gel de poliacrilamida mediante una electroforesis desnaturizante en condiciones reductoras (SDS-PAGE). Se utilizaron geles de poliacrilamida a concentraciones entre 7-12% de poliacrilamida, en función de los tamaños de proteína que quisiéramos detectar. Los extractos proteicos se mezclaron con tampón de carga para proteínas en una proporción 1:1 y se sometieron a los siguientes ciclos: 5 minutos a 37°C, 5° en hielo y 5 minutos a 37°C. Se cargó la misma cantidad en cada pocillo del combinado extracto proteico+tampón de carga, entre 20-50 $\mu$ g de proteína dependiendo la abundancia de las proteínas a detectar. Los geles se

corrieron en el equipo de electroforesis vertical y transferencia Mini-PROTEAN 3 Cell con tampón de electroforesis suficiente y a un voltaje constante de 120V hasta que el tampón de carga se salió del gel.

#### **3.2.8.4. Transferencia húmeda**

Se utilizaron membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) para transferir las proteínas. Las membranas se activaron con metanol y se colocaron en estrecho contacto con geles de poliacrilamida en los montajes de sandwich. Se realizó transferencia húmeda en un sistema de electroforesis horizontal Mini-PROTEAN 3 Cell (Bio-Rad) lleno de tampón de transferencia de western blot 1X durante 16 h a un amperaje constante de 150 mA a 4°C.

#### **3.2.8.5. Hibridación con anticuerpos**

Previo a la hibridación con los anticuerpos se realizó una incubación de las membranas de 1 hora de duración a temperatura ambiente bien en leche desnatada al 5% p/v bien en BSA 2% p/v en TBS-Tween, con el objetivo de evitar las uniones inespecíficas. Los anticuerpos frente a proteínas fosforiladas se diluyeron en BSA 2% p/v en TBS-Tween y los anticuerpos totales en leche 5% p/v TBS-Tween. Tras el bloqueo de uniones inespecíficas, se hibridaron las membranas inicialmente con los anticuerpos primarios de interés diluidos y posteriormente con los anticuerpos secundarios, según indica en la Tabla 13. Los tiempos de incubación varían desde 1h a 24h, en función del anticuerpo utilizado, incubándose a 4°C tiempos superiores a las 6h. Entre la incubación del anticuerpo primario y el anticuerpo secundario y tras la incubación del secundario, se lavaron las membranas 3 veces con TBS-Tween en periodos de 10 minutos.

#### **3.2.8.6. Exposición y cuantificación**

El revelado de las membranas se realizó en el equipo ChemiDoc MP (Bio-Rad) o bien en un revelador de películas Medical X-Ray processor (Kodak), que requirió de una cuantificación posterior utilizando el densitómetro CS-9000 (Shimadzu). Los anticuerpos secundarios quimioluminiscentes tienen conjugada la peroxidasa de rábano que puede catalizar la oxidación del luminol y dar luminiscencia. Por ello, las membranas incubadas con anticuerpos secundarios quimioluminiscentes requieren de un paso previo de incubación durante 5 minutos con el sustrato de la peroxidasa de rábano (Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad)). Hecho esto, se expusieron a la adquisición de



luminiscencia. Por otro lado, las membranas incubadas con anticuerpos secundarios fluorescentes se introdujeron directamente al documentador de geles donde se expusieron a la luz de un láser que excitó al fluoróforo unido al anticuerpo secundario.

Las imágenes obtenidas se analizaron con los softwares Image Lab (Bio-Rad) o ImageStudio (LICOR), normalizando los datos siempre con un control de carga endógeno no involucrado en la ruta de señalización en estudio.

### **3.2.9. Silenciamiento lentiviral**

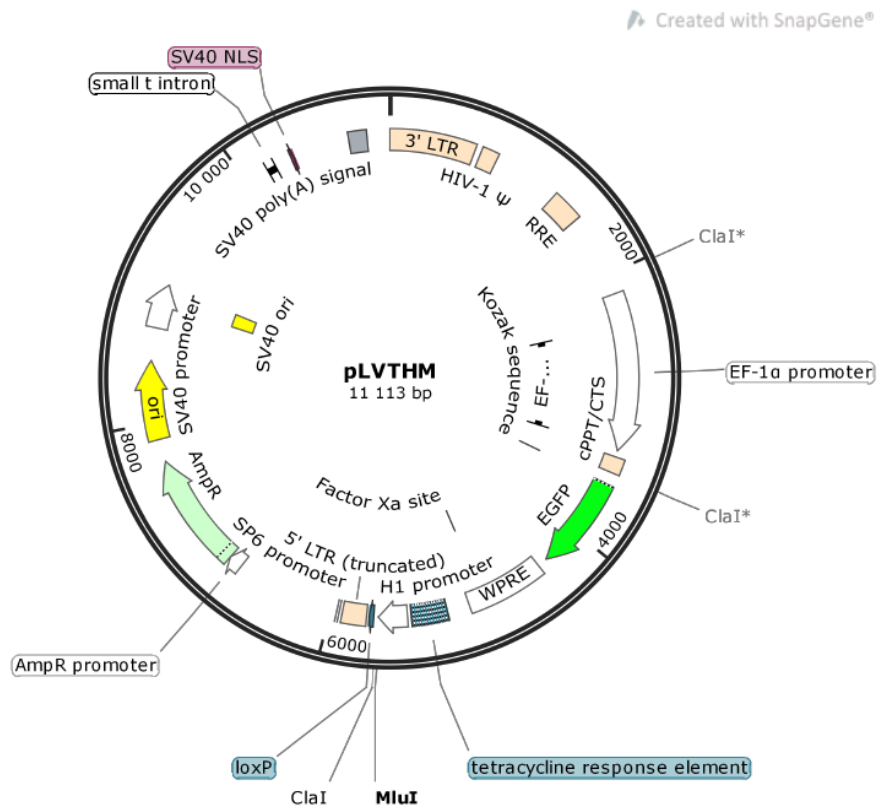
Una de las estrategias utilizadas para la reducción de los niveles de expresión de un gen en las líneas celulares modelo de LMA fue el silenciamiento lentiviral. Los lentivirus tienen la capacidad de infectar líneas celulares de mamíferos y transferir la información genética que portan de modo que esta pueda ser integrada en el genoma de la célula blanco. Así pues, produjimos lentivirus que contenían un vector con una secuencia que pudiera unirse al RNAm del gen del que queríamos reducir la expresión y, a continuación, co-cultivamos estos lentivirus con las células en las que queríamos silenciar la expresión del gen diana. Como resultado, las células blanco conseguían reducir los niveles de expresión de nuestro gen de interés de forma estable. Los pasos del proceso se detallan a continuación.

#### **3.2.9.1. Procesamiento de los oligonucleótidos e inserción de la secuencia en el plásmido vector**

Las secuencias que se utilizaron en esta tesis para reducir los niveles de expresión de varios genes de interés se describen en la Tabla 10. El silenciamiento del gen de la luciferasa de luciérnaga se utilizó como control de silenciamiento. Las secuencias de luciferasa y NOX2 se han utilizado previamente.<sup>158</sup> El resto de secuencias se diseñaron utilizando la herramienta online de diseño de oligonucleótidos Primer3 Plus siguiendo los criterios previamente propuestos.<sup>175</sup>

Los oligonucleótidos se deben anillar y fosforilar siguiendo los pasos que se describen en <sup>176</sup> para poder introducirlos en los sitios de clonaje MluI y ClaI del plásmido lentiviral pLVTHM (Figura 10), amablemente cedido por el Dr. Didier Trono. La correcta inserción del plásmido se comprobó en dos pasos: 1) cortando con las enzimas de restricción EcoRI y ClaI y comparando la diferencia de tamaño de los fragmentos de plásmido con y sin inserción y 2) por secuenciación utilizando un secuenciador

automático capilar 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems) en el Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca.



**Figura 10. Mapa del vector lentiviral pLVTHM para la expresión estable de ARN de silenciamiento.** Representación esquemática del vector mostrando sus principales características. Los sitios de restricción MluI y ClaI, situados a continuación del promotor H1, sirven como sitio de clonaje para las construcciones de ARN de silenciamiento. El marco de lectura abierto de la proteína verde fluorescente mejorada (EGFP) bajo el promotor del factor de elongación 1 alfa (EF-1 $\alpha$ ) permite el seguimiento de las células transducidas. Figura tomada de <sup>177</sup>.

### 3.2.9.2. Producción de lentivirus

El siguiente paso consistió en la producción de los lentivirus. Las partículas virales se generaron en células productoras, HEK-293T, por co-transfección transitoria del RNAsi-vector lentiviral (previamente descrito), un plásmido de empaquetamiento (psPAX2) y un plásmido de envoltura (pMD2.G). El plásmido de empaquetamiento codifica proteínas que permiten la transcripción y empaquetamiento del vector pLVTHM dentro de la partícula vírica. El plásmido pMD2.G contiene la información para la síntesis de la envoltura membrana.

En primer lugar, se trataron las placas de cultivo de 100mm de diámetro con 3ml de poli-D-lisina (Sigma-Aldrich), que se depositó en la placa durante 1' y posteriormente

se retiró. Se dejaron secar las placas, aproximadamente 30 minutos. Entonces, se depositaron las células HEK-293T sobre las placas pretratadas con poli-D-lisina a una confluencia del 80% en 9,6ml de medio DMEM completo. Se esperó a que las células se pegaran (aproximadamente 5 horas), lo cual puede comprobarse por la forma estrellada que estas adquieren. Una vez las células se encontraron perfectamente adheridas, se incubaron con una mezcla de transfección que se constituyó por 1,2ml de NaCl 150mM, 6µg de RNAsi-vector lentiviral, 4,5 µg de pMD2.G, 6µg de psPAX2 y 60µl de PEI (polietilenimina, Polysciences Inc.) que previamente debe incubarse durante 20 minutos a 37°C. El PEI, con carga positiva, neutraliza la carga negativa del ADN lentiviral y facilita su introducción en la célula blanco.

Las células productoras se incubaron una noche con la mezcla de transfección, tras lo cual se retiró el medio y se añadieron 8,5ml de medio fresco. 24h después se recogió el medio de las placas que contenía la primera tanda de producción lentiviral y se volvieron a añadir 8,5ml por placa de medio fresco. 48h después se recogió el medio de las placas que contenía la segunda tanda de producción lentiviral. El medio recogido en ambas tandas se ultracentrifugó a 20000rpm durante 2 horas 10 minutos 16°C con el fin de conseguir un concentrado vírico. Tras la centrifugación se desechó el sobrenadante y se mezcló el pellet en 200µl del medio de transducción que se conservó durante 4-5h a 4°C para favorecer la resuspensión. El concentrado vírico se alicuotó en tubos de uso para evitar los ciclos de congelación-descongelación que disminuyen la eficiencia de infección.

### **3.2.9.3. Valoración de la producción vírica**

Cada línea celular admite distintos niveles de virus en co-cultivo y muestra distinta susceptibilidad a ser transducida por virus, por ello existe una variable denominada multiplicidad de infección (MOI, de sus siglas en inglés *multiplicity of infection*) cuyas unidades son número de virus/célula que será distinta y empírica para cada línea celular. Esto quiere decir que es recomendable controlar el número de virus que se cultiva con las células. En consecuencia, es necesario hacer una valoración de la concentración vírica en las alícuotas resultantes del apartado anterior. Para ello, se utilizó la línea celular HEK-293T. Para cada condición a testar, se tomaron  $1 \times 10^5$  células que se adhirieron a un pocillo de una placa de 24 pocillos previamente tratada con poli-D-lisina, como se ha descrito previamente, en un volumen de 350µl. Se testaron 4 o 5 condiciones (adición de

1µl, 5µl, 10µl y 30µl) de cada concentrado vírico que previamente diluimos 1:100. Estas placas se centrifugaron a 32°C durante 90 minutos a 1800xg, tras lo cual se incubaron toda una noche en un incubador de temperatura, 37°C, y CO<sub>2</sub>, 5%, controlado. A la mañana siguiente, se retiró el sobrenadante de cada pocillo y se añadió 750µl de medio DMEM completo fresco. Estas células se mantuvieron en cultivo durante 48h, tras lo que se levantaron y llevaron al citómetro para contabilizar el número de células GFP positivas, células verdes, resultado de la infección lentiviral. El porcentaje de células verdes obtenido por citometría nos permitió calcular la concentración vírica de nuestras alícuotas en base a la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Virus}}{\text{ml}} = \frac{\frac{\% \text{ de células GFP} + x \text{ 100000 células} \cdot 1000}{100}}{\frac{\mu\text{l de dilución vírica}}{100}}$$

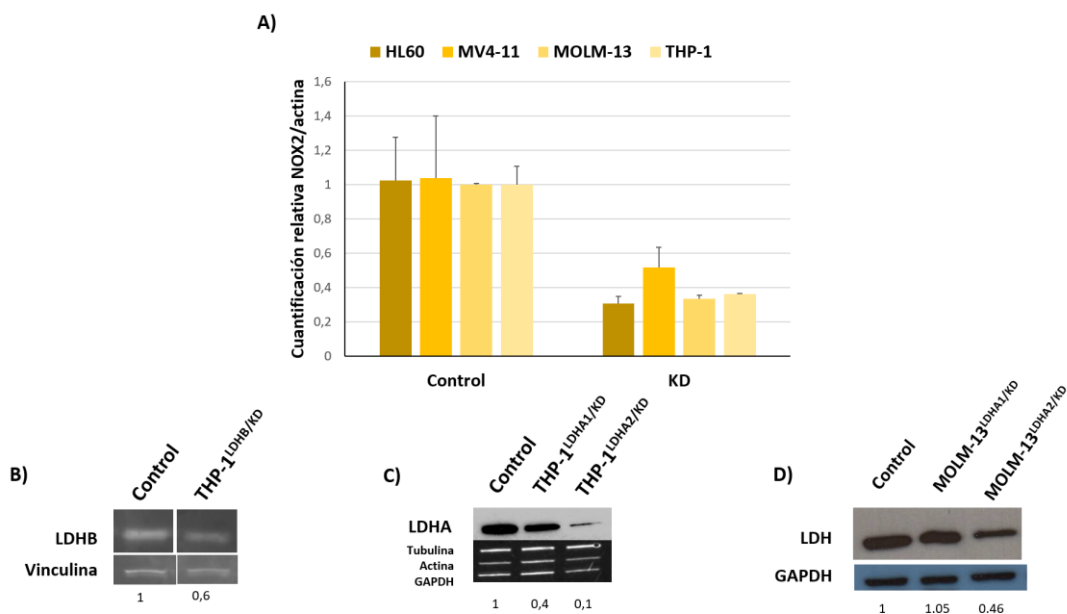
#### 3.2.9.4. Transducción de la línea celular diana

Conocidas las concentraciones de las alícuotas lentivirales producidas, el siguiente paso consistió en co-cultivar dichos lentivirus con la línea celular blanco de modo que los lentivirus pudieran infectar a las células. En primer lugar, las células se debían cultivar durante 6h en un medio con deprivación de FBS, RPMI 1% FBS con 1% Strep-Pen y 1% de glutamina a una concentración de  $3 \times 10^5$  células/ml. Tras las 6h, se añadieron los virus en las proporciones virus:célula (MOI) adecuadas para cada línea celular y se centrifugó la mezcla a 32°C durante 90 minutos a 1800xg en 100µl por pocillo en placas de 96 pocillos. A la mañana siguiente, se retiró el sobrenadante de cada pocillo y se añadió medio RPMI completo fresco. Estas células se mantuvieron en cultivo durante 48h, tras lo que se llevó una alícuota representativa de las mismas al citómetro para contabilizar el número de células GFP positivas.

La MOI de las distintas líneas celulares modelo de LMA transducidas en esta tesis ha tenido que calcularse empíricamente. Las líneas celulares THP-1 y HL-60 se co-cultivaron a una MOI de 75 virus/célula generando una infectividad del 90-95%; mientras, la línea celular MOLM-13 se co-cultivó con una MOI de 100 virus/célula e, incluso realizando dos rondas de transducción, los porcentajes de GFP+ se encontraban en torno al 30%. Por ello, requerimos realizar una separación por *cell-sorting* de las células GFP+ en el Servicio de Citometría de la Universidad de Salamanca.

### 3.2.9.5. Comprobación del silenciamiento

Por último, resultó pertinente comprobar que el silenciamiento lentiviral obtenía los resultados moleculares esperados, es decir, reducción de la expresión génica y consecuentemente proteica. Lo más adecuado sería haber podido evaluar un descenso de la cantidad de proteína sintetizada por la célula, pero no en todos los casos ha sido posible. La cuantificación de la expresión de NOX2 rutinaria para comprobar la eficiencia del silenciamiento se realizó mediante qPCR debido a los problemas que conllevaba la detección de NOX2 por western blot que se han revisado en <sup>178</sup>. La Figura 11A demuestra que los RNA de silenciamiento que se diseñaron frente a NOX2 reducen sus niveles de expresión en HL-60, MV4-11, MOLM-13 y THP-1. Por otro lado, el RNA de silenciamiento diseñado frente a la lactato deshidrogenasa (LDH) B redujo los niveles de proteínas de LDH-B (Figura 11B) así como los RNA de silenciamiento que se diseñaron frente a LDH-A redujeron los niveles de proteína en las líneas celulares THP-1 (Figura 11C) y MOLM-13 (Figura 11D). En el caso del silenciamiento de la LDH-A, la segunda secuencia testada ha resultado más eficiente en la reducción de los niveles proteicos de LDH (Figura 11C y D).



**Figura 11. Comprobación del silenciamiento de los genes diana en estudio.** A) Gráfico representativo que muestra la cuantificación relativa de los niveles de expresión de ARNm de NOX2 normalizado respecto a los niveles de actina en células HL-60, MV4-11, MOLM-13 y THP-1 silenciadas por infección lentiviral con una secuencia dirigida a la isoforma 2 de las NADPH. Se representa el tanto por uno respecto a luciferasa (silenciamiento control). B) Imagen representativa de western blot para la validación del silenciamiento de una secuencia dirigida a la isoforma B de la LDH en la línea celular de LMA THP-1. C) Imagen representativa de western blot para la validación del silenciamiento de dos secuencias dirigidas a la isoforma A de la LDH en la línea celular de LMA THP-1. D) Imagen representativa de western blot para la

validación del silenciamiento de la isoforma B de la LDH en la línea celular de LMA MOLM-13. Los datos muestran los resultados de un experimento representativo de, al menos, 3 que se hicieron en total.

A lo largo de esta tesis las células que tengan algún gen silenciado se anotarán con el nombre de la línea celular silenciada y un superíndice compuesto por el nombre de la proteína silenciada y las siglas KD procedentes del inglés *knock-down*. Por ejemplo, THP1<sup>NOX2/KD</sup> significa células THP-1 con NOX2 silenciado.

### **3.2.10. Generación de líneas celulares deficientes en *CYBB* mediante la herramienta CRISPR-CAS9**

Nos propusimos la utilización de la metodología CRISPR-CAS9 ya que, como se observa en la figura anterior, detectamos que el silenciamiento no era capaz de eliminar la totalidad de la expresión del gen. Además, algunas de las líneas celulares utilizadas, como las células MOLM-13, mostraron problemas de eficiencia en la infección lentiviral. CRISPR-CAS9, que permite suprimir totalmente la expresión de un único gen de forma específica, se compone de dos ARNs y la proteína CAS9. El ARNcr se diseñó para unirse específicamente a la secuencia a la que nos queríamos dirigir seguido de una secuencia PAM, que es la región que reconoce la CAS9. El ARNtrac se une a ARNcr para estabilizarlo y forma un complejo al que puede unirse CAS9. Además, en nuestro caso, ARNtrac contenía un fluoróforo que nos permitió detectar si el complejo RNP (CAS9 y ARNs) entraba en la célula. Una vez la CAS9 corte en la región específica del ADN a la que le dirigimos, la célula reparará la rotura de doble cadena del ADN por un mecanismo de reparación de unión de extremos no homólogos, que suele ir asociada a la eliminación/inserción de algunos nucleótidos (indels, del inglés *insertions and deletions*). Introducir 2 RNACr a menos de 100pbs de distancia minimiza la inserción o deleción de nucleótidos, lo cual genera más homogeneidad entre las células sobre las que se realiza el CRISPR-CAS9.

El desarrollo de los modelos CRISPR-CAS9 se hizo en colaboración con el grupo del Dr. Ignacio García-Tuñón de la Universidad de Salamanca.

#### **3.2.10.1. Diseño de los oligonucleótidos**

Se utilizaron dos plataformas online para realizar el diseño de los oligonucleótidos: CRISPR Custom Guide RNAs (IDT) y Breaking CAS (Centro Nacional de Biotecnología, CSIC). La primera de ellas tiene un registro de las secuencias previas que se han diseñado y comprado a IDT contra gran variedad de genes, lo cual puede ser

interesante ya que garantiza que han funcionado previamente. En nuestro caso, se diseñaron las secuencias de oligonucleótidos de *nov*o dirigidas al exón 4 de *CYBB* con el software online Breaking CAS. Escogimos el exón 4 ya que formaba parte de todas las alternativas codificantes de ARNm. Breaking CAS te reporta una lista de secuencias de oligonucleótidos, un valor de calidad del oligonucleótido e indica si existen otros genes a los que el oligonucleótido podría unirse. Los oligonucleótidos seleccionados (Tabla 15) fueron los de mayor valor de calidad que cumplieran no tener otros genes diana y estar a menos de 100 pares de bases el uno del otro.

**Tabla 15. Secuencias diseñadas para noquear la expresión de NOX2 mediante CRISPR-CAS9.**

Gen diana	Dirección	Secuencia (5'→3')
<i>CYBB</i>	Sentido	GAGTTCGAAGACAACACTGGACAGG
	Antisentido	TATGAATAGAGGGAACTCCCTGG

### 3.2.10.2. Preparación de los oligonucleótidos

A continuación, se tuvo que anillar el ARNtrac y los ARNcr. Para la preparación de la mezcla de anillamiento debe utilizarse material libre de nucleasas. Consiste en mezclar 2,2µl de ARNtrac 200µM+2,2µl de cada ARNcr 200µM y completar hasta 10µl con agua destilada. La mezcla anteriormente descrita se sometió a una rampa de temperatura en el termociclador que comenzó con un ciclo de 5 minutos a 95°C e irá disminuyendo 5°C cada minuto hasta temperatura ambiente.

### 3.2.10.3. Preparación de la mezcla de nucleofección

Los reactivos y material necesario para la nucleofección forman parte del Kit para transfección Neon™ de Invitrogen.

Para cada electroporación se mezcló en un tubo 0,3µl de CAS9 (20 U de Alt-R® S.p. CAS9 Nuclease V3, Fisher Scientific) y 0,2µl de tampón correspondiente (tampón R), lo cual se incubó 10 minutos a 37°C. Para completar la mezcla de nucleofección se añadieron 2µl de promotor 20µM (Alt-R® CAS9 Electroporation Enhancer, Fisher Scientific). A estos 2,5µl de mezcla se añadió 0,5µl de la mezcla de anillamiento.

### 3.2.10.4. Nucleofección

La nucleofección es una técnica que consiste en la generación de poros transitorios en la membrana plasmática y nuclear de las células mediante la aplicación de una

corriente eléctrica. La generación de poros permite la entrada de material genético exógeno al interior del núcleo celular. En este trabajo se utilizó el aparato Neon Transfection System (Invitrogen) para este procedimiento.

Se realizaron 4 rondas de nucleofección. En cada ronda se electroporaron 300.000 células THP1 resuspendidas en 33µl de tampón R. Los parámetros de nucleofección fueron los propuestos por el fabricante para estas células, que pueden consultarse en Neon Transfection System Cell Line Data and Transfection Parameters.<sup>179</sup> Concretamente para las THP-1, se realizó un único pulso de 1450V durante 10ms con una proporción de CAS9/ARNcr de 1,25µg/7,5pmol. Tras la nucleofección, las células se depositaron en 1,5ml de RPMI 10% FBS 1% glutamina y sin antibiótico durante 24h.

### **3.2.10.5. Comprobación de la nucleofección**

Tras 24h de incubación se comprobó al microscopio que las células estaban rojas (Texas Red positivas, fluoróforo presente en ARNtrac).

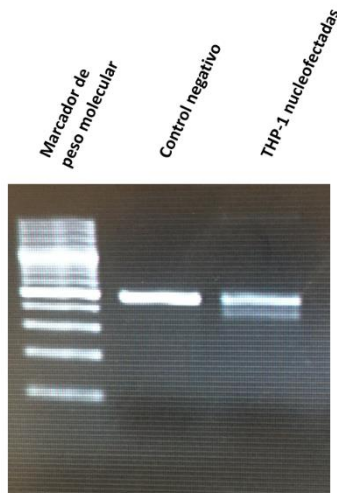
Por otro lado, se tomó una fracción de estas células para realizar una PCR de comprobación que nos permitió ver si la delección -de aproximadamente 100 pares de bases- estaba presente o no en parte de la población total de las células nucleofectadas. El ADN se extrajo utilizando el NZY Tissue gDNA Isolation kit (NzyTech). Los oligonucleótidos utilizados para dicha PCR se indican en la Tabla 12 y las condiciones de reacción fueron las siguientes:

- Desnaturalización (x1): 3 minutos a 98°C
- Amplificación (x35):
  - o Desnaturalización: 30 segundos a 98°C
  - o Anillamiento: 30 segundos a 58°C
  - o Extensión: 45 segundos a 72°C
- Extensión (x1): 7 minutos a 72°C

Los resultados de la PCR mostraron la presencia de la delección en parte de la población (Figura 12). La amplificación de la región interferida de *CYBB* de las células nucleofectadas resultó en dos bandas, una del tamaño de la banda amplificada en las células no interferidas que provenía de la parte de la población sobre la que la estrategia CRISPR-CAS9 no ha funcionado y la segunda banda aproximadamente 100 pares de



bases menor que corresponde a la región de *CYBB* amplificada en las células sobre las que la estrategia CRISPR-CAS9 ha delecionado de forma efectiva la región diana.



**Figura 12. Comprobación de la deleción producida por CRISPR-CAS9 en la población de células THP-1 nucleofectadas.** La imagen muestra un gel de agarosa con los productos de una PCR de amplificación de una región de *CYBB*, obtenidos tras la extracción del ADN genómico de las células THP1 nucleofectadas con ARNcr dirigido a NOX2 y ARNcr control (control negativo).

### 3.2.10.6. Generación de colonias *knock-out*

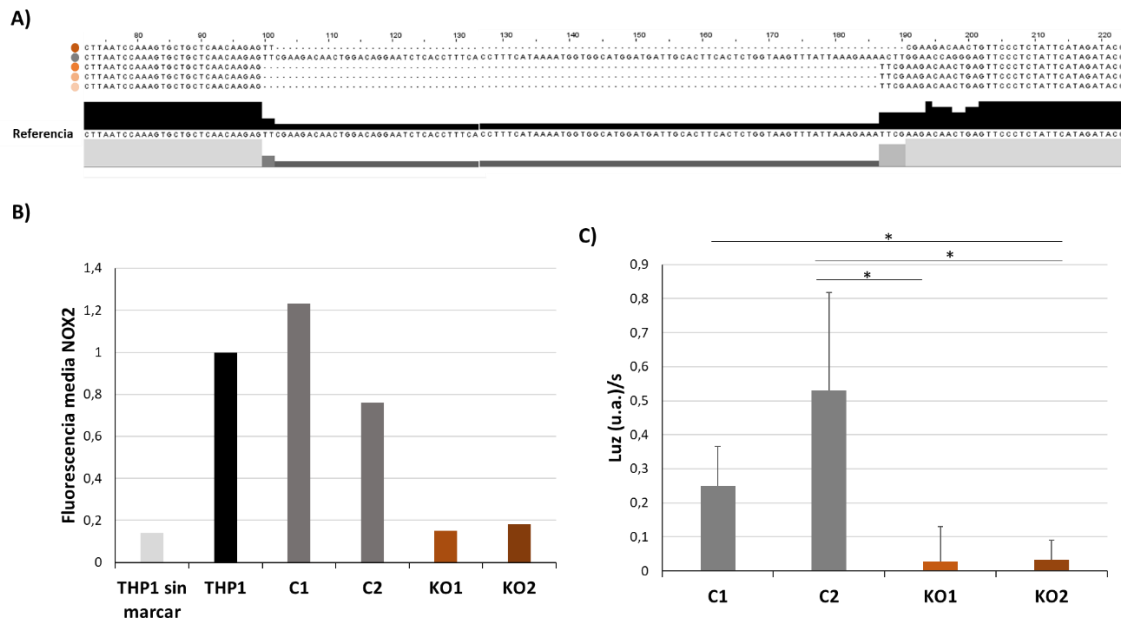
A continuación, se separaron unidades individuales de las células THP1 positivas para Texas Red en pocillos de placas de 96 pocillos con 100µl de RPMI 10% FBS 1% glutamina 1% Strp-Pen. Esta separación de célula única (*single-cell sorting*) se llevó a cabo en un citómetro FACS Aria III con la colaboración del Servicio de Citometría de la Universidad de Salamanca.

Se mantuvo y expandió el cultivo de cada una de las células aisladas hasta que formaron una colonia clónica, aproximadamente un mes y medio de cultivo. A lo largo de esta tesis a las células THP1 que hayan demostrado tener *CYBB* noqueado se les llamará KO, del inglés *knock-out*.

### 3.2.10.7. Comprobación de la eliminación de *CYBB* en las colonias *knock-out*

Por último, en cuanto los clones alcanzaban un número de células suficiente, se comprobó en cada uno de ellos si presentaron la deleción, realizando la PCR que se ha descrito previamente (resultados no mostrados). Aquellos que resultaron positivos (alrededor del 40%) se analizaron a nivel genotípico y fenotípico para caracterizar el comportamiento de los THP-1<sup>NOX2/KO</sup> (Figura 13). Las células THP-1<sup>NOX2/KO</sup> presentan una deleción de 86 pares de bases en el exón 4 del gen *CYBB* (Figura 13A), diseñada para

originar un desplazamiento del marco de lectura que da lugar a un codón de terminación en el exón 4. De este modo, la proteína NOX2 producida en estos clones está truncada, provocando que esta se marque para degradación. Este genotipo se traduce en la eliminación de la expresión proteica de NOX2 en membrana (Figura 13B) y una menor actividad NADPH oxidasa (Figura 13C).



**Figura 13. Comprobación de la delección de CYBB mediante la estrategia CRISPR-CAS9 en la línea celular THP-1.** A) Alineamiento de secuencias obtenidas por secuenciación genómica de tres clones noqueados para CYBB y un clon control. En naranja las secuencias de las THP-1<sup>NOX2</sup>KO y gris THP-1<sup>WT</sup>. B) Niveles de expresión de NOX2 en membrana plasmática cuantificados por citometría mediante marcaje celular con el anticuerpo 7D5 de MBL en las líneas celulares THP-1<sup>NOX2</sup>KO y células control siguiendo las recomendaciones del fabricante. C) Medida de actividad NOX cuantificada mediante ensayo de luminol tras activación con 2µM de PMA en líneas celulares KO y células control. Los datos representan la media ± desviación estándar de mínimo 3 experimentos.

### 3.2.11. Cuantificación de las especies reactivas del oxígeno

Las técnicas utilizadas para evaluar las ROS se detallan a continuación.

#### 3.2.11.1. Especies reactivas del oxígeno extracelulares

El luminol (Sigma-Aldrich, A8511) es un reactivo que emite luz cuando reacciona con un agente oxidante. Fue utilizado para cuantificar la producción de ROS extracelulares como medida de la actividad de las NADPH oxidasas. Para ello, suspendimos 200.000 células en 200µL de tampón de quimioluminiscencia por cada pocillo de reacción, y las depositamos en placas de 96 pocillos especiales para la medida por luminometría (opacas). Añadimos luminol 100µM a cada pocillo para la detección de

las ROS. Para cada condición se testó por triplicado: (1) un control negativo de la reacción con DPI 1  $\mu\text{M}$ , (2) una medida de los niveles basales, es decir, sin adición de DPI ni PMA, y (3) una medida de los niveles de ROS tras estimulación con PMA. La cuantificación de la quimioluminiscencia se realizó en un Varioskan Flash a 428nm. El protocolo de actuación programado constó de los siguientes pasos:

1. Incubación a 37°C y detección de los niveles basales de ROS cada 20 segundos, durante 5 minutos.
2. Extracción de la placa para añadir PMA 2 $\mu\text{M}$  a los pocillos.
3. Introducción nuevamente de la placa, agitación, e incubación a 37°C y detección de los niveles de ROS cada 20 segundos, durante 45 minutos.

Los datos de quimioluminiscencia se muestran como la cantidad de luz producida (en unidades arbitrarias) por segundo.

#### **3.2.11.2. Especies reactivas del oxígeno totales**

La diclorofluoresceína diacetato (DCF-DA, Sigma-Aldrich D6883) es un indicador de ROS que puede entrar al interior celular y se oxida de forma inespecífica por múltiples ROS. Por ello, se ha utilizado como test de los niveles totales de ROS. Se cultivaron las células a una concentración de  $4 \times 10^5$  células/ml durante 2h. Tras las 2h de cultivo, se lavaron las células y se resuspendieron en 500 $\mu\text{l}$  de medio PBS 1X a una concentración final de DCF de 10 $\mu\text{M}$ , donde se incubaron 30 minutos a 37°C. Tras los 30 minutos de incubación, se lavaron las células una vez con PBS 1X y se cuantificó el marcaje por citometría en el canal FITC.

#### **3.2.11.3. Peróxido de hidrógeno**

Amplex Red (Amplex Red, Fisher Scientific 11519056) es una sonda comúnmente utilizada para la medición del peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Inicialmente se plaquearon 100 $\mu\text{l}$  de medio KRPG con 10mM Amplex Red y 10U/ml de enzima peroxidasa de rábano, lo cual se atemperó durante 10 minutos a 37°C. Tras los 10 minutos de incubación, se adicionaron  $0,5 \times 10^5$  células en un volumen de 20 $\mu\text{l}$  de tampón KRPG a cada pocillo. La medición de Amplex Red se realizó en placas de 96 pocillos de luminometría en un Varioskan Lux a una absorbancia de 560nm. El protocolo de actuación programado constó de los siguientes pasos:

1. Agitación de 10 segundos e incubación a 37°C.

2. Detección de los niveles basales de ROS cada 30 segundos durante 5 minutos (fase de estabilización de la medida).
3. Agitación e incubación a 37°C.
4. Detección de los niveles de ROS cada 15 segundos, durante 15 minutos.

Los datos de Amplex Red se representan en una gráfica que muestra la fluorescencia en función del tiempo.

#### **3.2.11.4. Especies reactivas del nitrógeno**

Las especies reactivas del nitrógeno se han cuantificado utilizando 4-amino-5-metilamino-2',7'-Difluorofluoresceína diacetato (DAF-FM, Fisher Scientific 11520276). Se cultivaron las células a una concentración de  $4 \times 10^5$  células/ml durante 2h con o sin los tratamientos de Ara-C  $1 \mu\text{M}$  y Ox  $5 \text{mM}$ . Tras las 2h de cultivo, se lavaron las células y se resuspendieron en  $180 \mu\text{l}$  de medio HBSS  $\text{Ca}^{2+}$   $\text{Mg}^{2+}$  a una concentración final de DAF  $5 \mu\text{M}$  donde se incubaron 30 minutos a 37°C. Tras los 30 minutos de incubación, se lavaron las células una vez con PBS 1X e incubaron otros 30 minutos en  $180 \mu\text{l}$  de medio HBSS  $\text{Ca}^{2+}$   $\text{Mg}^{2+}$  fresco, tras lo que se cuantificó el marcaje por citometría en el canal FITC.

#### **3.2.11.5. Superóxido citoplasmático**

El superóxido citoplasmático se cuantificó utilizando dihidroetidio (DHE). Se cultivaron las células a una concentración de 400.000 células/ml durante 2h con o sin los tratamientos de Ara-C  $1 \mu\text{M}$  y Ox  $5 \text{mM}$ . Tras las 2h de cultivo, se lavaron las células y se resuspendieron en  $180 \mu\text{l}$  de medio HBSS  $\text{Ca}^{2+}$   $\text{Mg}^{2+}$  a una concentración final de DHE  $10 \mu\text{M}$  donde se incubaron 30 minutos a 37°C. Tras los 30 minutos de incubación, se lavaron las células una vez con PBS 1X y se cuantificó el marcaje por citometría en el canal PE.

#### **3.2.11.6. Superóxido mitocondrial**

El superóxido mitocondrial se cuantificó utilizando MitoSox Red (Fisher Scientific M36008). Se cultivaron las células a una concentración de  $4 \times 10^5$  células/ml durante 2h con o sin los tratamientos de Ara-C  $1 \mu\text{M}$  y Ox  $5 \text{mM}$ . Tras las 2h de cultivo, se lavaron las células y se resuspendieron en  $180 \mu\text{l}$  de medio HBSS  $\text{Ca}^{2+}$   $\text{Mg}^{2+}$  a una concentración final de MitoSox Red  $5 \mu\text{M}$  donde se incubaron 30 minutos a 37°C. Tras los

30 minutos de incubación, se lavaron las células tres veces con PBS 1X, tras lo que se cuantificó el marcaje por citometría en el canal PE.

### **3.2.11.7. Determinación del estado oxidativo de la célula**

Los experimentos respectivos a la medición del estado oxidativo se realizaron en colaboración con el grupo de Catherine Garrel, de la Unidad de Bioquímica Nutricional y Hormonal del Instituto de Biología y Patología del Hospital Grenoble Alpes.

50 millones de células se incubaron a una densidad de  $1 \times 10^6$  de células/ml en presencia o ausencia de 5mM de oxamato y 1 $\mu$ M de Ara-C durante 4h. Se tomó una muestra de células a tiempo 0h para evaluar si se producían cambios tras 4h de cultivo. Tras las 4h, se recogieron las células evitando un procesamiento brusco que pudiera inducir la producción de ROS. Se centrifugaron las células 5 minutos a 1500rpm a 4°C y de lavaron en 3 ocasiones con 10 ml de PBS frío. Los pellets se congelaron a -80°C. Posteriormente, las células se desintegraron mediante 5 ciclos de congelación/descongelación en tampón Tris hipotónico.

### **3.2.12. Evaluación del estado oxidativo de la célula**

#### **3.2.12.1. MDA/TBARS**

Tanto el malonilaldehído (MDA, de sus siglas en inglés *malondialdehyde*) como las sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS, de sus siglas en inglés *thiobarbituric acid reactive substances*) son resultado de la peroxidación lipídica de los ácidos grasos insaturados de las membranas celulares. TBARS puede derivarse de MDA y otros productos de descomposición de la peroxidación lipídica. El contenido de MDA y TBARS se determinó mediante un método de cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa basado en el ensayo del ácido tiobarbitúrico tal y como se describe en <sup>180</sup>. Los aductos MDA-TBA se separan de las sustancias de interferencia. El producto de descomposición del 1,1,3,3-tetraetoxipropano se utilizó como estándar. El aducto TBA-MDA se cuantificó con un detector de fluorescencia ajustado a 532 nm de excitación y 553 nm de emisión.

#### **3.2.12.2. GSH/GSSG**

La relación GSH/GSSG es un potente indicador del potencial redox de órganos y tejidos. El contenido total de GSH se determinó basándonos en una evaluación

espectrofotométrica de la tasa de reducción del ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) (Sigma, Lyon, Francia) a ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB) tal y como se describe en <sup>181</sup>. La tasa de reducción de DTNB a TNB se registró a 412 nm. Los valores se determinaron comparando la tasa de reducción con una curva estándar de GSH. La concentración de GSSG se determinó en las mismas condiciones tras ajustar el pH con etanolamina y atrapar el GSH reducido con 2-vinilpiridina añadida a la muestra. El contenido de GSH se calculó restando el contenido de GSSG del contenido total de GSH.

### **3.2.12.3. Actividad de enzimas antioxidantes**

La actividad de las enzimas antioxidantes (SOD, catalasa y Gpx, GR) se determinó siguiendo los procedimientos descritos en <sup>180</sup>, utilizando los ensayos espectrofotométricos del pirogalol para medir la actividad de la superóxido dismutasa, la determinación de la descomposición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para medir la actividad de la catalasa y el método glutation reductasa-NADPH para medir la actividad de la Gpx y la GR.

### **3.2.12.4. Tioles**

La concentración de tioles libres, que refleja el estado oxidativo de los aminoácidos sulfhidrilos, se evaluó según la prueba de Ellman tal y como se describe en <sup>182</sup>. Esta técnica se basa en la propiedad del reactivo de Ellman 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoico) de reducirse por los tioles libres en un compuesto amarillo cuya concentración se midió a 412 nm.

### **3.2.13. Análisis metabólico mediante la herramienta Seahorse**

Se utilizó la herramienta Seahorse (Agilent) para medir la actividad de las dos principales vías metabólicas de la célula: la respiración mitocondrial y la glucólisis. Los experimentos se realizaron en un Seahorse Xfe24 Analyzer. La preparación de las células se llevó a cabo siguiendo los procedimientos propuestos por el fabricante para células en suspensión. En primer lugar, se recubrieron las placas de 24 pocillos (Agilent, 102342-100) con 50µl de solución de Cell-Tak 0.04mg/ml (adhesivo de tejidos), que se incubó durante 20 minutos, tras lo que se retiró y se dejaron secar los pocillos durante aproximadamente 30 minutos. A continuación, se depositaron 10<sup>5</sup> células suspendidas en 100µl de medio Seahorse en cada pocillo. El número de células que se debe depositar ha de ser testado para cada línea celular; en este trabajo tanto MOLM-13 como HL60 y THP1 obtuvieron valores óptimos en las condiciones descritas. Se realizó una centrifugación

suave (300xg) de 2 minutos, procurando ralentizar al máximo el proceso de deceleración para evitar que las células se despegaran del fondo del pocillo. Entonces se incubaron las células durante 30 minutos a 37°C a 5% de CO<sub>2</sub>, tras lo que se añadieron 400µl adicionales de medio de Seahorse a cada pocillo. Todas las condiciones de un experimento se testaron mínimo por cuatuplicado. Una vez las células preparadas, se testó el consumo de ATP y la respiración mitocondrial como se indica a continuación.

Los resultados obtenidos mediante la herramienta Seahorse se analizaron utilizando las herramientas informáticas Wave y Seahorse Analytics desarrolladas por Agilent.

### **3.2.13.1. Determinación del consumo de ATP**

Se ha utilizado un protocolo para Seahorse denominado Agilent Seahorse XF Real-Time ATP Rate Assay (Agilent) que permite la medición de la producción de ATP en células vivas. Más relevante aun, permite diferenciar si la procedencia del ATP es mitocondrial o glucolítica. Este protocolo se desarrolló midiendo los niveles de consumo de oxígeno (OCR, de sus siglas en inglés *oxygen consumption rate*) y de eflujo de protones (PER, de sus siglas en inglés *proton efflux rate*) en condiciones basales y tras dos inyecciones como se describe a continuación. Inicialmente, se realizó una medición de OCR y ECAR en condiciones basales. A continuación, se repitió la medición tras la adición de 1,5µM de oligomicina (inhibidor de la ATPasa), que bloqueó la producción de ATP mitocondrial, de modo que el descenso de OCR se puede relacionar con la tasa de producción de ATP mitocondrial. La consiguiente adición de 0,5µM de rotenona (inhibidor del complejo I) y actinomicina (inhibidor del complejo III) suprimió las dos fuentes de acidificación mitocondrial; de modo que, sustrayendo el PER calculado tras la inyección de rotenona+actinomicina al incremento de PER producido tras la oligomicina, se calculó la tasa de producción de ATP glucolítico. Los inhibidores mencionados previamente fueron adquiridos donde se indica en la Tabla 4. Siguiendo las indicaciones del fabricante, se determinó tomar 3 medidas cada 3 minutos de cada una de las fases metabólicas en estudio.

### **3.2.13.2. Determinación de la respiración mitocondrial**

Para la determinación de la respiración mitocondrial se utilizó el kit Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit (Agilent). Este protocolo consiste en la medición de los niveles de OCR y de la acidificación extracelular (ECAR, de sus siglas en inglés *extracellular*

*acidification rate*) en condiciones basales, tras la adición de 1,5 $\mu$ M de oligomicina, de 1 $\mu$ M de FCCP y de 0,5 $\mu$ M de rotenona+actinomicina. La primera inyección, oligomicina (inhibidor de la ATPasa), inhibió la síntesis de ATP y redujo el flujo de protones por la ETC. Al igual que en el protocolo de determinación de la producción de ATP, el descenso en OCR se relaciona con la producción de ATP mitocondrial. En la segunda inyección se agregó FCCP, un desacoplante de la membrana mitocondrial, que disipa el potencial de membrana provocando una aceleración del flujo de electrones a través de la ETC que permite el cálculo de la respiración máxima que puede alcanzar la célula. Por último, se inyectaron rotenona+actinomicina (inhibidores del complejo I y III respectivamente) que bloquean por completo la respiración mitocondrial y permiten calcular si existe fuga de electrones a través de la membrana mitocondrial que contribuye a la producción de ATP, pero no deriva del metabolismo mitocondrial. La procedencia de los inhibidores mencionados se indica en la Tabla 4. Siguiendo las indicaciones del fabricante, se determinó tomar 3 medidas cada 3 minutos de cada una de las fases metabólicas en estudio.

#### **3.2.14. Determinación de la actividad de los complejos I, II y IV**

Este experimento se realizó con la colaboración del grupo de Hervé Dubouchaud de la Universidad de Grenoble Alpes.

Utilizamos la oxigrafía para medir la actividad de los complejos I, II y IV. De cada condición en estudio cultivamos 5x10<sup>6</sup> células a una densidad 0,5 x 10<sup>6</sup> células/ml durante 16 horas. Tras el cultivo, las células se centrifugaron 10 minutos a 2000 rpm a temperatura ambiente y se resuspendieron 5x10<sup>6</sup> células en 500 $\mu$ l de tampón KET. Las células se mantuvieron en hielo para frenar su actividad metabólica hasta comenzar la medición. La tasa de consumo de oxígeno mitocondrial se midió a 30°C en una cámara de incubación con un electrodo de O<sub>2</sub> tipo Clarke completo con 0,5 ml de tampón KET y 0,5 x 10<sup>6</sup> de células. En primer lugar, se realizó una medición basal una vez añadido fosfato inorgánico 5mM, sustrato del complejo V, y 2,5 $\mu$ l de digitonina 2% para permeabilizar las células. A continuación, se añadieron los inhibidores y sustratos que requería cada complejo:

- Para el complejo I, se adicionaron glutamato y malato a una concentración 5mM y 2,5mM respectivamente. Acto seguido, se añadió ADP 100mM para calcular el consumo máximo de oxígeno por la ETC y, por último, se añadió



un desacoplante de la membrana mitocondrial DNP 0,2mM que permitió el cálculo máximo de consumo de oxígeno independiente del complejo V.

- Para el complejo II, se inhibió la actividad del complejo I con rotenona 1mM y a continuación se midió el consumo de oxígeno al añadir succinato 5mM, ADP 100mM y 2,4-dinitrofenilhidracina (DNP) 0,2mM.
- Para el complejo IV, se inhibió la actividad del complejo III con actinomicina 1mM y a continuación se midió el consumo de oxígeno al añadir N,N,N',N'-Tetrametil-p-fenilenediamina dihidrocloro (TMPD)/ascorbato 25mM/10mM y DNP 0,2mM.

Tomamos el excedente no utilizado de la oxigrafía para medir la actividad citrato sintasa. La actividad citrato sintasa se utiliza como medida de normalización del número de mitocondrias presentes en la célula. La actividad citrato sintasa se mide en un espectrofotómetro cuantificando la absorbancia a una longitud de onda de 412nm durante aproximadamente 3 minutos. De inicio mezclamos en 945µl de tampón de citrato sintasa con 5µl de las células que previamente habíamos utilizado para medir la actividad de los complejos. Se midió la absorbancia de esta mezcla durante 1 minuto y medio y posteriormente se añadió oxalacetato a una concentración 175µM y se midió la absorbancia durante otros 2 minutos.

La oxigrafía nos proporciona un gráfico donde se visualiza el consumo de oxígeno en µmoles de oxígeno a lo largo del tiempo. De cada fase metabólica se tomó la pendiente de la recta, es decir, los µmoles de oxígeno/minuto consumidos. Esos valores se normalizaron en función de la actividad citrato sintasa de cada una de las muestras y se representaron gráficamente. Por último, se calculó el ratio de respiración mitocondrial (RCR, de sus siglas en inglés *respiration control ratio*), que resulta de la división de los datos obtenidos en el estado III (tras la adición de ADP) entre el estado IV (tras la adición de oligomicina). El RCR mide el acoplamiento entre respiración y fosforilación de ADP, es decir, es un indicativo de una respiración eficiente y en consecuencia de unas mitocondrias sanas.

### **3.2.15. Determinación del potencial de membrana**

El potencial de membrana se midió utilizando éster etílico tetrametilrodamina (TMRE, Invitrogen T669) que es un colorante catiónico capaz de penetrar en las mitocondrias activas. Para este ensayo se incubaron 3ml de células a una concentración

de  $2,5 \times 10^5$  células/ml para cada condición en estudio. Se recogieron todas las células y se separaron en 3 tubos depositando  $2,5 \times 10^5$  células por tubo. Se centrifugaron 5 minutos a  $4^\circ\text{C}$  a  $0,5 \times g$  para poder retirar el sobrenadante e incubar las células durante 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$  en 1ml de RPMI al 1% en FBS; 50nM de TMRE;  $1\mu\text{M}$  de ciclosporina. Tras la media hora de incubación, las células se lavaron una vez y tras 10 minutos a temperatura ambiente se adquirió uno de los tubos por citometría. En ese momento, a los tubos 2 y 3 se les añadió  $4\mu\text{M}$  de FCCP y  $8\mu\text{M}$  de FCCP, respectivamente. Tras 10 minutos de incubación a temperatura ambiente con el FCCP, se adquirieron las células de los tubos 2 y 3 por citometría.

Los valores obtenidos en los tubos 2 y 3 se utilizaron para normalizar los resultados obtenidos en el tubo 1 a los cuales había que substrair el valor mínimo obtenido en 2 o 3. Los tubos 2 y 3 reportaron información sobre el ruido de fondo -contribuciones no provenientes de potencial mitocondrial que pueden alterar TMRE- ya que aportan una referencia del valor de pérdida total del potencial de membrana ocasionado por la adición de FCCP.

### **3.2.16. Análisis metabólicos**

La resonancia magnética nuclear y el posterior análisis estadístico del metaboloma se realizó en colaboración con el grupo de Bénédicte Elena-Herrmann de la Universidad de Grenoble Alpes.

#### **3.2.16.1. Preparación de las muestras**

El análisis metabólico se llevó a cabo mediante Resonancia Magnética Nuclear (NMR, por sus siglas en inglés *nuclear magnetic resonance*). Se cultivaron 10 millones de células de cada condición a una concentración de  $0,5 \times 10^6$  células/ml durante 16h en presencia de  $1\mu\text{M}$  de Ara-C, 5mM de Ox o sin inhibidor. Tras las 16h de cultivo, se recogieron las muestras en un tubo y centrifugaron durante 1 minuto a  $1000 \times g$  a  $4^\circ\text{C}$  de temperatura. A partir de este momento fue muy importante mantener las muestras a  $4^\circ\text{C}$  de temperatura por lo que se trabajó constantemente en hielo y con soluciones frías. Tras la centrifugación se retiró el sobrenadante tratando de minimizar la cantidad de medio presente en la muestra. Se lavaron las células con 10ml de NaCl 0,9% p/v y se centrifugaron de nuevo 1 minuto a  $1000 \times g$  a  $4^\circ\text{C}$ . Se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 3ml de metanol de alta pureza (Fisher Scientific, 15614680) que se

trasladó a un tubo de pyrex capaz de soportar bajas temperaturas. Una vez en el tubo de cristal se añadió 1ml extra de metanol. A continuación, se procedió al paso de evaporación del metanol que se realizó mediante exposición lenta a nitrógeno gaseoso a baja temperatura durante 5h. Tras este tiempo, se resuspendió la muestra en 650µl de agua deuterizada (tampón de fosfato sódico 0.2M en D<sub>2</sub>O con 0.002mM NaN<sub>3</sub>) y se agitó vigorosamente durante 30 segundos. El líquido presente en la muestra se transfirió a un tubo eppendorf, evitando tomar los restos celulares sólidos y se centrifugó 5 minutos a 12000 rpm 4°C. Tras la centrifugación se introducen 550µl en un tubo de NMR de 5mm.

Inicialmente se hicieron varios controles de calidad para garantizar que el medio de cultivo de las células no estaba interfiriendo en la medida de metabolitos. Para ello se añadió 10µl del compuesto TSP 0,1M a las células recogidas. Este compuesto se puede detectar con facilidad en el espectro de resonancia de modo que su ausencia nos permitió garantizar que el procesamiento y lavado de las muestras eran eficaces a la hora de eliminar todo el medio.

### **3.2.16.2. Resonancia magnética nuclear**

El espectrómetro utilizado fue un Bruker Avance IVDr que funcionaba a 600MHz (frecuencia de resonancia <sup>1</sup>H), equipado con una sonda de RMN de solución BBI de 5 mm y una sonda MAS de alta resolución HCP de 4mm, y con cambiador de muestras automáticos asociados con capacidad de refrigeración para la adquisición de alto rendimiento (Bruker SampleJet). Los experimentos de RMN se realizaron a 27°C. Los perfiles metabólicos de <sup>1</sup>H se registraron mediante un experimento NOESY convencional con presaturación de agua (programa de pulsos Bruker noesygppr1d) utilizando una anchura espectral de 11904Hz y un tiempo de adquisición de 4.12s, un tiempo de mezcla de 10ms y un retardo de reciclado de 3s para cada uno de los 512 escaneos que se coadquirieron. La longitud del pulso de 90° se calibró automáticamente en cada muestra en torno a 11,26µs después de un ajuste y sintonización automáticos.

### **3.2.17. Modelo *in vivo* de leucemia mieloide aguda**

Las células murinas responsables del desarrollo del modelo animal utilizado en esta tesis fueron amablemente cedidas por el Dr. Marcus Järas de la Universidad de Lund, Suecia. El modelo de ratón se generó transduciendo el oncogén MLL-AF9 a células GMP de ratones con fondo dsRED. Las células transducidas se trasplantaron en serie en ratones C57BL/6J para enriquecer las células iniciadoras de la leucemia <sup>183</sup>. Tras cuatro

trasplantes seriados, se seleccionaron las células mononucleares de los ratones trasplantados cKIT positivas con el fin de enriquecer las células iniciadoras de la leucemia. Estas son las células que nos envió el grupo del Dr. Järas. A continuación, se describe el procedimiento llevado a cabo para reproducir el modelo en nuestro laboratorio.

### **3.2.17.1. Descongelación de las células murinas MLL-AF9 dsRed**

Las células murinas pueden mantenerse en buen estado largos periodos de tiempo siempre y cuando se encuentren a  $-190^{\circ}\text{C}$  en nitrógeno líquido. Para poner a punto el modelo, en primer lugar tuvimos que descongelar las células. Las células se descongelaron en un baño a  $37^{\circ}\text{C}$ . Inmediatamente después de la descongelación, añadimos 1ml de FBS y seguidamente se añadieron 9 ml de RPMI 10%FBS gota a gota permitiendo que la célula se adaptara a su nuevo medio sin generar demasiado estrés por cambios iónicos, de pH... Las células se lavaron en una ocasión con PBS 2% FBS y se contaron.

### **3.2.17.2. Propagación de las células murinas MLL-AF9 dsRed**

Nada más descongelar las células, estas se preparan para ser trasplantadas a los ratones receptores del trasplante primario donde proliferarán durante 3 semanas aproximadamente generando una mayor población celular.

En los experimentos que se describen en esta tesis se utilizaron ratones macho C57BL/6J silvestres de entre 6-8 semanas adquiridos en el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca. Los ratones recibían una dosis de irradiación subletal de 6G 6 horas antes de recibir el trasplante. A cada ratón se le trasplantaron 1 millón de células MLL-AF9 dsRed en 120 $\mu\text{l}$  de PBS inyectadas en las venas laterales de la cola mediante jeringas con agujas de 27G.

Mantuvimos a todos los animales con una dieta estándar y bajo condiciones específicas libres de patógenos durante aproximadamente 3 semanas hasta que los ratones empezaron a mostrar signos de enfermedad: pelo desaliñado, pérdida de peso, inactividad y parálisis de las patas traseras. Cuando los ratones alcanzaron alguno de los criterios de punto final fueron sacrificados.

### **3.2.17.3. Obtención de las células murinas MLL-AF9 dsRed de los ratones donantes**

Las células MLL-AF9 dsRed se propagaron principalmente en la médula ósea y el bazo de los ratones C57BL/6J con una presencia por encima del 95% en ambos órganos. Por tanto, tuvimos que procesar dichos órganos como se describe a continuación para extraer la población de células.

Tras el sacrificio, extrajimos los huesos de las 4 patas y la cadera de los ratones y retiramos la capa muscular que los recubría. Cortando las epífisis de los huesos, insuflamos PBS 1X a través de la cavidad interna de los huesos utilizando agujas de 25G. El paso del PBS a través del hueso arrastra las células de médula ósea que hicimos pasar por tamices de 70µm con el fin de disgregar los agregados celulares. La extracción de la médula ósea se puede visualizar claramente ya que los huesos pierden coloración y se vuelven transparentes. Estas células se lavan en un volumen mínimo de 10ml de PBS al menos en una ocasión.

Junto con el aislamiento de los huesos, procedimos a extraer el bazo. El primer paso de procesamiento del bazo consistió en triturarlo en pequeños fragmentos de modo que pudiera ser disgregado por fricción de dos portaobjetos. Una vez disgregado, el machacado de células se recogió mezclándolo con PBS 1X, lo cual se hizo pasar por un tamiz de 70µm como se había realizado previamente con la médula ósea. Estas células se lavaron en un volumen mínimo de 10ml de PBS al menos en una ocasión.

A continuación, tanto las células obtenidas del bazo como de la médula ósea se incubaron durante 10 minutos en hielo con 10ml de una solución de lisis de la serie roja. Seguido de la incubación las células se lavaron en dos ocasiones con PBS 1X. En este paso las células ya están preparadas para reproducir el modelo.

### **3.2.17.4. Trasplantes secundarios de las células murinas MLL-AF9 dsRed**

En los experimentos llevados a cabo en esta tesis, las células procedentes de donantes primarios fueron directamente trasplantadas a receptores de trasplante secundario o bien previamente tratadas durante 24h con los inhibidores DPI y/o oxamato. Las células murinas MLL-AF9 dsRed no crecen bien en cultivo, pero pueden mantenerse durante 24h en medio IMDM 20% FBS; 1% glutamina; 1% Strep-Pen; 20ng/ml

interleucina 3 de ratón; 20ng/ml interleucina 6 de ratón; 50ng/ml factor de células madre de ratón o *mouse stem cell factor* en inglés.

Para los experimentos utilizamos como controles animales del mismo género y edad similar. Todos los procedimientos que utilizamos durante este estudio se llevaron a cabo de acuerdo con la legislación vigente (Real Decreto 53/2013 de 1 de febrero, y Orden ECC/566/2015 de 20 de marzo). Fueron aprobados previamente por el Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca (018N°201400031244) y autorizados por la Consejería de Agricultura y Ganadería de la Junta de Castilla y León.

### **3.3. Métodos estadísticos**

Los análisis bioinformáticos se llevaron a cabo en el software R<sup>184</sup> (versión 3.5.2; <http://www.r-project.org>) y el repositorio Bioconductor (<http://www.bioconductor.org>) para el análisis de datos genómicos. Dichos análisis se implementaron utilizando las librerías *affy*, *limma*, *MultBiplotR*, *MASS*, *pROC*, *survminer* y *factorextra*. Las figuras se generaron mediante los paquetes de R *geneplotter*, *ggplot* y *plotly*. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando IBM SPSS Statistics v. 26 y v.28 (IBM), GraphPad Prism 8 (GraphPad Software) y el propio software de R.

#### **3.3.1. Análisis descriptivo de los datos**

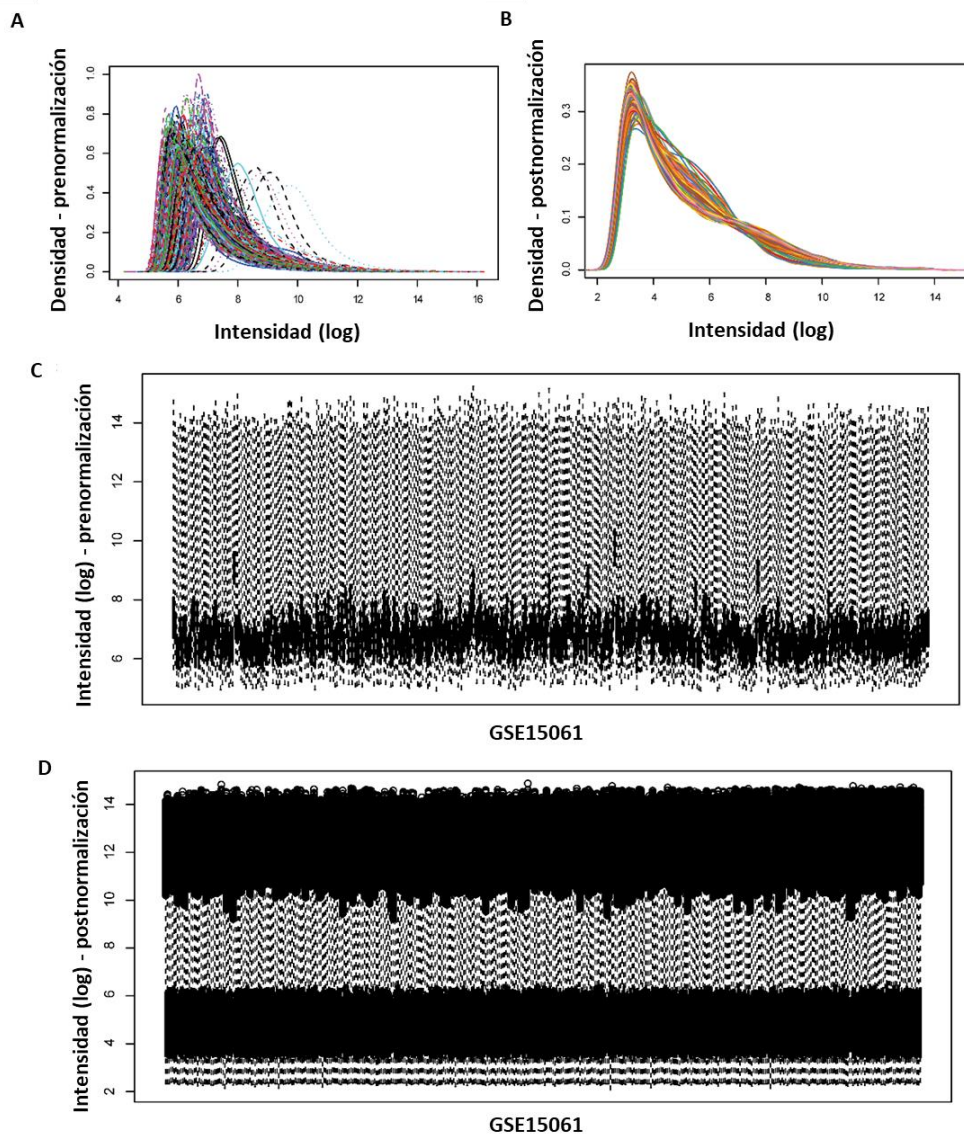
Para cada variable continua analizada, se calculó la mediana y el rango intercuartílico o la media y la desviación estándar (DE) en función de la distribución de la variable. Para las variables categóricas, se indicaron las frecuencias y los porcentajes. El análisis inferencial de las posibles diferencias entre los grupos se determinó mediante la prueba t de Student y ANOVA (para las variables cuantitativas con distribuciones paramétricas); las pruebas U de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis (para las variables cuantitativas con distribuciones no paramétricas) o la prueba de Chi-cuadrado o test de Fisher (para las variables categóricas). La significación estadística utilizada para todo el estudio fue del 5%.

#### **3.3.2. Procesamiento de datos de expresión**

##### **3.3.2.1. Normalización de bases de datos**

Los archivos CEL de datos de microarrays corresponden a la plataforma de arrays de oligonucleótidos Affymetrix GPL570 ((HG-U133\_Plus\_2) Affymetrix Human

Genome U133 Plus 2.0 Array). Se corrigió la señal o ruido de fondo de los archivos de expresión y se normalizó utilizando *Robust Multi-array Average* (RMA), lo que dio como resultado valores de expresión  $\log_2$ . Los boxplots y gráficos de densidad muestran los patrones de muestra estabilizados resultantes tras la normalización (Figura 14). Las sondas de control de Affymetrix se excluyeron del análisis. Se utilizaron los valores medios de expresión de las sondas correspondientes a un mismo gen. Una vez realizado el preprocesamiento, los datos fueron analizados en busca de genes expresados de forma diferencial entre los distintos factores pronósticos de la enfermedad, basado en los valores de tasa de cambio (FC, de sus siglas en inglés *fold change*) y en los p-valores significativos ajustados, corregidos por la tasa de falsos descubrimientos (FDR).



**Figura 14.** La normalización RMA de la base de datos GSE15061 dio lugar a la homogeneización de la muestra. (A) Diagrama de densidad que muestra la distribución de 449 muestras antes de la

normalización RMA. (B) Gráfico de densidad que muestra la distribución de 449 muestras después de la normalización RMA. (C) Dispersión de 449 muestras representada por boxplot, antes de la normalización RMA. (D) Dispersión de 449 muestras representada por boxplot, después de la normalización RMA.

### **3.3.2.2. Generación de grupos de niveles *CYBB***

La generación de grupos de *CYBB* para la base de datos GSE15061 se realizó en relación a los niveles de *CYBB* en donantes sanos de la siguiente manera: las muestras High-*CYBB* correspondían a aquellas cuyo valor de expresión de *CYBB* fue superior al percentil 10 de expresión de *CYBB* en donantes sanos; de las muestras restantes, las que presentaron valores de expresión inferiores al percentil 25 de expresión de *CYBB* en LMA se asignan al grupo de Low-*CYBB* (n=78), y las que tienen valores superiores al percentil 25 se consideraron Medium-*CYBB* (n=234).

Los conjuntos de datos sin muestras sanas se agruparon de la siguiente manera: las muestras con valores de *CYBB* superiores al percentil 75 de expresión de *CYBB* se clasificaron en el grupo High-*CYBB*; las muestras con valores de *CYBB* inferiores al percentil 25 de expresión de *CYBB* se categorizaron en el grupo Low-*CYBB*; las muestras restantes se clasificaron como Medium-*CYBB*.

### **3.3.2.3. Análisis de ontología genética y generación de redes de genes**

Se utilizaron dos herramientas informáticas de análisis ontológico para medir el enriquecimiento de funciones génicas específicas: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID; <http://david.abcc.ncifcrf.gov>) y Gene Set Enrichment Analysis from Webgestalt (GSEA; <http://www.webgestalt.org/>). Asimismo, comprobamos las vías GO y KEGG mayoritariamente enriquecidas al insertar los genes diferencialmente expresados (DEG, de sus siglas en inglés *differentially expressed genes*) en los parámetros de búsqueda de las herramientas online DAVID o Webgestalt a nivel funcional. Consideramos las diferencias como significativas cuando el p valor < 0,05.

## **3.3.3. Técnicas estadísticas para el análisis de datos de expresión**

### **3.3.3.1. Correlaciones**

La relación lineal entre dos variables continuas se estudió mediante el coeficiente de correlación lineal de Pearson. Los valores r de correlación de la expresión entre los genes que conformaron el panel de 29G se representaron mediante un mapa de calor.



### 3.3.3.2. Análisis discriminante

El análisis discriminante lineal (LDA, de sus siglas en inglés *Linear Discriminant Analysis*) es un método estadístico multivariante que permite encontrar dimensiones que caractericen o separen dos o más clases de objetos o eventos, mediante la combinación lineal de las variables de partida. Las funciones discriminantes del LDA y los ejes canónicos del Biplot Canónico se estimaron como una combinación lineal de los genes que conformaban 29G de manera que se maximizara el cociente entre las matrices de covarianza entre grupos dentro de los grupos. Las capacidades de discriminación de grupos pronósticos asociadas a la expresión de los 29G se visualizaron gráficamente en un espacio dimensional reducido generado por los ejes discriminantes. La capacidad predictiva se evaluó mediante la tabla de clasificación y los porcentajes de correcta clasificación.

### 3.3.3.3. Biplot canónico

El LDA se amplió con el análisis Biplot Canónico<sup>185,186</sup> que permite la representación simultánea de las muestras de los pacientes de los tres grupos pronóstico y de los 29 genes en un mismo gráfico de dispersión generado por los ejes canónicos, de manera que se pudiera visualizar la relevancia de cada gen individual de los 29G en las diferencias entre los grupos de pronóstico.

Los gráficos de dispersión obtenidos en el Biplot Canónicos pueden interpretarse siguiendo las siguientes reglas. (1) Las variables se representan como vectores, las muestras como puntos y las medias de los diferentes grupos como estrellas rodeadas de círculos de confianza. (2) Cuanto más cerca estén los dos grupos en el gráfico, más similares son sus perfiles de expresión génica. La misma relación es válida para las ubicaciones de las muestras individuales. (3) La longitud de cada vector refleja la variabilidad de la expresión génica y (4) los cosenos de los ángulos entre los vectores reflejan la correlación entre ellos (los ángulos agudos reflejan una relación directa entre los genes, mientras que los ángulos obtusos reflejan genes inversamente correlacionados). (5) Los niveles de expresión génica pueden extraerse para cada muestra (o grupo) trazando una proyección perpendicular del punto que lo representa sobre la dirección del gen. Así, cuanto más cerca esté dicho punto de la punta de la flecha, mayor será el valor de expresión del gen. (6) Las proyecciones de los círculos sobre la dirección de una variable se aproximan a un intervalo de confianza, lo que significa que cuando dos

círculos se proyectan perpendicularmente y se superponen no hay diferencias significativas entre las medias de los grupos.

#### **3.3.3.4. Generación de índice de expresión (EI)**

Quisimos generar una un índice de expresión (EI) que nos aunara en un único valor representativo la expresión de los genes de 29G. El  $EI_i$  se calculó como una combinación lineal de los valores de expresión génica ( $g_j$ ) para cada muestra  $i$  ( $i = 1, \dots, I$ ), como sigue:

$$EI_i = \alpha_1 \cdot \{\beta_{11}g_{i1} + \dots + \beta_{k1}g_{ij}\} + \alpha_2 \cdot \{\beta_{12}g_{i1} + \dots + \beta_{k2}g_{ij}\}$$

donde  $\alpha_k$  indica la precisión global de cada función  $k$  ( $\alpha_1$  para LD1 y  $\alpha_2$  para LD2),  $\beta_{jk}$  indica los coeficientes discriminantes de cada gen seleccionado  $j$  ( $j = 1, \dots, 29$ ) en la correspondiente función discriminante  $k$  y  $g_{ij}$  se refiere a los valores de expresión génica del gen  $j$  en la muestra  $i$ .

#### **3.3.3.5. Curvas ROC**

La construcción de una curva ROC nos permitió encontrar un punto de corte adecuado en EI que permitiera separar dos grupos de expresión de *CYBB*. Los pacientes con LMA se separaron en grupos de Low-Index (EI bajo) o de High-Index (EI alto) utilizando el análisis de curva ROC. El punto óptimo de corte se definió como aquel que maximizase el índice de Youden, en base a los valores obtenidos de sensibilidad y especificidad.

#### **3.3.3.6. Análisis de supervivencia**

La representación de los datos de tiempo de supervivencia se realizó con curvas de Kaplan-Meier y el test estadístico que se utilizó para comparar la supervivencia entre los grupos fue el test de Log-Rank.

#### **3.3.3.7. Clustering jerárquico kmeans**

Las técnicas estadísticas no supervisadas para el análisis de cluster permiten la identificación de patrones o subgrupos de muestras con comportamiento similar en base a sus características. Se utilizó Hierarchical Kmeans para determinar 4 conglomerados no superpuestos para las muestras intermedias de GSE10358 y phs001657.v1.p1 a partir de los datos de expresión de 29G, donde cada muestra pertenece a un solo grupo.

### **3.3.4. Procesamiento de datos metabolómicos**

#### **3.3.4.1. Normalización de datos metabólicos**

Los decaimientos de inducción libre se multiplicaron por una función exponencial correspondiente a un ensanchamiento de línea de 0,3Hz antes de la transformación de Fourier. Todos los espectros se desfasaron automáticamente y se referenciaron al doblete de alanina a 1,47 ppm. Se excluyó la señal de agua residual (rango 4,7-4,9 ppm), y los conjuntos de datos se agruparon en el rango espectral [0,1-10 ppm] en variables de 0,001 ppm de ancho utilizando el software AMIX (Bruker GmbH). Estas muestras no requirieron ningún procedimiento de alineación adicional.

#### **3.3.4.2. Identificación de los metabolitos**

La identificación de metabolitos se llevó a cabo a partir de perfiles <sup>1</sup>H unidimensionales y firmas multivariantes de análisis estadístico (cargas), utilizando ChenomX NMR Suite 8 (ChenomX Inc., Edmonton, Canadá) y su base de datos asociada de compuestos puros, así como la base de datos HMDB. Los análisis estadísticos multivariantes se llevaron a cabo utilizando SIMCA 14 (Umetrics, Umea, Suecia) con variables centradas.

### **3.3.5. Técnicas de estadísticas para el análisis de datos metabólicos**

#### **3.3.5.1. Análisis de componentes principales**

Se realizó un análisis de componentes principales (PCA de sus siglas en inglés *Principal Component Analysis*) para evaluar la homogeneidad de los grupos, excluir los valores atípicos biológicos o técnicos (muestras muy alejadas del intervalo de confianza del 95%) e identificar las fuentes primarias de varianza dentro de los conjuntos de datos.

#### **3.3.5.2. Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales ortogonales**

El análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales ortogonales (OPLS-DA, de sus siglas en inglés *Orthogonal Partial Least Squares-Discriminant Analysis*) consiste en la aplicación secuencial de una regresión OPLS más un análisis discriminante a la matriz de datos. El análisis de los datos mediante esta técnica es distinto al análisis discriminante clásico previamente descrito y resulta más adecuado para los datos obtenidos por RMN. La utilidad es la misma: encontrar ejes que permitan detectar

diferencias entre grupos. El modelo OPLS-DA indicará cuáles son las variables más determinantes en la separación de los grupos.

Se obtuvieron modelos de clasificación de las muestras mediante OPLS-DA con una validación cruzada de 7 veces para seleccionar el número adecuado de componentes ortogonales. Los modelos se verificaron volviendo a muestrear 1000 veces los modelos bajo la hipótesis nula.

### **3.3.5.3. Herramientas para el análisis descriptivo**

Se realizaron pruebas t bivariantes en Matlab sobre grupos de variables obtenidas siguiendo el método de reacoplamiento estadístico de variables (SRV de sus siglas en inglés *statistical recoupling of variables*)<sup>187</sup>. La FDR se controló a un nivel del 5% mediante el procedimiento Benjamini-Hochberg.





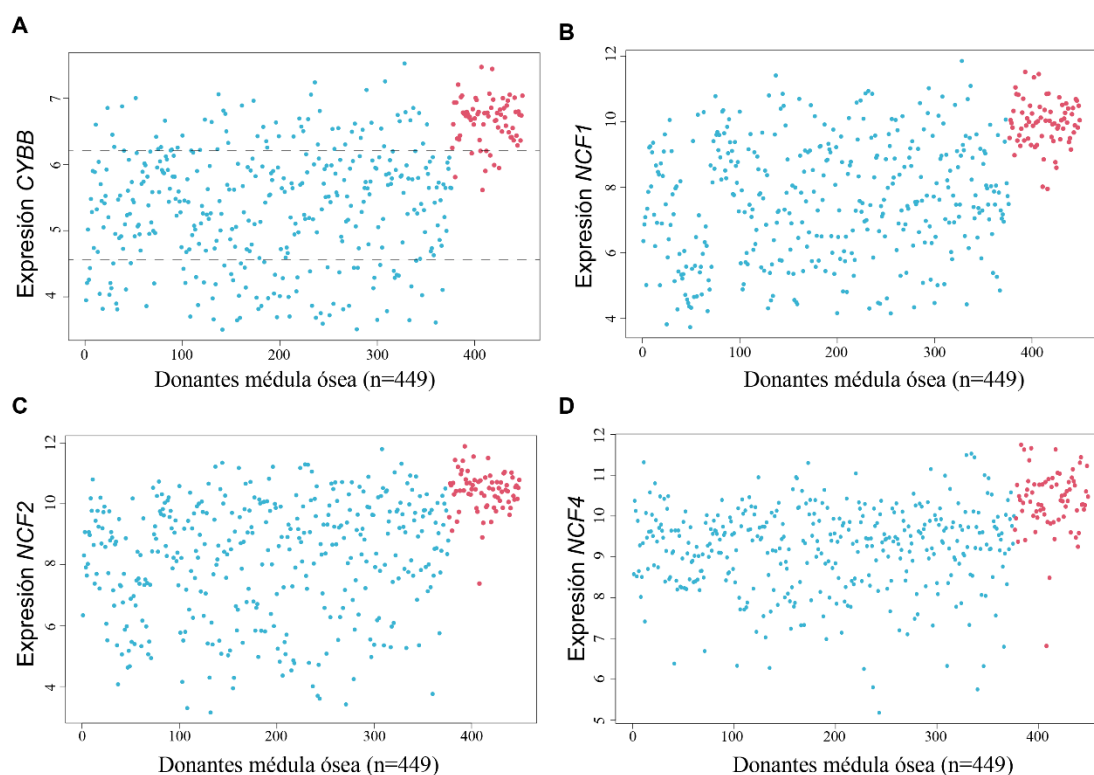
# **RESULTADOS**





### 4.3.1. *CYBB* está regulado a la baja en pacientes con leucemia mieloide aguda y se correlaciona con la clasificación FAB, así como con las mutaciones *IDH1*, *IDH2*, *RUNX1*, *FLT3TKD* y *N-Ras*

Para identificar los genes que presumiblemente podrían tener valor pronóstico por estar expresados diferencialmente en la LMA, elegimos una cohorte de datos pública (GSE15061) como conjunto de datos de entrenamiento que incluía información de la LMA y de muestras sanas (n=449). Entre los más de 600 genes diferencialmente expresados y estadísticamente significativos identificados, cuatro miembros del complejo NOX2 estaban regulados a la baja en la LMA (Figura 55): *NCF1* (codificación de p47<sup>phox</sup>), *NCF2* (p67<sup>phox</sup>), *NCF4* (p40<sup>phox</sup>), y *CYBB* (subunidad catalítica de NOX2 o gp91<sup>phox</sup>), con valores de FC de 5,14, 4,59, 2,26 y 2,45 respectivamente. También observamos una amplia variabilidad de la expresión de *CYBB* entre los pacientes de LMA (Figura 55A), lo que permitió ordenar las muestras de LMA en tres grupos según el nivel de expresión de *CYBB*: High-*CYBB* (n=64), Medium-*CYBB* (n=234) y Low-*CYBB* (n=78), tal y como se describe en materiales y métodos.



**Figura 55. Niveles de expresión de las subunidades del complejo NOX2 en células de médula ósea obtenidos de GSE15061.** Se muestran los niveles de expresión de las subunidades del complejo de NOX2 (*CYBB* (A), *NCF1* (B), *NCF2* (C) y *NCF4* (D)) que mostraban expresión diferencial al comparar individuos enfermos y sanos de la base de datos GSE15061. Los individuos con LMA se han representado con puntos azules y los donantes sanos con puntos rojos. También se ilustra la distribución de los grupos de niveles

## Resultados

de *CYBB* como resultado de los puntos de corte dibujados en gris: percentil 10 de expresión de *CYBB* en donantes sanos (línea superior) y percentil 25 de expresión de *CYBB* en LMA (línea inferior).

A continuación, nos preguntamos si alguna de las principales características clínicas de la patología podría estar relacionada con la expresión de *CYBB*. Las variables que se analizaron fueron: sexo, edad, grupo pronóstico, alteración del cariotipo, grupo FAB y las mutaciones más frecuentes (*CEBPA*, *NPM1*, *FLT3ITD*, *FLT3TKD*, *N-Ras*, *K-Ras*, *EVII*, *IDH1*, *IDH2* y *RUNX1*). Para comprobarlo, se utilizó una cohorte de datos de LMA (GSE14468), la cual tiene registradas las características clínicas de sus pacientes. No se encontró ninguna variación significativa en cuanto al sexo, la edad, el pronóstico, la alteración del cariotipo o las variables *CEBPA*, *NPM1*, *FLT3ITD*, *K-Ras* y *EVII* ( $p$  valor > 0,05) entre los grupos de expresión de *CYBB*. Sin embargo, la frecuencia de las mutaciones de *IDH1*, *IDH2* y *RUNX1* aumentó en las muestras de Low-*CYBB* (Figura 56A). Por el contrario, *N-Ras* fue más frecuente en pacientes con niveles de expresión de *CYBB* altos, así como *FLT3TKD* presentó la misma tendencia (Figura 56B). En cuanto a la clasificación FAB,<sup>236</sup> el 75% de los casos de High-*CYBB* pertenecían a FAB M4 y M5, mientras que casi el 60% de Medium-*CYBB* y el 80% de Low-*CYBB* se describían como FAB M1 y M2 (Figura 56C). Estos resultados sugirieron que los niveles de expresión de *CYBB* estaban asociados a la clasificación FAB y a las mutaciones *IDH1*, *IDH2*, *RUNX1*, *FLT3TKD* y *N-Ras*.

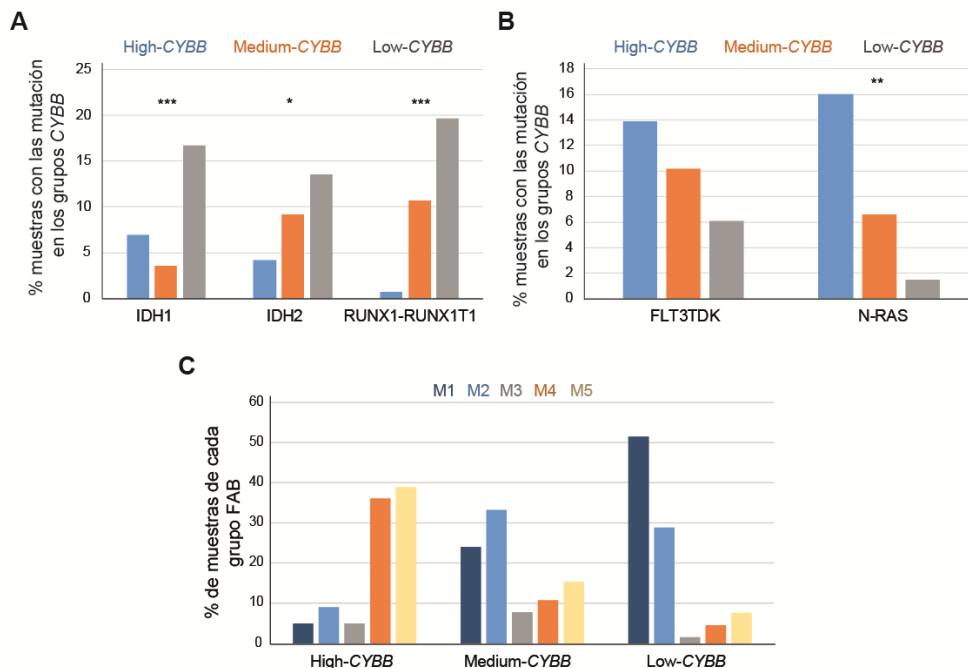


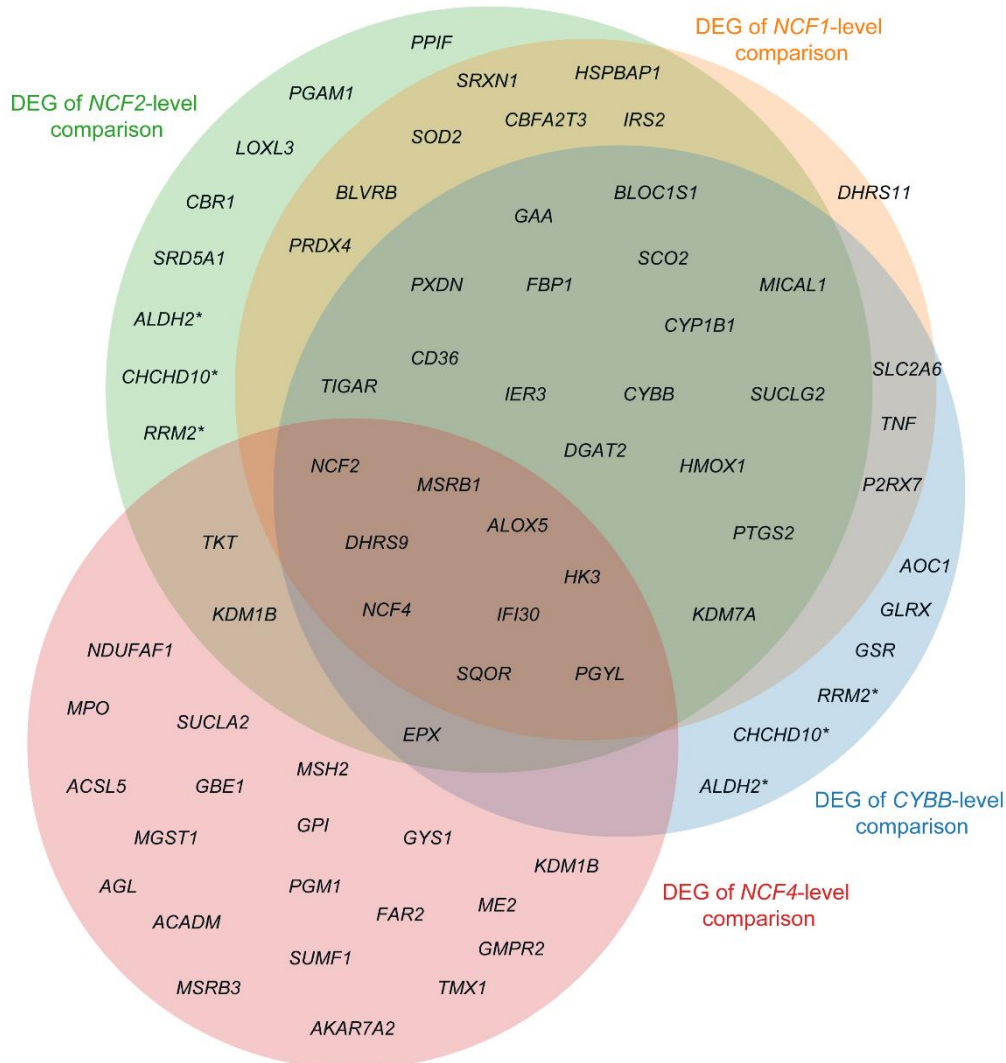
Figura 56. La clasificación FAB y las mutaciones de *IDH1*, *IDH2*, *RUNX1*, *FLT3TKD* y *N-Ras* se asocian con bajos niveles de expresión de *CYBB* en pacientes con LMA. (A) Gráfico de barras que

muestra el porcentaje de muestras GSE14468 positivas para las mutaciones *IDH1*, *IDH2* y *RUNX1* en cada uno de los grupos *CYBB*. (B) Gráfico de barras que representa el porcentaje de muestras de GSE14468 positivas para las mutaciones *N-Ras* y *FLT3TKD* en cada uno de los grupos de *CYBB*. (C) Diagrama de barras que muestra el porcentaje de muestras de GSE14468 clasificadas en cada clase de FAB dentro de los grupos de *CYBB*. (\*) representa un p valor<0,05; (\*\*) un p valor<0,01 y (\*\*\*) un p valor<0,001 en la prueba de Chi-Cuadrado.

#### **4.3.2. Hay 28 genes metabólicos que muestran una expresión vinculada con *CYBB* en pacientes con leucemia mieloide aguda**

Sumado a los indicios descritos previamente,<sup>98,203,237</sup> nuestros resultados previos demostraban un papel de NOX2 en la regulación del metabolismo energético. Por tanto, quisimos evaluar si había diferencias en la expresión de 941 genes metabólicos en función de los niveles de expresión de *CYBB*. Dicha lista de 941 genes se generó tomando los genes implicados en el metabolismo celular clasificados por cuatro términos GO: fosforilación oxidativa (GO:0006119), glucólisis (GO: 0006096), oxidorreducción (GO:0055114) y genes de organización mitocondrial (GO:0007005).

Se tomó el conjunto de datos procedentes de GSE15061 y siguiendo la misma estrategia mencionada en el apartado de metodología para la agrupación de muestras, se generaron grupos de alta y baja expresión de *CYBB*, *NCF1*, *NCF2* y *NCF4*, las cuatro subunidades del complejo NOX2 que están implicadas en LMA puesto que habían mostrado expresión diferencial con respecto a los niveles de expresión en individuos sanos. A continuación, se evaluaron los genes diferencialmente expresados al comparar dichos grupos. Los resultados obtenidos para los genes *CYBB*, *NCF1* y *NCF2* revelaron que la mayoría de los genes diferencialmente expresados en dichas comparaciones eran compartidos (Figura 57). De hecho, la comparación de los grupos de expresión de *CYBB* dio como resultado una lista de menor número de genes y, potencialmente, de mayor aplicabilidad clínica. En consecuencia, decidimos analizar dicho conjunto de genes con más detalle.



**Figura 57. Genes expresados diferencialmente al comparar los grupos de alta y baja expresión de los genes del complejo NOX2.** Se diseñó un diagrama de Venn con la herramienta online meta-chart (<https://www.meta-chart.com/venn>) para mostrar los DEG compartidos obtenidos al comparar las muestras de alta y baja expresión de *CYBB* (en azul), *NCF1* (en naranja), *NCF2* (en verde) y *NCF4* (en rojo) en el conjunto de datos de entrenamiento GSE15061. La región compartida entre las comparaciones de *CYBB* y *NCF2* no pudo representarse, por lo que los tres genes comunes están marcados con un asterisco. DEG: genes diferencialmente expresados.

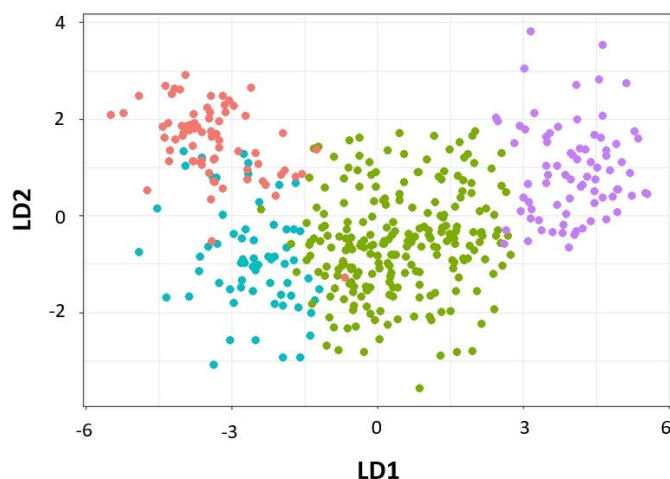
Los resultados de la comparativa entre los pacientes con altos y bajos niveles de expresión de *CYBB* mostraron 10 genes con expresión diferencial ( $p$  valor  $< 0,05$ ) al comparar High-*CYBB* y Medium-*CYBB*; así como, 35 genes se expresaron de forma distinta ( $p$  valor  $< 0,05$ ) en High-*CYBB* frente a Low-*CYBB*. De los 35 DEGs identificados, 6 genes también aparecían con expresión diferencialmente alterada al

comparar el grupo de High-*CYBB* con el grupo sano, por tanto, decidimos excluirlos del análisis ya que asumimos que la expresión de estos 6 genes está vinculada a *CYBB* pero no a la LMA. Finalmente se obtuvo una lista de 28 genes, que junto con *CYBB*, constituyen una firma de 29 genes diferencialmente expresados en función de los niveles de *CYBB*, y muchos de ellos compartidos con las comparaciones realizadas sobre *NCF1*, *NCF2* y *NCF4*. Dichos 29 genes (29G) están implicados en la respuesta inmunitaria y en procesos metabólicos como la actividad de NOX, el metabolismo de la glucosa, la OXPHOS, la biosíntesis de ácidos grasos o rutas clave de regulación del metabolismo como la vía de p53 (Tabla 22). En particular, *NCF2*, *HK3*, *IFI30* y *FBFP1* aparecieron incluso más desregulados que *CYBB* en los grupos de Low-*CYBB* frente a lo observado en High-*CYBB* (con FC de 19,6, 14,0, 9,2 y 6,8, respectivamente).

**Tabla 22. Principales funciones moleculares de 29G.** <sup>a</sup>SCO2 está involucrado en dos de las vías metabólicas principalmente afectadas.

Función molecular	Genes
Actividad NOX	<i>NCF2, CYBB, NCF4, MICAL1</i>
Metabolismo de la glucosa	<i>HK3, FBP1, PGYL, SLC2A6</i>
Respuesta inmune	<i>IFI30, ALOX5, IER3, BLOC1S1, AOC1, PTGS2</i>
Homeostasis redox	<i>GLRX, GSR, CYB1B1, MSRB1</i>
Vía señalización de p53	<i>SCO2<sup>a</sup>, TIGAR</i>
Fosforilación oxidativa	<i>SCO2<sup>a</sup>, SQOR, SUCLG2 (ciclo de losTCA), CHCHD10</i>
Biosíntesis de ácidos grasos	<i>CD36, DGAT2</i>
Otras	<i>DHRS9, HMOX1, KDM7A, PXDN</i>

Otra manera de confirmar la relación existente entre estos 28 genes metabólicos y *CYBB* fue la capacidad que la firma 29G mostró para separar los grupos *CYBB* al aplicar un LDA (Figura 58).



**Figura 58. 29G es capaz de discriminar los pacientes en base a los grupos CYBB.** Representación de puntos de las muestras de GSE15061 en las coordenadas de LD resultantes de un análisis discriminante lineal (LDA de sus siglas en inglés *linear discriminant analysis*) basado en los grupos CYBB: sanos (en rojo), Medium-CYBB (azul), Low-CYBB y High-CYBB.

Además, el análisis de correlación por pares de los 29G mostró una relación directa entre todos los genes excepto *PXDN*, el cual presentó una asociación inversa (Figura 59A). En total, hemos obtenido un conjunto de 28 genes cuya expresión está correlacionada con *CYBB*, lo que podría reflejar un sistema común de regulación.

#### **4.3.3. Los 29 genes correlacionados constituyen una firma con capacidad pronóstica para la leucemia mieloide aguda**

Múltiples firmas genéticas han mostrado potencial para el pronóstico de la LMA.<sup>28,29,238,239</sup> Por lo tanto, decidimos probar el valor pronóstico de 29G. Los análisis discriminantes mostraron que 29G separa eficazmente las muestras sanas y las de LMA según su grupo pronóstico (Figura 59B y C). El porcentaje de individuos correctamente clasificados fue del 85%, similar o incluso superior al sistema actual propuesto por ELN, que predice con éxito el 75-80% de los casos.<sup>240</sup> Tal y como representa la Figura 59D, el primer eje discriminante (LD1) fue capaz de separar las muestras de pronóstico favorable de las intermedias (p valor < 0,05), las intermedias de las de pronóstico adverso (p valor < 0,05) y las de pronóstico favorable de las de adverso (p valor < 0,05). El segundo eje (LD2) permitió separar las muestras intermedias de las de pronóstico adverso (p valor < 0,05) y las de pronóstico favorable de las de adverso (p valor < 0,05), pero no fue eficaz para distinguir entre las muestras favorables y las intermedias (p valor > 0,05). En

resumen, el perfil de expresión génica de la firma 29G es una poderosa herramienta para predecir el pronóstico de la LMA.

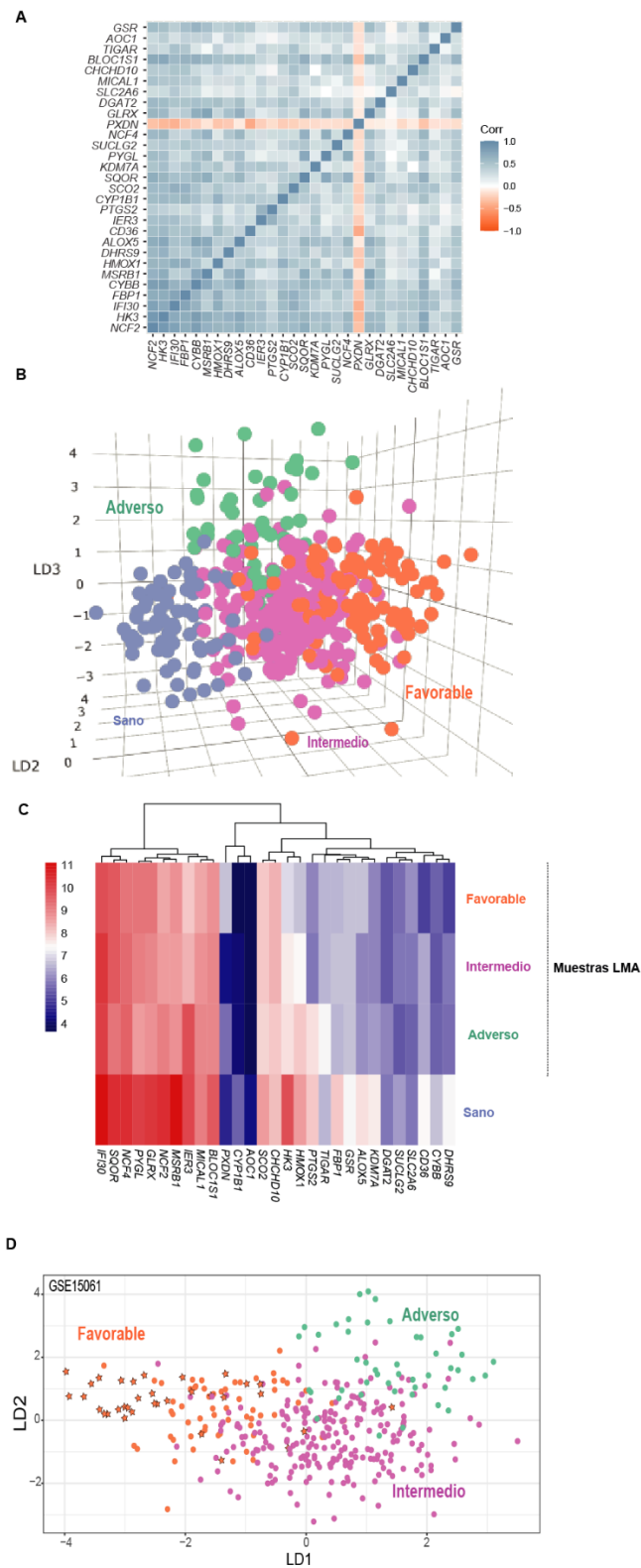


Figura 59. 29G es una firma genética correlacionada que separa a los pacientes de LMA en función del pronóstico. (A) Se muestran los coeficientes de correlación de Pearson por pares (de -1 a 1) de las

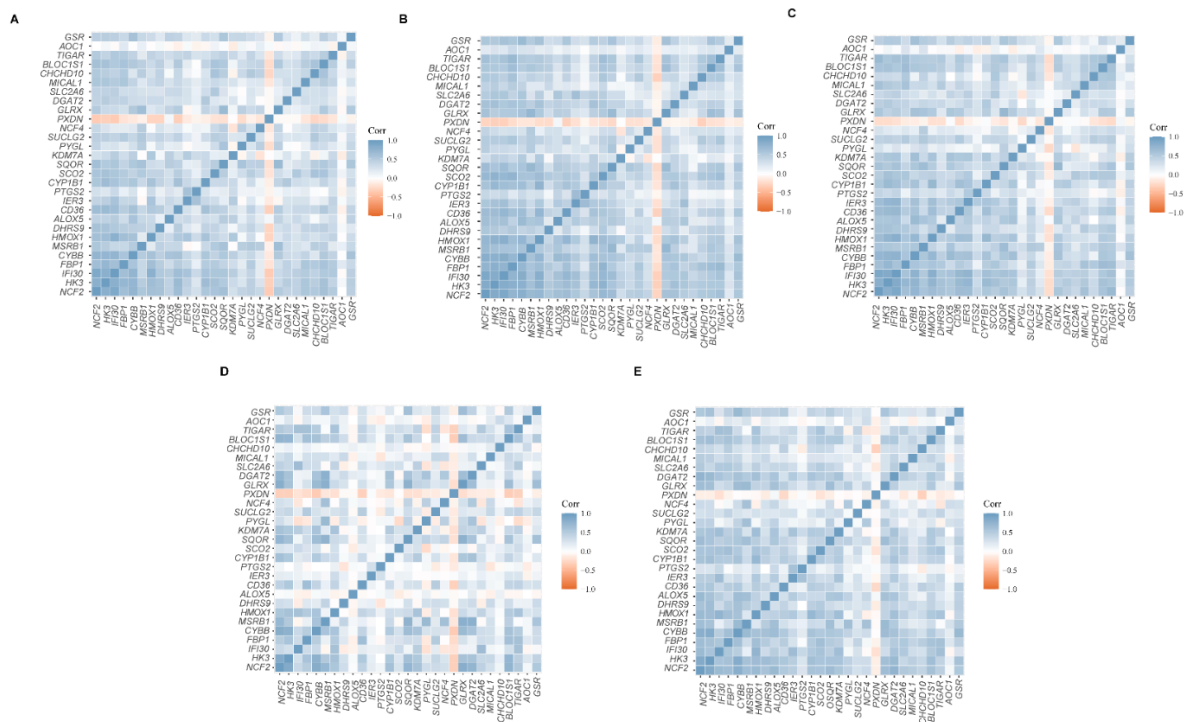
## Resultados

muestras GSE15061 de 29G. (B) Representación de puntos de las muestras de GSE15061 en las tres coordenadas de LDA. (C) Mapa de calor de la mediana de los valores de expresión de 29G de las muestras de GSE15061 agrupadas en función del pronóstico en grupo de sanos, favorable, intermedio o adverso. (D) La separación de los grupos de pronóstico de GSE15061 mediante LDA se muestra como un gráfico de dispersión en el que las muestras con leucemia promielocítica aguda se representan como estrellas naranjas. LD1, LD2 y LD3 corresponden a las funciones discriminantes obtenidas en el LDA.

En particular, los individuos con leucemia promielocítica aguda -un ejemplo de buen pronóstico- mostraron un patrón de aparición más separado, indicando un perfil de expresión diferencial de 29G (Figura 59D).

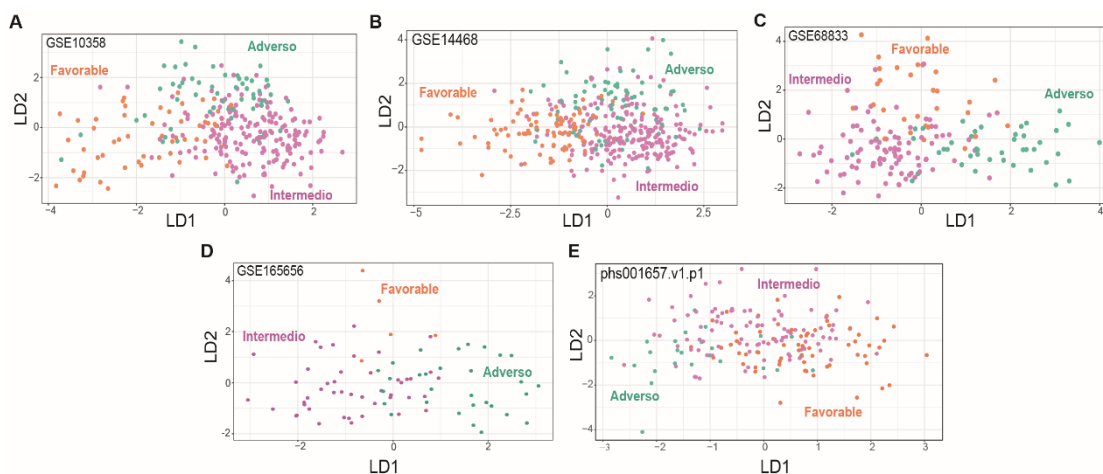
### 4.3.4. Validación de la eficacia de 29G para la determinación del pronóstico de pacientes de leucemia mieloide aguda

Para validar nuestros hallazgos, repetimos el procedimiento con cinco conjuntos de datos independientes adicionales que incluían 1372 muestras (GSE10358, GSE14468, GSE68833, phs001657.v1.p1 y GSE165656), que corroboraron la correlación de los genes de 29G entre ellos (Figura 60) y la eficacia de 29G para separar las muestras en grupos de pronóstico, con precisiones globales del 78%, 80%, 75%, 59,2% y 82,7% respectivamente (Figura 61).



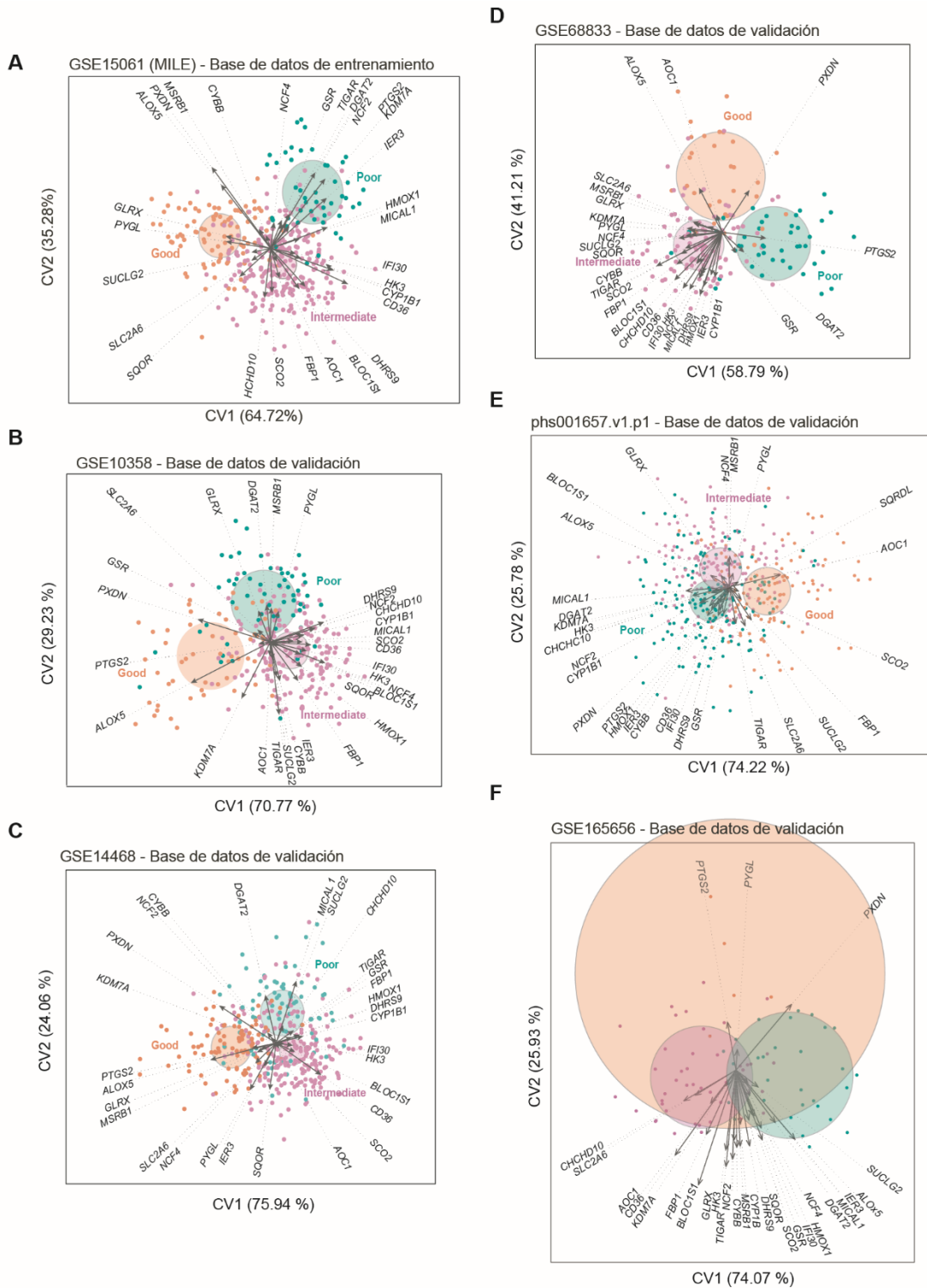
**Figura 60. Los miembros de 29G muestran patrones de expresión correlacionados en las bases de datos de validación. Se realizó una correlación de Pearson pareada para cada pareja de genes de los 29G de cada una de las bases de datos de validación: GSE10359 (A), GSE14468 (B), GSE68833 (C), GSE165656 (D) and phs001657.v1.p1 (E).**





**Figura 61. 29G también demuestra la capacidad de separar a los pacientes de LMA en distintos grupos de pronóstico en las bases de datos de validación.** Se muestran los gráficos de dispersión de la separación de grupos pronóstico en los ejes del análisis discriminante, LDA, para otros cinco conjuntos de datos de LMA: GSE10359 (A), GSE14468 (B), GSE68833 (C), GSE165656 (D) and phs001657.v1.p1 (E). LD1 y LD2 corresponden a las funciones discriminantes obtenidas en el LDA.

En conjunto, los resultados mostrados hasta ahora prueban el potencial como factor pronóstico de 29G en más de 1800 pacientes. Los resultados indican que 29G tiene capacidad de predicción pronóstica de la LMA. En vista de su potencial aplicación clínica, caracterizamos cuáles de los genes de 29G eran más determinantes en la predicción de cada uno de los grupos pronóstico. Para ello, llevamos a cabo un análisis Biplot canónico que determinó la existencia de 11 genes con un patrón común en las seis bases de datos en cuanto a su capacidad de determinación del pronóstico (Figura 62). *IFI30*, *CD36*, *HK3* y *CYP11B1* aparecen regulados a la baja en las muestras de buen pronóstico; en cambio, *PXDN* y *ALOX5* presentan niveles de expresión elevados en estos pacientes. En cuanto a las muestras de pronóstico intermedio, son característicos los bajos niveles de expresión de *PXDN* a la par que la regulación al alza de *CD36*, *BLOC1S1*, *FBP1* y *SCO2*. Por último, la disminución de *SQOR* y el aumento de *DGAT2* denotan un mal pronóstico de los pacientes.



**Figura 62. Algunos de los genes de 29G tienen mayor influencia sobre la determinación pronóstica de los pacientes de LMA.** Representación biplot canónica en los ejes 1-2 donde se muestra la distribución por pronóstico de las muestras (favorable: puntos naranjas; intermedio: puntos rosas; y adverso: puntos verdes) y las relaciones de expresión de 29G de GSE15061 (A), GSE10358 (B), GSE14468 (C), GSE68833 (D), phs001657.v1.p1 (E) y GSE165656 (F). La manera de interpretar estos gráficos se detalla en materiales y métodos. Los genes discriminantes (flechas) y los círculos de confianza de la distribución de cada subtipo de pronóstico se trazan en base a pruebas t de Student univariantes para realizar un análisis post hoc de cada gen.

Tal y como se ha dicho anteriormente, existen varios paneles de genes publicados con el objetivo de mejorar el pronóstico de la LMA. Por ello, creímos conveniente comparar el rendimiento de 29G con el de dos paneles diferentes que se habían publicado anteriormente.<sup>28,239</sup> Los porcentajes de correcta clasificación fueron muy similares entre los tres paneles de genes, lo que apoya firmemente la solidez del 29G (descrito para los conjuntos de datos de entrenamiento y validación en la Tabla 23). Observamos que la precisión del 29G para clasificar a los pacientes pertenecientes al grupo de mal pronóstico tendía a ser mayor que con los otros paneles de genes (76,1% de correcta clasificación con el 29G en comparación con el 60,9 y el 54,3 de Li *et al.* y Ng *et al.* respectivamente, en el conjunto de datos de entrenamiento).

**Tabla 23. Comparación de porcentajes de correcta clasificación entre 29G y las firmas genéticas referenciales propuestas por Li *et al.*<sup>28</sup> y Ng *et al.*<sup>27</sup>**

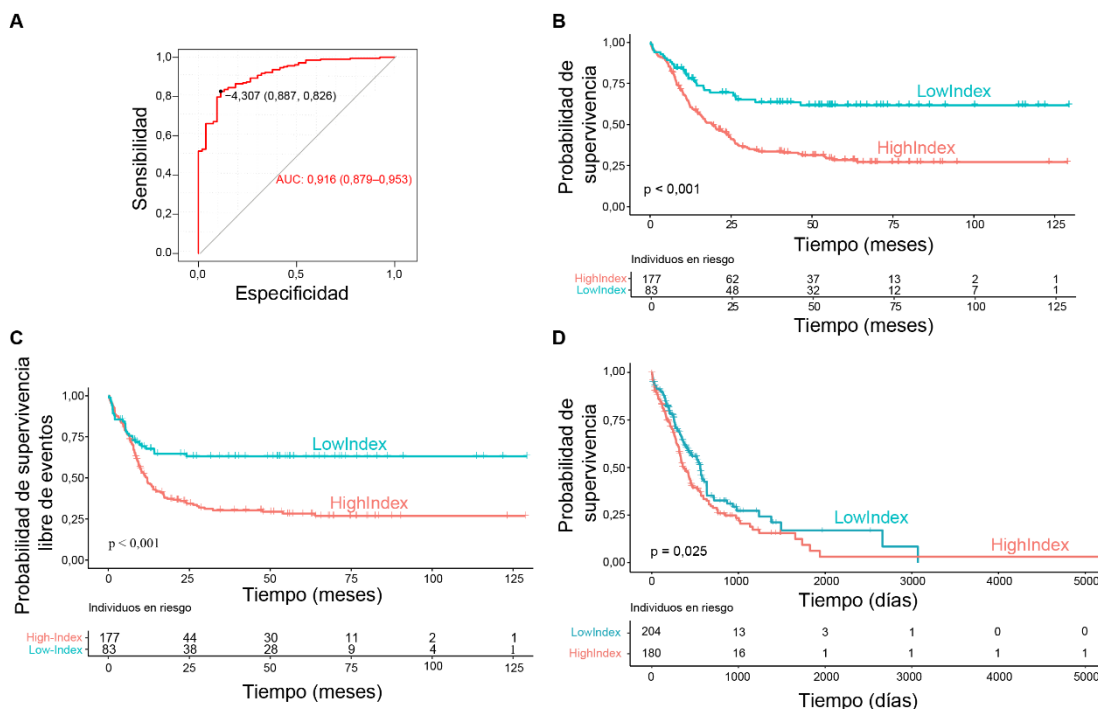
Base de datos	Clasificación ELN	Porcentaje de buena clasificación		
		29G	24G	17G
GSE15061	ELN 2010	85,0%	83,5%	82,4%
GSE10358	ELN 2010	78%	76,2%	78,3%
GSE14468	ELN 2010	75,1%	77,8%	78,1%
GSE68833	ELN 2010	80,1%	88,0%	84,9%
phs001657.v1.p1	ELN 2017	59,2%	62,0%	62,9%
GSE165656	ELN 2017	82,7%	84,0%	79,0%

#### **4.3.5. Un bajo índice de expresión de 29G está relacionado con una mayor supervivencia**

Hasta ahora hemos demostrado que hay un conjunto de 28 genes metabólicos, cuya expresión está correlacionada con la expresión de *CYBB*, que han resultado ser relevantes para la clasificación pronóstica de LMA. Sin embargo, la clasificación de la ELN está continuamente siendo revisada y refinada. La LMA es una enfermedad tan heterogénea que hace difícil la clasificación de sus pacientes. De hecho, en EE.UU. por ejemplo es más frecuente que se utilice la clasificación WHO que la ELN. Por todo lo anterior, quisimos evaluar si la expresión de 29G estaba vinculada a dos factores más determinantes como son la supervivencia global (OS de sus siglas en inglés *Overall*

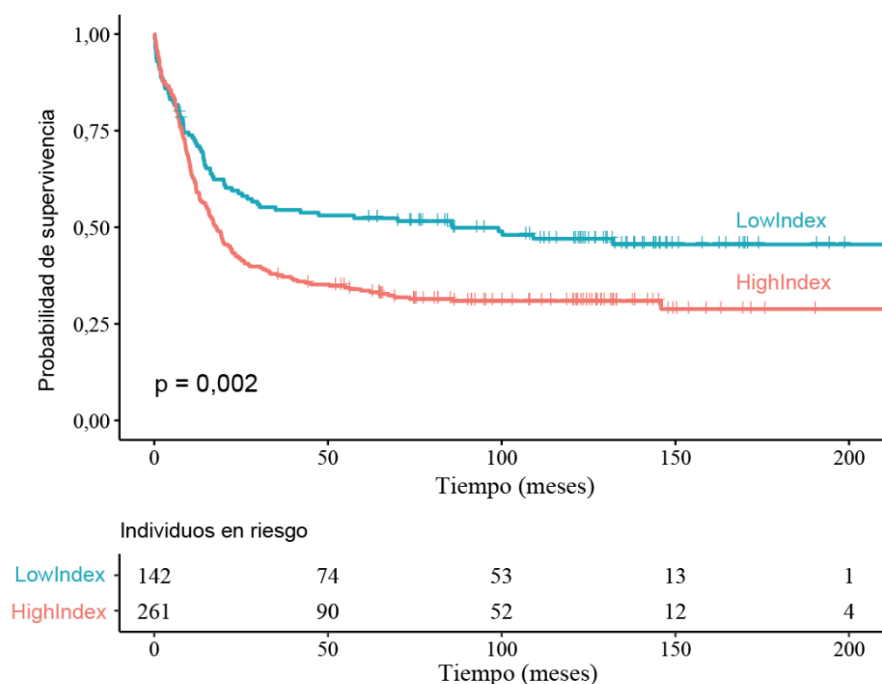
*Survival*) y a la supervivencia libre de eventos (EFS de sus siglas en inglés *Event Free Survival*) de los pacientes con LMA. Para ello, utilizamos 260 muestras del GSE10358, que disponen de datos sobre OS y EFS.

En primer lugar, elaboramos un índice de expresión (EI) descrito como una combinación lineal de la expresión de 29G para distinguir a los pacientes de LMA en términos de OS o EFS, es decir, una variable que aúna en un único valor representativo la expresión de los genes de 29G. Tal y como se describe en la sección de materiales y métodos, esta variable considera la expresión de cada uno de los 29G y la ajusta en función de la influencia de cada gen a la capacidad pronóstica. Una vez creado EI, se computó una curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) para establecer el punto de corte óptimo del EI, el cual nos permitió distinguir entre muestras de bajo y alto riesgo de supervivencia. El punto de corte se registró en un valor de EI de -4,307, que mostró una especificidad de 0,887, una sensibilidad de 0,826 y un área bajo la curva ROC (AUC) de 0,916 (IC del 95%: 0,879-0,953) (Figura 63A). La segregación de la muestra de EI realizada distribuyó 83 casos en el grupo de valor de EI bajo (LowIndex; mediana de OS: 34,4 (48,0) meses) y a los 177 casos restantes en el grupo de valor de EI alto (HighIndex; mediana de OS: 17,0 (33,0) meses). A continuación, comparamos la existencia de diferencias en la supervivencia de los dos grupos EI mediante la comparación de las curvas de supervivencia obtenidas por el método de Kaplan-Meier y el test Log-Rank. Como se observa en la Figura 63 las curvas mostraron diferencias significativas en la OS (Figura 63B) y la EFS (Figura 63C) entre los grupos de muestras de LMA de índice bajo y alto ( $p$  valor  $< 0,001$  en ambos casos), donde los pacientes del grupo LowIndex mostraron mejor supervivencia que los del grupo HighIndex.



**Figura 63. Los pacientes con un EI bajo presentan una mayor OS.** (A) Representación de la curva ROC para establecer un punto de corte de discriminación del pronóstico adecuado para EI en el conjunto de datos entrenamiento, GSE10358. (B) Curvas de supervivencia global (OS) de Kaplan-Meier de los grupos de EI (HighIndex y LowIndex) en 260 muestras del conjunto de datos GSE10358. (C) Representación de la curva de Kaplan-Meier de supervivencia libre de eventos (EFS) de los grupos EI (HighIndex y LowIndex) de 260 muestras del conjunto de datos GSE10358. (D) Curvas de supervivencia global (OS) de Kaplan-Meier de los grupos EI (HighIndex y LowIndex) en 429 muestras del conjunto de datos phs001657.v1.p1.

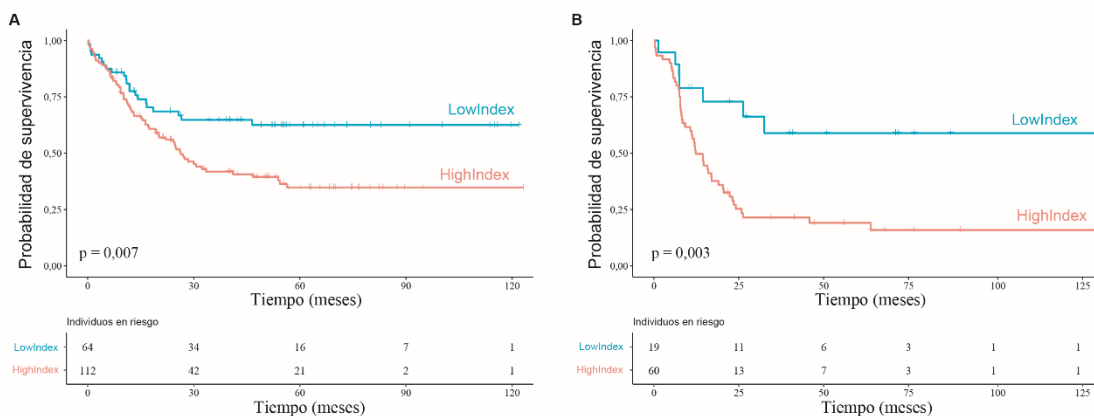
De la misma forma que habíamos hecho previamente para la capacidad pronóstica de 29G, quisimos validar las diferencias de supervivencia observadas en la base de datos de entrenamiento. Para esta validación, se utilizaron los datos de OS correspondientes a 384 muestras de phs001657.v1.p1. La segregación de muestras de EI distribuyó a 204 casos en el grupo de valor de índice bajo (LowIndex; mediana de OS: 329,5 (385,3) días) y a los 180 casos restantes en el grupo de valor de índice alto (HighIndex; mediana de OS: 319 (390) días). El grupo de pacientes con valor de EI bajo tiene una supervivencia significativamente mejor (Figura 63D), lo que demostró que dicho EI podría informar de forma fiable sobre la supervivencia, y reforzó la relevancia del 29G. Se encontraron los mismos resultados en otra de las bases de datos de validación, GSE14468 (Figura 64).



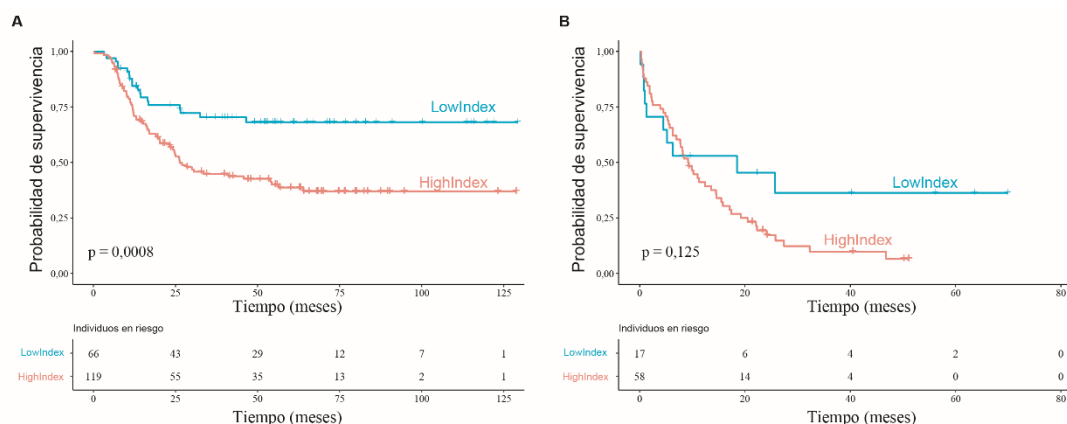
**Figura 64.** Los pacientes con un EI bajo presentan una mayor OS también en la base de datos de validación GSE14468. Curvas de supervivencia global (OS) de Kaplan-Meier de los grupos EI (HighIndex y LowIndex) en 403 muestras del conjunto de datos GSE14468.

Tal y como se ha descrito previamente, hay mayor población con altos niveles de *CYBB* en las muestras M4 y M5, lo cual nos llevó a preguntarnos si 29G sería igualmente de utilidad pronóstica en diferentes grupos de FAB. Por lo tanto, segregamos el GSE10358 en dos grupos en función de su clasificación FAB: M0 a M3 formaron un grupo (Figura 65A) mientras que M4 y M5 formaron otro (Figura 65B). Replicando lo observado en toda la población, las muestras de LowIndex demostraron una mayor supervivencia en ambos grupos. Además, las diferencias en la supervivencia entre el LowIndex y el HighIndex se magnificaron para los pacientes en los grupos M4 y M5 (Figura 65B).

Del mismo modo, probamos si el 29G era útil para la predicción de la OS dentro de los pacientes jóvenes (Figura 66A) y mayores (Figura 66B) estableciendo 60 años como punto de corte para constituir dos grupos. 29G pudo distinguir la OS en pacientes jóvenes y mayores del conjunto de datos GSE10358, lo que respalda el interés de seguir analizando esta cuestión en el futuro.



**Figura 65.** Los grupos de LowIndex y HighIndex muestran una mayor diferencia de supervivencia en los pacientes de FAB M4 y M5. Representación de la curva de supervivencia global (OS) de Kaplan-Meier de los grupos establecidos con el EI (HighIndex y LowIndex) segregando los pacientes del conjunto de datos GSE10358 en dos grupos FAB: grupo de M0-M3 (A) y de M4-M5 (B). El tiempo se expresa en meses.



**Figura 66.** 29G es igualmente pronóstico en pacientes menores y mayores de 60 años. Representación de la curva de supervivencia global (OS) de Kaplan-Meier de los grupos establecidos con el EI (HighIndex y LowIndex) segregando los pacientes del conjunto de datos GSE10358 en dos grupos de edad: menos de 60 años (A) y más de 60 años (B).

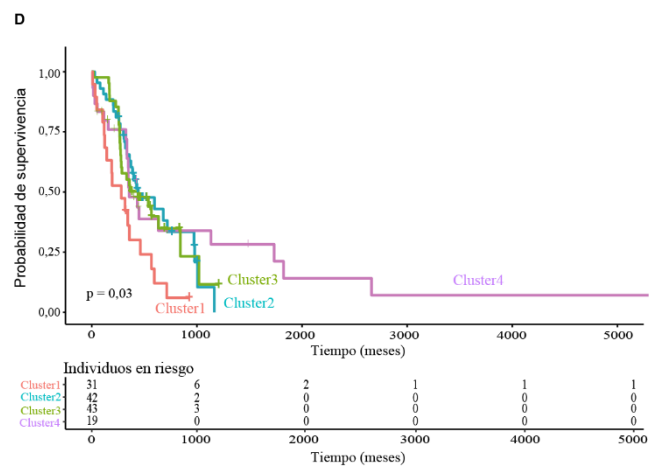
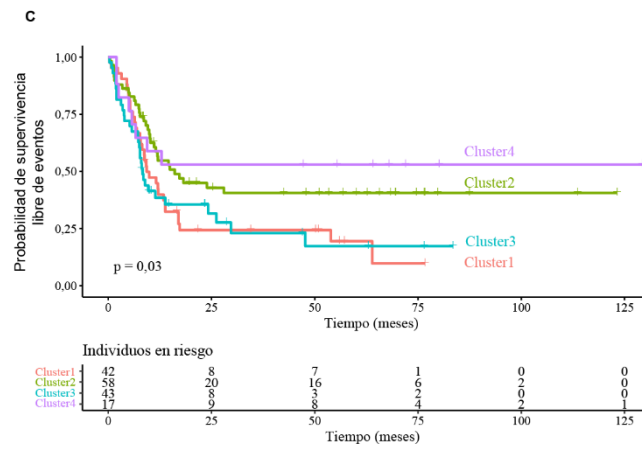
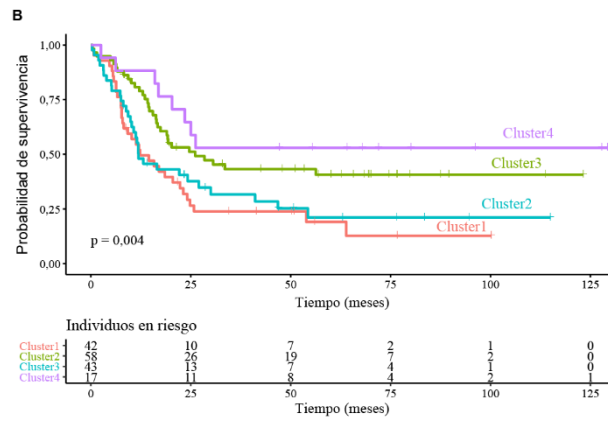
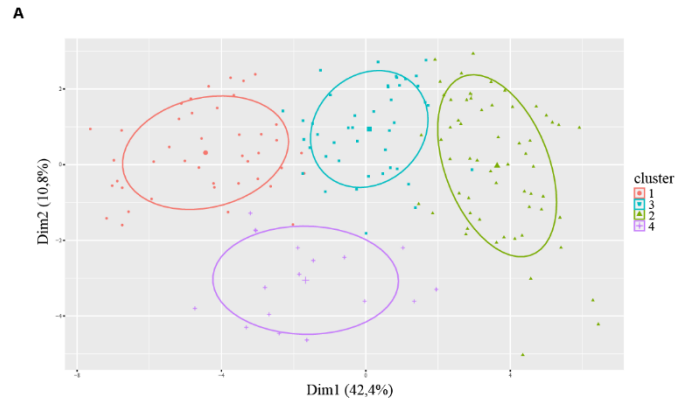
#### 4.3.6. 29G complementa a la clasificación pronóstica ELN

Los resultados descritos hasta el momento en este apartado presentan a 29G como una herramienta con capacidad predictiva pronóstica y de supervivencia de la LMA. Además, apuntan a *CYBB* y a un grupo de 28 genes con expresión correlacionada al complejo NOX2 como actores protagonistas de la biología de esta enfermedad. Ya se ha mencionado que la clasificación de los pacientes de LMA no es fácil debido a su gran heterogeneidad. De hecho, las clasificaciones actuales definen las alteraciones genéticas que determinan un buen o mal pronóstico de modo que todas las restantes entran a formar parte de un cajón de sastre, metáfora que representa el grupo de pronóstico intermedio. Los pacientes incluidos en el grupo intermedio presentan una respuesta muy variable a la

terapia y un alto grado de recaída, lo que hace que la estratificación del riesgo y el tratamiento de este grupo sea un enorme desafío.<sup>19</sup> De hecho, algunos autores proponen dividir el grupo intermedio en diferentes subgrupos.<sup>241</sup> Teniendo esto en cuenta, decidimos analizar si la 29G podía diferenciar la OS dentro del grupo intermedio. Se aplicó la técnica de agrupación Hierarchical Kmeans basada en la expresión de 29G sobre las muestras intermedias de la base de datos GSE10358 dando como resultado una separación en cuatro grupos diferenciados (Figura 67A). En particular, dichos grupos mostraron diferencias en las curvas de Kaplan-Meier de OS y EFS (Figura 67B y C, respectivamente). Estos resultados se corroboraron en el conjunto de datos de validación phs001657.v1.p1, en el que 29G también permitió clasificar cuatro grupos diferentes dentro del grupo intermedio que mostraron una OS significativamente diferente (Figura 67D). Estos resultados ponen de manifiesto que 29G estratifica a los pacientes del grupo intermedio en función de su supervivencia. Así, 29G podría aplicarse en clínica complementando la clasificación ELN actualmente aceptada dado que proporciona información más detallada sobre el grupo pronóstico intermedio, que en este sistema de clasificación es el menos definido.

Los resultados del modelo *in silico* demuestran que NOX2 es un componente clave para el pronóstico y la supervivencia de la LMA. Además, se ha encontrado una correlación entre la expresión genética de *CYBB* y 28 genes metabólicos lo cual sugiere una posible regulación conjunta de dichos genes, demostrando que NOX2 tiene un mecanismo de regulación común con determinadas rutas metabólicas. Por otro lado, estos datos destapan la existencia de varias dianas moleculares hasta ahora desconocidas que han demostrado ser vinculantes para la LMA. Estudiar las conexiones existentes entre los genes de 29G podría dar lugar a encontrar nuevas alternativas terapéuticas frente a la LMA.





**Figura 67. En base a la expresión de 29G las muestras intermedias se clasifican en cuatro grupos que muestran diferencias en la OS y la EFS.** La capacidad de 29G para discriminar diferentes grupos dentro del grupo de pronóstico intermedio se probó en las muestras de las bases de datos de GSE10358 (n=160) y phs001657.v1.p1 (n=135). (A) Representación PCA de los cuatro grupos generados por hkmeans resultantes en base a 29G para muestras intermedias del conjunto de datos GSE10358. (B) Curvas de supervivencia global (OS) de Kaplan-Meier de los clústeres mostrados en el panel A. El tiempo se expresa en meses. (C) Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia libre de eventos (EFS) de los grupos mostrados en el panel A. El tiempo se expresa en meses. (D) Curvas de supervivencia global (OS) de Kaplan-Meier de los grupos constituidos a partir de muestras intermedias de phs001657.v1.p1 siguiendo el mismo procedimiento que para GSE10358. El tiempo se expresa en días.

#### **4.3.7. Discusión 3: NOX2 y el metabolismo como herramientas pronósticas de la leucemia mieloide aguda**

Dada la complejidad de la LMA, el comité de expertos de la ELN ha hecho un esfuerzo muy grande para proporcionar un sistema de clasificación de los pacientes fiable y que actualmente esté ampliamente aceptado.<sup>15,16</sup> En el esquema de clasificación de la última versión publicada por la ELN, la LMA sigue clasificándose en base a las alteraciones citogenéticas y a algunas mutaciones recurrentes.<sup>11</sup> Sin embargo, un porcentaje considerable de pacientes presenta un cariotipo normal, y la relevancia pronóstica de alguna mutaciones recurrentes, como *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2*, sigue siendo desconocida.<sup>16</sup> Las técnicas de secuenciación de ADN de alto rendimiento tienen el potencial de descubrir paneles de genes con valor pronóstico para la LMA.<sup>27-29,242</sup> Además, este método podría aplicarse indiscriminadamente a todos los pacientes, incluidos los que tienen un cariotipo normal y no presentan mutaciones, por lo que podría ser un complemento interesante a las directrices de la ELN.

A la vista de la implicación que hemos descrito que tiene NOX2 en la regulación metabólica de la LMA y del potencial efecto terapéutico que tiene su inhibición, decidimos analizar el comportamiento de *CYBB*, la subunidad catalítica de NOX2, en células de médula ósea de pacientes diagnosticados con LMA en comparación con individuos sanos. Demostramos que las células blásticas de LMA presentan una expresión reducida de *CYBB* en comparación con sus homólogas sanas. Este hecho concuerda con una publicación reciente;<sup>243</sup> sin embargo, otra publicación reciente ha descrito no encontrar cambios en los niveles de expresión de *CYBB* al comparar pacientes de LMA con individuos sanos de varios conjuntos de datos de expresión tomados de GEO.<sup>244</sup> En 2013, este mismo grupo describía que blastos primarios de LMA y células CD34<sup>+</sup> mostraban mayores niveles de expresión de *CYBB*.<sup>126</sup> Estos datos se contraponen a nuestras observaciones pero tienen asociadas algunas limitaciones que consideramos que

pueden condicionar su interpretación. En primer lugar, en el artículo en el que Robinson *et al.*<sup>244</sup> toman los datos de expresión de varias bases de datos almacenadas en GEO, concretamente, los individuos sanos pertenecen a una base de datos y los pacientes de LMA a otras. Consideramos que combinar los datos de expresión de distintas bases de datos no es lo más recomendable ya que la toma de muestras, extracción, proceso de secuenciación y el propio análisis de los datos puede incluir diferencias que afecten en la comparación de los datos. De hecho, para poder analizar conjuntamente datos procedentes de varias bases de datos se ha de llevar a cabo un proceso de normalización que reduce la variabilidad interseries y hemos comprobado que puede esconder las diferencias observadas en la expresión de NOX2 entre individuos sanos y con LMA. En segundo lugar, en el artículo de Hole *et al.*<sup>126</sup> la expresión de NOX2 se deduce de la producción de superóxido cuantificado mediante la sonda Diógenes. El superóxido puede derivarse de otras fuentes de producción de ROS, no es exclusivo de las NOX, y como se ha comentado previamente la sensibilidad y especificidad en los ensayos de detección de las ROS es baja. De hecho, la sonda Diógenes no es la más recomendada para la detección de superóxido.<sup>245</sup> También es posible que los pacientes de LMA, aun teniendo menores niveles de expresión de NOX2, presenten un complejo NOX2 más activo que los individuos sanos.

También observamos que los pacientes de LMA muestran una expresión variable de *CYBB*, lo cual nos permitió establecer tres grupos que de menor a mayor expresión se denominan: Low-*CYBB*, Medium-*CYBB* y High-*CYBB*. El análisis de las diferencias de expresión de una lista de 941 genes metabólicos entre los grupos de expresión de *CYBB*, nos permitió descubrir una lista de 29 genes que no tienen nada en común con los paneles génicos previamente publicados para la clasificación de la LMA<sup>27,28,242</sup> y cuya expresión diferencia eficazmente los grupos de pronóstico de la LMA. El rendimiento de 29G y el de los paneles de genes descritos por Li *et al.*<sup>28</sup> y Ng *et al.*<sup>27</sup> fue muy similar en seis conjuntos de datos diferentes, lo que valida nuestros resultados.

Aún más importante que la capacidad de 29G para clasificar a los pacientes, es su valor predictivo respecto a la supervivencia de los pacientes. Mediante el estudio de los datos de expresión de 29G, computamos una función predictiva para calcular la OS de los pacientes con LMA, de modo que un EI bajo se correlaciona con una mejor supervivencia.

Además de la posibilidad de aplicar 29G a todos los pacientes independientemente de que presenten o no alteraciones genéticas, una gran baza de 29G es su potencial para agrupar a los pacientes pertenecientes al grupo intermedio en función de su OS. La estratificación del riesgo y las decisiones de tratamiento dentro del grupo intermedio suponen un enorme reto,<sup>19</sup> y 29G ofrece la posibilidad de mejorar la estratificación de estos pacientes. Todas estas características hacen de 29G una herramienta interesante que podría complementar eficazmente el actual sistema de clasificación ELN.

A diferencia de algunas firmas genéticas previas,<sup>28,242</sup> pero en línea con Ng *et al.*,<sup>27</sup> los genes pertenecientes a 29G reflejan un programa genético relacionado con la regulación de un proceso biológico importante para las células de la LMA. Los genes de 29G están implicados en la respuesta inmune y en procesos metabólicos como la actividad de las NOX, el metabolismo de la glucosa, la OXPHOS, la biosíntesis de ácidos grasos o rutas clave de regulación del metabolismo como la vía p53. Así, además del valor predictivo de nuestro panel, 29G confirma el valor de NOX2 y el metabolismo como dianas terapéuticas adecuadas frente a la LMA. De hecho, se ha demostrado anteriormente que el uso de un inhibidor de NOX2 reduce el riesgo de recaída en pacientes con LMA.<sup>246</sup> Por otro lado, parece que el éxito del arsénico en el tratamiento de la leucemia promielocítica aguda depende de la actividad de NOX.<sup>247,248</sup> Curiosamente, nuestros resultados muestran que los pacientes con leucemia promielocítica aguda muestran un perfil de expresión 29G diferencial. Creemos que el perfil metabólico puede variar entre los grupos de pronóstico de la LMA, presentando una posibilidad de diseñar tratamientos específicos basados en el eje NOX2-metabolismo.

Estos nuevos resultados refuerzan la relevancia de NOX2 en el control del metabolismo de la LMA, que ya hemos descrito en capítulos previos y que han señalado otros autores.<sup>154,201,203</sup> Nuestros datos sugieren que NOX2 podría inducir el metabolismo glucolítico en la LMA aumentando el transporte de glucosa (*SLC2A6*), la tasa glucolítica (*HK3*), la movilización de glucosa desde el glucógeno (*PGYL*) y la gluconeogénesis (*FBP1*). Nuestro análisis no mostró correlación entre *CYBB* y lactato deshidrogenasa, sin embargo, encontramos una fuerte correlación entre *CYBB* con varios genes implicados en el metabolismo mitocondrial (*SCO2*, *SQOR*, *SUCLG2*, *CHCHD10*), sugiriendo que *CYBB* promovería la oxidación completa de la glucosa en las células LMA.

También nos llamó la atención la correlación entre la expresión de *CYBB* y los genes de la vía p53 (*SCO2*, *TIGAR*). La activación de la vía p53 también podría contribuir

a incrementar OXPHOS en el grupo de pacientes con niveles altos de expresión de *CYBB*,<sup>249</sup> ilustrando una relación entre un metabolismo mitocondrial activo y altos niveles de NOX2. Podemos suponer que estos pacientes mostrarían un alto nivel de ROS intracelular, derivado de la actividad del complejo NOX2 y del metabolismo mitocondrial. El aumento en la expresión de enzimas implicadas en la homeostasis redox, especialmente con la reducción de glutatión (*GLRX*, *GSR*), y la diana de p53 *TIGAR*<sup>250</sup> podría permitir a las células leucémicas hacer frente a un alto nivel de estrés oxidativo.

Los genes metabólicos correlacionados con NOX2 conllevarán un fenotipo metabólico que sigue los patrones que hemos detectado en nuestros modelos moleculares. Tal y como habíamos observado *in vitro*, el análisis *in silico* de las muestras de pacientes ha mostrado que altos niveles de NOX2 promueven el metabolismo de la glucosa hasta su oxidación completa a través del metabolismo mitocondrial, ciclo de los TCA y OXPHOS. A la contra, una disminución de los niveles de NOX2 conllevaría una reducción de los niveles de los genes glucolíticos *SLC2A6*, *HK3*, *PGYL*, *FBP1* y de los mitocondriales *SCO2*, *SQOR*, *SUCLG2*, *CHCHD10*, por lo que esperaríamos observar una deceleración del metabolismo glucolítico y mitocondrial como hemos descrito en las células THP-1<sup>NOX2/KO</sup>. Por otro lado, la expresión de NOX2 también ha resultado tener una correlación directa con la expresión de *GLRX* y *GSR* en nuestro estudio *in silico*. Las células THP-1<sup>NOX2/KO</sup> no presentaban alteraciones en la actividad de estas dos enzimas, pero sí demostraban tener menores niveles de GSH, que podría ser debido a un defecto en el sistema de síntesis del GSH.

Las implicaciones de la coexistencia de dos o más alteraciones moleculares y sus efectos sobre la clasificación y el tratamiento de la enfermedad son fundamentales para desarrollar terapias combinadas más eficaces. En este sentido, consideramos interesante analizar si los niveles de *CYBB* se correlacionaban con alguna de las alteraciones genéticas recurrentes observadas en la LMA. Las mutaciones de activación constitutiva en el receptor FLT3 (*FLT3-ITD* y *FLT3-TKD*)<sup>251</sup> y *Ras*<sup>252</sup> ocurren con frecuencia en la LMA. Tanto las mutaciones en *FLT3* como las mutaciones en *Ras* aumentan la producción de ROS de las NOX en la LMA.<sup>252</sup> Curiosamente, nuestros resultados muestran una correlación entre los niveles elevados de *CYBB* y las mutaciones en *FLT3-TKD* y *Ras*, que conducirían a una elevada producción de ROS a través del complejo NOX2 lo que podría conferir una ventaja de mayor proliferación con respecto a otros clones de LMA.

Las mutaciones en *IDH1/2* y los reordenamientos cromosómicos *RUNX1-RUNX1T1* también aparecen con una alta frecuencia en la LMA.<sup>16</sup> Nuestros resultados muestran una correlación inversa entre estas alteraciones genéticas y los niveles de *CYBB*. Por otro lado, parece que una baja expresión de *CYBB* está ligada a un fenotipo menos diferenciado, como hemos descrito que ocurría en las líneas celulares de LMA. Así pues, el complejo NOX2 está altamente expresado en muestras de LMA M4/M5 pero no en M1/M2.<sup>188,211</sup> La translocación *RUNX1-RUNX1T1* se encuentra en el 40% de los pacientes del grupo FAB M2.<sup>253</sup> Parece que un fenotipo menos diferenciado se correlaciona tanto con una baja expresión de *CYBB* como con la aparición de *RUNX1-RUNX1T1*.

En resumen, hemos encontrado un panel de genes metabólicos correlacionados con *CYBB* (29G), válido como herramienta para la estratificación de la LMA y la predicción de la supervivencia, que de nuevo pone a NOX2 y al metabolismo en el foco de atención de la LMA. Integrar todas las anomalías genéticas en un esquema pronóstico es cada vez más difícil debido a la gran variedad de dichas alteraciones y sus numerosas combinaciones posibles. El uso de paneles de genes en el pronóstico podría implementarse fácilmente en la práctica clínica y permite la posibilidad de mejorar la estratificación del riesgo de LMA. La robustez de la firma 29G que describimos está respaldada por los análisis de seis cohortes diferentes de LMA con un total de 1821 muestras, lo que sugiere un gran potencial para futuras aplicaciones clínicas.

#### **4.4. Discusión final: La regulación metabólica ejercida por NOX2 en la LMA como herramienta pronóstica y terapéutica**

En esta tesis hemos estudiado el papel de NOX2 en la leucemia mieloide aguda. Hemos descubierto que NOX2 tiene un papel importante regulando el metabolismo de la glucosa de células leucémicas, de modo que el descenso de los niveles de NOX2 provoca un metabolismo mitocondrial deficiente (ciclo de los TCA y OXPHOS disminuidos), que puede ser compensado por un incremento glucolítico en células metabólicamente flexibles. Además, hemos descrito que NOX2 también tiene un rol importante en la regulación del sistema glutatión, donde bajos niveles de NOX2 se ven acompañados de un descenso en los niveles de glutatión y una capacidad antioxidante comprometida. Así pues, NOX2 resulta fundamental para mantener un metabolismo mitocondrial activo y permitir la reposición de los depósitos de glutatión en células de LMA. Conocer estas interacciones moleculares, nos ha permitido proponer un tratamiento de inhibición de las NOX en combinación con iMet como estrategia terapéutica frente a la LMA. Esta

combinación ha resultado eficaz en líneas celulares y células procedentes de paciente con distinto fondo genético-molecular. De entre las alternativas testadas, la inhibición de NOX junto con el tratamiento con Ox ha resultado la opción más atractiva por su alta efectividad y su moderada toxicidad en células sanas de médula ósea, demostrando una mayor efectividad cuanto mayor es la expresión de NOX2. Por ello, iNOX+Ox se muestra una alternativa interesante para pacientes de grupos FAB con fenotipo diferenciado, M4 o M5, y quimiorresistentes que han demostrado tener alta expresión de NOX2. La adición de Ara-C a la combinación iNOX+Ox aumenta la potencia de la combinación induciendo más fuertemente la muerte celular. Además, según nuestros datos la efectividad de la combinación parece deberse a la modulación que ejerce sobre el metabolismo energético y a una potente supresión de la capacidad antioxidante de la célula. Por último, en esta tesis hemos presentado un panel de 29 genes correlacionados (29G) con implicación en el metabolismo, entre los que se encuentra NOX2, con capacidad de clasificar a nivel pronóstico a los pacientes de LMA. Un paso más allá, la expresión de estos 29 genes nos ha permitido computar un índice que podría predecir la supervivencia de los pacientes en base a 29G. 29G también ha permitido la discriminación de 4 grupos con distinta supervivencia dentro del grupo de pacientes con pronóstico intermedio, un grupo muy heterogéneo que en la clasificación actual concentra a todos aquellos casos con alteraciones que no han sido catalogadas como favorables o adversas. Todos estos resultados coinciden en NOX2 y su influencia sobre el metabolismo como piezas angulares de la LMA.









# **CONCLUSIONES**



## 5. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

Los resultados presentados y discutidos a lo largo de este manuscrito permiten extraer las siguientes conclusiones:

- 1.
- 2.
- 3.
- 4.
- 5.
- 6.
7. Los principales genes del complejo NOX2, *CYBB*, *NCF1*, *NCF2* y *NCF4*, se encuentran infraexpresados en LMA.
8. La expresión de *CYBB* se correlaciona con la clasificación *French-American-British*, la translocación t(8;21) y las mutaciones frecuentes *IDH1*, *IDH2*, *FLT3TKD* y *N-Ras*.
9. 28 genes metabólicos, cuya expresión se encuentra correlacionada con *CYBB*, constituyen, junto con *CYBB*, una firma genética con capacidad pronóstica en LMA (29G). 29G puede complementar la actual clasificación de LMA ya que ha

demostrado separar 4 clústeres de supervivencia en los pacientes de pronóstico intermedio.

10. El índice de expresión (EI), basado en la expresión de 29G, informa sobre la supervivencia en LMA de forma fiable. Bajos valores de EI se relacionan con alta supervivencia.

The results presented and discussed throughout this manuscript allow to reach the following conclusions:

- 1.
- 2.
- 3.
- 4.
- 5.
- 6.
7. The main genes of the NOX2 complex, *CYBB*, *NCF1*, *NCF2* and *NCF4*, are downregulated in AML.
8. *CYBB* expression correlates with French-American-British classification, t(8;21) translocation and frequent mutations *IDH1*, *IDH2*, *FLT3TKD* and *N-Ras*.
9. 28 metabolic genes, whose expression is correlated with *CYBB*, constitute, together with *CYBB*, a genetic signature with prognostic capacity in AML (29G). 29G can complement the current AML classification so as it discriminates 4 survival clusters in intermediate prognosis patients.
10. The expression index (EI), based on 29G expression, reliably informs about survival in AML. Low EI values are associated with high survival.









# **BIBLIOGRAFÍA**



## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Red Española de Registros de Cáncer, Galceran J, Amejide A, et al. Estimaciones de la incidencia y la supervivencia del cáncer en España y su situación en Europa. Madrid: 2014.
2. Stubbins RJ, Francis A, Kuchenbauer F, Sanford D. Management of Acute Myeloid Leukemia: A Review for General Practitioners in Oncology. *Curr. Oncol.* 2022;29(9):6245–6259.
3. Welch JS, Ley TJ, Link DC, et al. The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell.* 2012;150(2):264–78.
4. Arana-Luna LL, Alvarado-Ibarra M, Silva-Michel LG, et al. Consenso de leucemia mieloide aguda en México Correspondencia. *Gac. Med. Mex.* 2022;158(3):1–51.
5. Surveillance Epidemiology and End Results (SEER) Program. Leukemia — Cancer Stat Facts.
6. Jagannathan-Bogdan M, Zon LI. Hematopoiesis. *Development.* 2013;140(12):2463.
7. Chopra M, Bohlander SK. The cell of origin and the leukemia stem cell in acute myeloid leukemia. *Genes, Chromosom. Cancer.* 2019;58(12):850–858.
8. Tuval A, Shlush LI. Evolutionary trajectory of leukemic clones and its clinical implications. *Haematologica.* 2019;104(5):872.
9. Cancer Genome Atlas Research Network. Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult De Novo Acute Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2013;368(22):2059–2074.
10. Elsevier Connect. Hematopoyesis: claves de la generación de todas las células sanguíneas. 2019;1.
11. Döhner H, Wei AH, Appelbaum FR, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood.* 2022;140(12):1345–1377.
12. Cheson BD, Bennett JM, Kopecky KJ, et al. Revised Recommendations of the International Working Group for diagnosis, standardization of response criteria,

- treatment outcomes, and reporting standards for therapeutic trials in acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2003;21(24):4642–9.
13. Cheson BD, Cassileth PA, Head DR, et al. Report of the national cancer institute-sponsored workshop on definitions of diagnosis and response in acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* 1990;8(5):813–9.
  14. Borowitz et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 2008.
  15. Döhner H, Estey EH, Amadori S, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: Recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood.* 2010;115(3):453–474.
  16. Döhner H, Estey E, Grimwade D, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood.* 2017;129(4):424–447.
  17. Herold T, Rothenberg-Thurley M, Grunwald V V., et al. Validation and refinement of the revised 2017 European LeukemiaNet genetic risk stratification of acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2020;34(12):3161–3172.
  18. Di Nardo CD, Cortes JE. Mutations in AML: prognostic and therapeutic implications. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Progr.* 2016;2016(1):348.
  19. Moarii M, Papaemmanuil E. Classification and risk assessment in AML: integrating cytogenetics and molecular profiling. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Progr.* 2017;2017(1):37.
  20. Genovese G, Kähler AK, Handsaker RE, et al. Clonal Hematopoiesis and Blood-Cancer Risk Inferred from Blood DNA Sequence. *N Engl J Med.* 2014;371(26):2477–87.
  21. Döhner K, Schlenk RF, Habdank M, et al. Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood.* 2005;106(12):3740–3746.
  22. Steensma DP, Wermke M, Klimek VM, et al. Results of a Clinical Trial of H3B-8800, a Splicing Modulator, in Patients with Myelodysplastic Syndromes (MDS),

- Acute Myeloid Leukemia (AML) or Chronic Myelomonocytic Leukemia (CMML). *Blood*. 2019;134(Supplement\_1):673–673.
23. Cuartero S, Innes AJ, Merckenschlager M. Towards a Better Understanding of Cohesin Mutations in AML. *Front. Oncol.* 2019;9:867.
  24. Trottier AM, Godley LA. Inherited predisposition to haematopoietic malignancies: overcoming barriers and exploring opportunities. *Br. J. Haematol.* 2021;194(4):663–676.
  25. Khoury JD, Solary E, Abla O, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leuk. 2022 367*. 2022;36(7):1703–1719.
  26. Bullinger L, Döhner K, Bair E, et al. Use of Gene-Expression Profiling to Identify Prognostic Subclasses in Adult Acute Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2004;350(16):1605–1616.
  27. Ng SWK, Mitchell A, Kennedy JA, et al. A 17-gene stemness score for rapid determination of risk in acute leukaemia. *Nature*. 2016;540(7633):433–437.
  28. Li Z, Herold T, He C, et al. Identification of a 24-gene prognostic signature that improves the european LeukemiaNet risk classification of acute myeloid leukemia: An international collaborative study. *J. Clin. Oncol.* 2013;31(9):1172–1181.
  29. Marcucci G, Yan P, Maharry K, et al. Epigenetics meets genetics in acute myeloid leukemia: Clinical impact of a novel seven-gene score. *J. Clin. Oncol.* 2014;32(6):548–556.
  30. Hills RK, Castaigne S, Appelbaum FR, et al. Addition of gemtuzumab ozogamicin to induction chemotherapy in adult patients with acute myeloid leukaemia: A meta-analysis of individual patient data from randomised controlled trials. *Lancet Oncol.* 2014;15(9):986–996.
  31. Stone RM, Mandrekar SJ, Sanford BL, et al. Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. *N. Engl. J. Med.* 2017;377(5):454–464.
  32. Medeiros BC, Satram-Hoang S, Hurst D, et al. Big data analysis of treatment patterns and outcomes among elderly acute myeloid leukemia patients in the

- United States. *Ann. Hematol.* 2015;94(7):1127–1138.
33. Wei AH, Montesinos P, Ivanov V, et al. Venetoclax plus LDAC for newly diagnosed AML ineligible for intensive chemotherapy: a phase 3 randomized placebo-controlled trial. *Blood.* 2020;135(24):2137–2145.
  34. Pollyea DA, Stevens BM, Jones CL, et al. Venetoclax with azacitidine disrupts energy metabolism and targets leukemia stem cells in patients with acute myeloid leukemia. *Nat. Med.* 2018;24(12):1859–1866.
  35. Mohrin M. Mito–managing ROS & redox to reboot the immune system: Tapping mitochondria & redox management to extend the reach of hematopoietic stem cell transplantation. *Free Radic. Biol. Med.* 2021;165:38–53.
  36. Master S, Koshy N, Mansour R, Shi R. Effect of stem cell transplant on survival in adult patients with acute lymphoblastic leukemia: NCDB analysis. *Anticancer Res.* 2019;39(4):1899–1906.
  37. Stahl M, Menghrajani K, Derkach A, et al. Clinical and molecular predictors of response and survival following venetoclax therapy in relapsed/refractory AML. *Blood Adv.* 2021;5(5):1552–1564.
  38. Judge A, Dodd MS. *Metabolism.* 2020;0(July):607–647.
  39. Israelsen WJ, Vander Heiden MG. Pyruvate kinase: function, regulation and role in cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2015;43:43.
  40. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science.* 1956;123(3191):309–314.
  41. Liberti M V., Locasale JW. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem. Sci.* 2016;41(3):211–218.
  42. Kreuzaler P, Panina Y, Segal J, Yuneva M. Adapt and conquer: Metabolic flexibility in cancer growth, invasion and evasion. *Mol. Metab.* 2020;33:83.
  43. Schiliro C, Firestein BL. Mechanisms of Metabolic Reprogramming in Cancer Cells Supporting Enhanced Growth and Proliferation. *Cells.* 2021;10(5):1056.
  44. Koundouros N, Poulogiannis G. Reprogramming of fatty acid metabolism in cancer. *Br. J. Cancer* 2019 1221. 2019;122(1):4–22.
  45. Abila H, Sollazzo M, Gasparre G, Iommarini L, Porcelli AM. The multifaceted



- contribution of  $\alpha$ -ketoglutarate to tumor progression: An opportunity to exploit? *Semin. Cell Dev. Biol.* 2020;98:26–33.
46. Lieu EL, Nguyen T, Rhyne S, Kim J. Amino acids in cancer. *Exp. Mol. Med.* 2020 521. 2020;52(1):15–30.
47. Hui S, Ghergurovich JM, Morscher RJ, et al. Glucose feeds the TCA cycle via circulating lactate. *Nat.* 2017 5517678. 2017;551(7678):115–118.
48. Montal ED, Bhalla K, Dewi RE, et al. Inhibition of phosphoenolpyruvate carboxykinase blocks lactate utilization and impairs tumor growth in colorectal cancer. *Cancer Metab.* 2019 71. 2019;7(1):1–14.
49. Schug ZT, Vande Voorde J, Gottlieb E. The metabolic fate of acetate in cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 2016;16(11):708–717.
50. Sica V, Bravo-San Pedro JM, Stoll G, Kroemer G. Oxidative phosphorylation as a potential therapeutic target for cancer therapy. *Int. J. cancer.* 2020;146(1):10–17.
51. de Almeida MJ, Luchsinger LL, Corrigan DJ, Williams LJ, Snoeck HW. Dye-Independent Methods Reveal Elevated Mitochondrial Mass in Hematopoietic Stem Cells. *Cell Stem Cell.* 2017;21(6):725-729.e4.
52. Filippi MD, Ghaffari S. Mitochondria in the maintenance of hematopoietic stem cells: new perspectives and opportunities. *Blood.* 2019;133(18):1943–1952.
53. Liang R, Arif T, Kalmykova S, et al. Restraining Lysosomal Activity Preserves Hematopoietic Stem Cell Quiescence and Potency. *Cell Stem Cell.* 2020;26:359–376.
54. Ansó E, Weinberg SE, Diebold LP, et al. The mitochondrial respiratory chain is essential for haematopoietic stem cell function. *Nat. Cell Biol.* 2017;19(6):614–625.
55. Nakada D, Saunders TL, Morrison SJ. Lkb1 regulates cell cycle and energy metabolism in haematopoietic stem cells. *Nat.* 2010 4687324. 2010;468(7324):653–658.
56. Baumgartner C, Toifl S, Farlik M, et al. An ERK-Dependent Feedback Mechanism Prevents Hematopoietic Stem Cell Exhaustion. *Cell Stem Cell.* 2018;22(6):879-

- 892.e6.
57. Yu WM, Liu X, Shen J, et al. Metabolic regulation by the mitochondrial phosphatase PTPMT1 is required for hematopoietic stem cell differentiation. *Cell Stem Cell*. 2013;12(1):62–74.
  58. Huang D, Chen C, Xie L, Yu Z, Zheng J. Hematopoietic stem cell metabolism and stemness. *Blood Sci*. 2019;1(1):12.
  59. Nakamura-Ishizu A, Ito K, Suda T. Hematopoietic Stem Cell Metabolism during Development and Aging. *Dev. Cell*. 2020;54(2):239–255.
  60. Wierenga ATJ, Cunningham A, Erdem A, et al. HIF1/2-exerted control over glycolytic gene expression is not functionally relevant for glycolysis in human leukemic stem/progenitor cells. *Cancer Metab*. 2019;27(7):11.
  61. Vukovic M, Sepulveda C, Subramani C, et al. Adult hematopoietic stem cells lacking Hif-1 $\alpha$  self-renew normally. *Blood*. 2016;127(23):2841–2846.
  62. Guitart A V., Subramani C, Armesilla-Diaz A, et al. Hif-2 $\alpha$  is not essential for cell-autonomous hematopoietic stem cell maintenance. *Blood*. 2013;122(10):1741–1745.
  63. Papa L, Djedaini M, Hoffman R. Mitochondrial role in stemness and differentiation of hematopoietic stem cells. *Stem Cells Int*. 2019;4067162.
  64. Yusuf RZ, Saez B, Sharda A, et al. Aldehyde dehydrogenase 3a2 protects AML cells from oxidative death and the synthetic lethality of ferroptosis inducers. *Blood*. 2020;136(11):1303–1316.
  65. Forte D, García-Fernández M, Sánchez-Aguilera A, et al. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Support Acute Myeloid Leukemia Bioenergetics and Enhance Antioxidant Defense and Escape from Chemotherapy. *Cell Metab*. 2020;32(5):829-843.e9.
  66. de Beauchamp L, Himonas E, Helgason GV. Mitochondrial metabolism as a potential therapeutic target in myeloid leukaemia. *Leukemia*. 2022;36(1):1–12.
  67. Lagadinou ED, Sach A, Callahan K, et al. BCL-2 inhibition targets oxidative phosphorylation and selectively eradicates quiescent human leukemia stem cells.

- Cell Stem Cell*. 2013;12(3):329–341.
68. Jones CL, Stevens BM, D'Alessandro A, et al. Inhibition of Amino Acid Metabolism Selectively Targets Human Leukemia Stem Cells. *Cancer Cell*. 2019;35(2):333–335.
  69. Kuntz EM, Baquero P, Michie AM, et al. Targeting mitochondrial oxidative phosphorylation eradicates therapy-resistant chronic myeloid leukemia stem cells. *Nat. Med*. 2017;23(10):1234–1240.
  70. Farge T, Saland E, de Toni F, et al. Chemotherapy-resistant human acute myeloid leukemia cells are not enriched for leukemic stem cells but require oxidative metabolism. *Cancer Discov*. 2017;7(7):716–735.
  71. Jones CL, Stevens BM, Culp-Hill R, et al. Inhibition of Fatty Acid Metabolism Resensitizes Resistant Leukemia Stem Cells to Venetoclax with Azacitidine. *Blood*. 2019;134(Supplement\_1):1272–1272.
  72. Romo-González M, Ijurko C, Hernández-Hernández Á. Reactive Oxygen Species and Metabolism in Leukemia: A Dangerous Liaison. *Front. Immunol*. 2022;13:2784.
  73. Rashkovan M, Ferrando A. Metabolic dependencies and vulnerabilities in leukemia. *Genes Dev*. 2019;33(21–22):1460–1474.
  74. Presti C Lo, Fauvelle F, Jacob M, Mondet J, Mossuz P. The metabolic reprogramming in acute myeloid leukemia patients depends on their genotype and is a prognostic marker. *Blood Adv*. 2021;5(1):156–166.
  75. Ju HQ, Zhan G, Huang A, et al. ITD mutation in FLT3 tyrosine kinase promotes Warburg effect and renders therapeutic sensitivity to glycolytic inhibition. *Leukemia*. 2017;31(10):2143–2150.
  76. De Rosa V, Monti M, Terlizzi C, et al. Coordinate modulation of glycolytic enzymes and OXPHOS by imatinib in BCR-ABL driven chronic myelogenous leukemia cells. *Int. J. Mol. Sci*. 2019;20(13):3134.
  77. Chen X, Qian Y, Wu S. The Warburg effect: Evolving interpretations of an established concept. *Free Radic. Biol. Med*. 2015;79:253–263.

78. Sriskanthadevan S, Jeyaraju D V., Chung TE, et al. AML cells have low spare reserve capacity in their respiratory chain that renders them susceptible to oxidative metabolic stress. *Blood*. 2015;125(13):2120–2130.
79. Fultang L, Gneo L, De Santo C, Mussai FJ. Targeting Amino Acid Metabolic Vulnerabilities in Myeloid Malignancies. *Front. Oncol*. 2021;11:674720.
80. Samudio I, Harmancey R, Fiegl M, et al. Pharmacologic inhibition of fatty acid oxidation sensitizes human leukemia cells to apoptosis induction. *J. Clin. Invest*. 2010;120(1):142–156.
81. Kreitz J, Schönfeld C, Seibert M, et al. Metabolic Plasticity of Acute Myeloid Leukemia. *Cells*. 2019;8(8):805.
82. El-Shaqanqery HE, Mohamed RH, Sayed AA. Mitochondrial Effects on Seeds of Cancer Survival in Leukemia. *Front. Oncol*. 2021;11:745924.
83. Chen X, Chen S, Yu D. Metabolic reprogramming of chemoresistant cancer cells and the potential significance of metabolic regulation in the reversal of cancer chemoresistance. *Metabolites*. 2020;10(7):289.
84. Jones CL, Inguva A, Jordan CT. Targeting Energy Metabolism in Cancer Stem Cells: Progress and Challenges in Leukemia and Solid Tumors. *Stem Cell*. 2021;28:378–393.
85. Prieto-Bermejo R, Romo-González M, Pérez-Fernández A, Ijurko C, Hernández-Hernández Á. Reactive oxygen species in haematopoiesis: Leukaemic cells take a walk on the wild side. *J. Exp. Clin. Cancer Res*. 2018;37(1):125.
86. Brand MD. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp. Gerontol*. 2010;45(7–8):466–72.
87. Li YR, Trush M. Defining ROS in Biology and Medicine. *React. Oxyg. Species*. 2016;1(1):9–21.
88. Takac I, Schröder K, Zhang L, et al. The E-loop is involved in hydrogen peroxide formation by the NADPH oxidase Nox4. *J. Biol. Chem*. 2011;286(15):13304–13.
89. Segal AW, Jones OTG. Novel cytochrome b system in phagocytic vacuoles of human granulocytes. *Nature*. 1978;276(5687):515–7.

90. Stasia MJ. CYBA encoding p22phox, the cytochrome b558 alpha polypeptide: gene structure, expression, role and physiopathology. *Gene*. 2016;586(1):27.
91. El-Benna J, Dang PMC, Gougerot-Pocidalo MA, Marie JC, Braut-Boucher F. p47phox, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases. *Exp. Mol. Med.* 2009 414. 2009;41(4):217–225.
92. Bechor E, Zahavi A, Amichay M, et al. p67phox binds to a newly identified site in Nox2 following the disengagement of an intramolecular bond—Canaan sighted? *J. Leukoc. Biol.* 2020;107(3):509–528.
93. Matute JD, Arias AA, Dinauer MC, Patiño PJ. p40phox: The last NADPH oxidase subunit. *Blood Cells, Mol. Dis.* 2005;35(2):291–302.
94. Miyano K, Sumimoto H. Assessment of the role for Rho family GTPases in NADPH oxidase activation. *Methods Mol. Biol.* 2012;827:195–212.
95. Hoang HM, Johnson HE, Heo J. Rac-dependent feedforward autoactivation of NOX2 leads to oxidative burst. *J. Biol. Chem.* 2021;297(2):100982.
96. O’Neill S, Brault J, Stasia MJ, Knaus UG. Genetic disorders coupled to ROS deficiency. *Redox Biol.* 2015;6:135.
97. Prieto-Bermejo R. p22 phox y NADPH oxidasas en la hematopoyesis in vivo. 2020.
98. Shanmugasundaram K, Nayak BK, Friedrichs WE, et al. NOX4 functions as a mitochondrial energetic sensor coupling cancer metabolic reprogramming to drug resistance. *Nat. Commun.* 2017;8(1):1–15.
99. Winterbourn CC. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat. Chem. Biol.* 2008;4(5):278–286.
100. Zhang J, Ye Z wei, Singh S, Townsend DM, Tew KD. An evolving understanding of the S-glutathionylation cycle in pathways of redox regulation. *Free Radic. Biol. Med.* 2018;120:204–216.
101. Berndt C, Lillig CH, Flohé L. Redox regulation by glutathione needs enzymes. *Front. Pharmacol.* 2014;5:168.

102. Mailloux RJ. Teaching the fundamentals of electron transfer reactions in mitochondria and the production and detection of reactive oxygen species. *Redox Biol.* 2015;4:381–398.
103. Perkins A, Nelson KJ, Parsonage D, Poole LB, Karplus PA. Peroxiredoxins: guardians against oxidative stress and modulators of peroxide signaling. *Trends Biochem. Sci.* 2015;40(8):435–445.
104. Nakao K, Minato N, Uemoto S. *Innovative Medicine*. Tokyo: Springer; 2015.
105. Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J. Nutr.* 2004;134(3):489–492.
106. Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. *Mol. Aspects Med.* 2009;30(1–2):42–59.
107. Oestreicher J, Morgan B. Glutathione: Subcellular distribution and membrane transport. *Biochem. Cell Biol.* 2019;97(3):270–289.
108. Locasale JW. Serine, glycine and one-carbon units: cancer metabolism in full circle. *Nat. Rev. Cancer.* 2013;13(8):572–583.
109. Maryanovich M, Gross A. A ROS rheostat for cell fate regulation. *Trends Cell Biol.* 2013;23(3):129–134.
110. Jang YY, Sharkis SJ. A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. *Blood.* 2007;110(8):3056–3063.
111. Juntilla MM, Patil VD, Calamito M, et al. AKT1 and AKT2 maintain hematopoietic stem cell function by regulating reactive oxygen species. *Blood.* 2010;115(20):4030–8.
112. Kouzi F, Picou F, Bourgeais J, et al. Carbenoxolone Decreases the Microenvironment-Induced Chemoresistance of Acute Myeloid Leukemia Cells. *Blood.* 2018;132(Supplement 1):1474.
113. Singh AK, Cancelas JA. Mitochondria Transfer in Bone Marrow Hematopoietic Activity. *Curr. Stem Cell Reports.* 2021;7(1):1–12.
114. Sardina JL, López-Ruano G, Sánchez-Abarca LI, et al. p22phox-dependent

- NADPH oxidase activity is required for megakaryocytic differentiation. *Cell Death Differ.* 2010;17(12):1842–1854.
115. Cao Y, Fang Y, Cai J, et al. ROS functions as an upstream trigger for autophagy to drive hematopoietic stem cell differentiation. *Hematology.* 2016;21(10):613–618.
116. Tothova Z, Kollipara R, Huntly BJ, et al. FoxOs Are Critical Mediators of Hematopoietic Stem Cell Resistance to Physiologic Oxidative Stress. *Cell.* 2007;128(2):325–339.
117. Xu Q, Choksi S, Qu J, et al. NADPH oxidases are essential for macrophage differentiation. *J. Biol. Chem.* 2016;291(38):20030–20041.
118. Kwak HJ, Liu P, Bajrami B, et al. Myeloid Cell-Derived Reactive Oxygen Species Externally Regulate the Proliferation of Myeloid Progenitors in Emergency Granulopoiesis. *Immunity.* 2015;42(1):159–71.
119. Van Os R, Robinson SN, Drukteinis D, Sheridan TM, Mauch PM. Respiratory burst of neutrophils is not required for stem cell mobilization in mice. *Br. J. Haematol.* 2000;111(2):695–9.
120. Mistry JJ, Marlein CR, Moore JA, et al. ROS-mediated PI3K activation drives mitochondrial transfer from stromal cells to hematopoietic stem cells in response to infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2019;116(49):24610–24619.
121. Kumari S, Badana AK, Murali Mohan G, Shailender G, Malla RR. Reactive Oxygen Species: A Key Constituent in Cancer Survival. *Biomark. Insights.* 2018;13:1177271918755391.
122. Jitschin R, Hofmann A, Bruns H, et al. Mitochondrial metabolism contributes to oxidative stress and reveals therapeutic targets in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2014;123(17):2663–2672.
123. Mazor D, Abucoider A, Meyerstein N, Kapelushnik J. Antioxidant status in pediatric acute lymphocytic leukemia (ALL) and solid tumors: The impact of oxidative stress. *Pediatr. Blood Cancer.* 2008;51(5):613–5.
124. Silva A, Yunes JA, Cardoso BA, et al. PTEN posttranslational inactivation and hyperactivation of the PI3K/Akt pathway sustain primary T cell leukemia viability.

- J. Clin. Invest.* 2008;118(11):3762–74.
125. Nieborowska-Skorska M, Kopinski PK, Ray R, et al. Rac2-MRC-cIII-generated ROS cause genomic instability in chronic myeloid leukemia stem cells and primitive progenitors. *Blood.* 2012;119(18):4253–63.
  126. Hole PS, Zabkiewicz J, Munje C, et al. Overproduction of NOX-derived ROS in AML promotes proliferation and is associated with defective oxidative stress signaling. *Blood.* 2013;122(9):3322–3330.
  127. Trombetti S, Cesaro E, Catapano R, et al. Oxidative stress and ros-mediated signaling in leukemia: Novel promising perspectives to eradicate chemoresistant cells in myeloid leukemia. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(5):1–19.
  128. Zhou F, Shen Q, Claret FX. Novel roles of reactive oxygen species in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. *J. Leukoc. Biol.* 2013;94(3):423–9.
  129. Kaweme NM, Zhou S, Changwe GJ, Zhou F. The significant role of redox system in myeloid leukemia: from pathogenesis to therapeutic applications. *Biomark. Res.* 2020;8(1):63.
  130. Mellqvist UH, Hansson M, Brune M, et al. Natural killer cell dysfunction and apoptosis induced by chronic myelogenous leukemia cells: Role of reactive oxygen species and regulation by histamine. *Blood.* 2000;96(5):1961–8.
  131. Aurelius J, Hallner A, Werlenius O, et al. NOX2-dependent immunosuppression in chronic myelomonocytic leukemia. *J. Leukoc. Biol.* 2017;102(2):459–466.
  132. Kamiguti AS, Serrander L, Lin K, et al. Expression and Activity of NOX5 in the Circulating Malignant B Cells of Hairy Cell Leukemia. *J. Immunol.* 2005;175(12):8424–30.
  133. Naughton R, Quiney C, Turner SD, Cotter TG. Bcr-Abl-mediated redox regulation of the PI3K/AKT pathway. *Leukemia.* 2009;23(8):1432–40.
  134. Jayavelu AK, Moloney JN, Böhmer FD, Cotter TG. NOX-driven ROS formation in cell transformation of FLT3-ITD-positive AML. *Exp. Hematol.* 2016;44(12):1113–1122.
  135. Aydin E, Hallner A, Grauers Wiktorin H, et al. NOX2 inhibition reduces oxidative



- stress and prolongs survival in murine KRAS-induced myeloproliferative disease. *Oncogene*. 2019;38(9):1534–1543.
136. Adane B, Ye H, Khan N, et al. The Hematopoietic Oxidase NOX2 Regulates Self-Renewal of Leukemic Stem Cells. *Cell Rep*. 2019;27(1):238-254.e6.
137. Grauers Wiktorin H, Nilsson T, Aydin E, et al. Role of NOX2 for leukaemic expansion in a murine model of BCR-ABL1+ leukaemia. *Br. J. Haematol*. 2018;182(2):290–294.
138. Paolillo R, Boulanger M, Gâtel P, et al. The NADPH oxidase NOX2 is a marker of adverse prognosis involved in chemoresistance of acute myeloid leukemias. *Haematologica*. 2022;107(11):2562–2575.
139. Tossounian MA, Zhang B, Gout I. The Writers, Readers, and Erasers in Redox Regulation of GAPDH. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*. 2020;9(12):1–21.
140. Anastasiou D, Poulogiannis G, Asara JM, et al. Inhibition of pyruvate kinase M2 by reactive oxygen species contributes to cellular antioxidant responses. *Science*. 2011;334(6060):1278–1283.
141. McLain AL, Szweda PA, Szweda LI.  $\alpha$ -Ketoglutarate dehydrogenase: A mitochondrial redox sensor. *Free Radic. Res*. 2011;45(1):29–36.
142. Mailloux RJ. Cysteine Switches and the Regulation of Mitochondrial Bioenergetics and ROS Production. *Adv. Exp. Med. Biol*. 2019;1158:197–216.
143. Jones CL, Stevens BM, D'Alessandro A, et al. Cysteine depletion targets leukemia stem cells through inhibition of electron transport complex II. *Blood*. 2019;134(4):389–394.
144. Tabatabaie T, Potts JD, Floyd RA. Reactive oxygen species-mediated inactivation of pyruvate dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys*. 1996;336(2):290–6.
145. Hurd TR, Collins Y, Abakumova I, et al. Inactivation of pyruvate dehydrogenase kinase 2 by mitochondrial reactive oxygen species. *J. Biol. Chem*. 2012;287(42):35153–35160.
146. Van Der Reest J, Lilla S, Zheng L, Zanivan S, Gottlieb E. Proteome-wide analysis of cysteine oxidation reveals metabolic sensitivity to redox stress. *Nat. Commun*.

- 2018;9(1):1581.
147. Kang SW, Lee S, Lee EK. ROS and energy metabolism in cancer cells: Alliance for fast growth. *Arch. Pharm. Res.* 2015;38(3):338–345.
  148. Haro KJ, Sheth A, Scheinberg DA. Dysregulation of IRP1-Mediated Iron Metabolism Causes Gamma Ray-specific Radioresistance in Leukemia Cells. *PLoS One.* 2012;7(11):e48841.
  149. Cui L, Cheng Z, Liu Y, et al. Overexpression of PDK2 and PDK3 reflects poor prognosis in acute myeloid leukemia. *Cancer Gene Ther.* 2020;27(1–2):15–21.
  150. Shinohara H, Taniguchi K, Kumazaki M, et al. Anti-cancer fatty-acid derivative induces autophagic cell death through modulation of PKM isoform expression profile mediated by bcr-abl in chronic myeloid leukemia. *Cancer Lett.* 2015;360(1):28–38.
  151. Issa GC, DiNardo CD. Acute myeloid leukemia with IDH1 and IDH2 mutations: 2021 treatment algorithm. *Blood Cancer J.* 2021;11(6):107.
  152. Saito Y, Chapple RH, Lin A, Kitano A, Nakada D. AMPK Protects Leukemia-Initiating Cells in Myeloid Leukemias from Metabolic Stress in the Bone Marrow. *Cell Stem Cell.* 2015;17(5):585–96.
  153. Gregory MA, D'Alessandro A, Alvarez-Calderon F, et al. ATM/G6PD-driven redox metabolism promotes FLT3 inhibitor resistance in acute myeloid leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2016;113(43):E6669–E6678.
  154. Robinson AJ, Hopkins GL, Rastogi N, et al. Reactive oxygen species drive proliferation in acute myeloid leukemia via the glycolytic regulator PFKFB3. *Cancer Res.* 2020;80(5):937–949.
  155. Jeanne M, Lallemand-Breitenbach V, Ferhi O, et al. PML/RARA oxidation and arsenic binding initiate the antileukemia response of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. *Cancer Cell.* 2010;18(1):88–98.
  156. Iacobini M, Menichelli A, Palumbo G, et al. Involvement of oxygen radicals in cytarabine-induced apoptosis in human polymorphonuclear cells. *Biochem. Pharmacol.* 2001;61(8):1033–1040.

157. Ling YH, Liebes L, Zou Y, Perez-Soler R. Reactive oxygen species generation and mitochondrial dysfunction in the apoptotic response to Bortezomib, a novel proteasome inhibitor, in human H460 non-small cell lung cancer cells. *J. Biol. Chem.* 2003;278(36):33714–33723.
158. Sánchez-Sánchez B, Gutiérrez-Herrero S, López-Ruano G, et al. NADPH oxidases as therapeutic targets in chronic myelogenous leukemia. *Clin. Cancer Res.* 2014;20(15):4014–4025.
159. Mason CC, Fiol CR, Baker MJ, et al. Identification of genetic targets in acute myeloid leukaemia for designing targeted therapy. *Br. J. Haematol.* 2020;1–9.
160. Romo-González M, Moreno-Paz S, García-Hernández V, Sánchez-Guijo F, Hernández-Hernández Á. Inhibition of xanthine oxidoreductase enhances the potential of tyrosine kinase inhibitors against chronic myeloid leukemia. *Antioxidants.* 2020;9(1):74.
161. Abdel-Wahab O, Levine RL. Metabolism and the leukemic stem cell. *J. Exp. Med.* 2010;207(4):677–680.
162. Dinndorf PA, Gootenberg J, Cohen MH, Keegan P, Pazdur R. FDA drug approval summary: pegaspargase (oncaspar) for the first-line treatment of children with acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Oncologist.* 2007;12(8):991–998.
163. Lachowicz CA, Reville PK, Kantarjian H, et al. Venetoclax combined with induction chemotherapy in patients with newly diagnosed acute myeloid leukaemia: a post-hoc, propensity score-matched, cohort study. *Lancet. Haematol.* 2022;9(5):e350–e360.
164. Stine ZE, Schug ZT, Salvino JM, Dang C V. Targeting cancer metabolism in the era of precision oncology. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2022;21(2):141–162.
165. Soltani M, Zhao Y, Xia Z, Ganjalikhani Hakemi M, Bazhin A V. The Importance of Cellular Metabolic Pathways in Pathogenesis and Selective Treatments of Hematological Malignancies. *Front. Oncol.* 2021;11:767026.
166. Cai Q, Capitano M, Huang X, et al. Combinations of antioxidants and/or epigenetic enzyme inhibitors allow for enhanced collection of mouse bone marrow hematopoietic stem cells in ambient air. *Blood Cells. Mol. Dis.* 2018;71:23.

167. Tijaro-Ovalle NM, Karantanos T, Wang HT, Boussiotis VA. Metabolic targets for improvement of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and graft-vs.host disease. *Front. Immunol.* 2019;10:295.
168. Gupta P, Jagavelu K, Mishra DP. Inhibition of NADPH Oxidase-4 Potentiates 2-Deoxy-d-Glucose-Induced Suppression of Glycolysis, Migration, and Invasion in Glioblastoma Cells: Role of the Akt/HIF1 $\alpha$ /HK-2 Signaling Axis. *Antioxidants Redox Signal.* 2015;23(8):665–681.
169. Mills KI, Kohlmann A, Williams PM, et al. Microarray-based classifiers and prognosis models identify subgroups with distinct clinical outcomes and high risk of AML transformation of myelodysplastic syndrome. *Blood.* 2009;114(5):1063–1072.
170. Wouters BJ, Löwenberg B, Erpelinck-Verschueren CAJ, et al. Double CEBPA mutations, but not single CEBPA mutations, define a subgroup of acute myeloid leukemia with a distinctive gene expression profile that is uniquely associated with a favorable outcome. *Blood.* 2009;113(13):3088–3091.
171. Tomasson MH, Xiang Z, Walgren R, et al. Somatic mutations and germline sequence variants in the expressed tyrosine kinase genes of patients with de novo acute myeloid leukemia. *Blood.* 2008;111(9):4797–4808.
172. Abbas H, Mohanty V, Wang R, et al. Decoupling Lineage-Associated Genes in Acute Myeloid Leukemia Reveals Inflammatory and Metabolic Signatures Associated With Outcomes. *Front. Oncol.* 2021;11:705627.
173. Tyner JW, Tognon CE, Bottomly D, et al. Functional genomic landscape of acute myeloid leukaemia. *Nat. 2018 5627728.* 2018;562(7728):526–531.
174. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods.* 1986;89(2):271–277.
175. Reynolds A, Leake D, Boese Q, et al. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat. Biotechnol.* 2004;22(3):326–330.
176. López-Ruano G, Prieto-Bermejo R, Ramos TL, et al. PTPN13 and  $\beta$ -Catenin Regulate the Quiescence of Hematopoietic Stem Cells and Their Interaction with

- the Bone Marrow Niche. *Stem cell reports*. 2015;5(4):516–31.
177. Pérez Fernández A. Inhibition of SHP1 and SHP2 as a molecular targeted therapy against myeloid leukaemias. 2019.
178. Diebold BA, Wilder SG, Deken X De, et al. Guidelines for the Detection of NADPH Oxidases by Immunoblot and RT-qPCR. *NADPH oxidases, Methods Protoc*. 2019;1982:191–229.
179. Neon Transfection System Cell Line Data | Thermo Fisher Scientific - ES.
180. Garrel C, Alessandri JM, Guesnet P, Al-Gubory KH. Omega-3 fatty acids enhance mitochondrial superoxide dismutase activity in rat organs during post-natal development. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 2012;44(1):123–131.
181. Akerboom TPM, Sies H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol*. 1981;77(C):373–382.
182. Al-Gubory KH, Garrel C. Diet Supplementation with Pomegranate Peel Improves Embryonic Survival in a Mouse Model of Early Pregnancy Loss. *J. Diet. Suppl*. 2022;19(2):243–258.
183. Ramakrishnan R, Peña-Martínez P, Agarwal P, et al. CXCR4 Signaling Has a CXCL12-Independent Essential Role in Murine MLL-AF9-Driven Acute Myeloid Leukemia. *Cell Rep*. 2020;31(8):107684.
184. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. 2019.
185. Vicente-Villardón J. Una alternativa a los métodos factoriales clásicos basada en una generalización de los métodos biplot. 1992.
186. Díaz-Faes AA, Costas R, Purificación Galindo M, Bordons M. Unravelling the performance of individual scholars: Use of Canonical Biplot analysis to explore the performance of scientists by academic rank and scientific field. *J. Informetr*. 2015;9(4):722–733.
187. Blaise BJ, Shintu L, Elena B, et al. Statistical recoupling prior to significance testing in nuclear magnetic resonance based metabonomics. *Anal. Chem*. 2009;81(15):6242–6251.

188. Dakik H, Dor M El, Leclerc J, et al. Characterization of NADPH oxidase expression and activity in acute myeloid leukemia cell lines: A correlation with the differentiation status. *Antioxidants*. 2021;10(3):498.
189. Li L, Wang J, Ye RD, et al. PML/RAR $\alpha$  fusion protein mediates the unique sensitivity to arsenic cytotoxicity in acute promyelocytic leukemia cells: Mechanisms involve the impairment of cAMP signaling and the aberrant regulation of NADPH oxidase. *J. Cell. Physiol.* 2008;217(2):486–493.
190. Martner A, Wiktorin HG, Lenox B, et al. Histamine Promotes the Development of Monocyte-Derived Dendritic Cells and Reduces Tumor Growth by Targeting the Myeloid NADPH Oxidase. *J. Immunol.* 2015;194(10):5014–5021.
191. Ijurko C, González-García N, Galindo-Villardón P, Hernández-Hernández Á. A 29-gene signature associated with NOX2 discriminates acute myeloid leukemia prognosis and survival. *Am. J. Hematol.* 2022;97(4):448–457.
192. Bennett NK, Nguyen MK, Darch MA, et al. Defining the ATPome reveals cross-optimization of metabolic pathways. *Nat. Commun.* 2020;11(1):4319.
193. Harvey CJ, Thimmulappa RK, Singh A, et al. Nrf2-regulated glutathione recycling independent of biosynthesis is critical for cell survival during oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 2009;46(4):443.
194. Nepstad I, Hatfield KJ, Grønningsæter IS, Reikvam H. The PI3K-Akt-mTOR Signaling Pathway in Human Acute Myeloid Leukemia (AML) Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(8):2907.
195. Souder DC, Anderson RM. An expanding GSK3 network: implications for aging research. *Geroscience*. 2019;41(4):369–382.
196. Papadopoli D, Pollak M, Topisirovic I. The role of GSK3 in metabolic pathway perturbations in cancer. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 2021;1868(8):119059.
197. Hoffmeister L, Diekmann M, Brand K, Huber R. GSK3: A Kinase Balancing Promotion and Resolution of Inflammation. *Cells*. 2020;9(4):820.
198. Vallée A, Lecarpentier Y, Vallée JN. The Key Role of the WNT/ $\beta$ -Catenin Pathway in Metabolic Reprogramming in Cancers under Normoxic Conditions.

- Cancers (Basel)*. 2021;13(21):5557.
199. Lecarpentier Y, Schussler O, Hébert JL, Vallée A. Multiple Targets of the Canonical WNT/ $\beta$ -Catenin Signaling in Cancers. *Front. Oncol.* 2019;9:1248.
  200. Kiffin R, Wiktorin HG, Nilsson MS, et al. Anti-leukemic properties of histamine in monocytic leukemia: The role of NOX2. *Front. Oncol.* 2018;8:1–12.
  201. Baillet A, Hograindleur MA, El Benna J, et al. Unexpected function of the phagocyte NADPH oxidase in supporting hyperglycolysis in stimulated neutrophils: Key role of 6-phosphofructo-2-kinase. *FASEB J.* 2017;31(2):663–673.
  202. Yalamanchili N, Kriete A, Alfego D, et al. Distinct Cell Stress Responses Induced by ATP Restriction in Quiescent Human Fibroblasts. *Front. Genet.* 2016;7:171.
  203. Lu W, Hu Y, Chen G, et al. Novel role of NOX in supporting aerobic glycolysis in cancer cells with mitochondrial dysfunction and as a potential target for cancer therapy. *PLoS Biol.* 2012;10(5):e1001326.
  204. Kennedy L, Sandhu JK, Harper ME, Cuperlovic-culf M. Role of Glutathione in Cancer: From Mechanisms to Therapies. *Biomolecules.* 2020;10(10):1–27.
  205. Pei S, Minhajuddin M, Callahan KP, et al. Targeting Aberrant Glutathione Metabolism to Eradicate Human Acute Myelogenous Leukemia Cells. *J. Biol. Chem.* 2013;288(47):33542.
  206. Cifuentes-Pagano E, Meijles DN, Pagano PJ. The quest for selective nox inhibitors and therapeutics: Challenges, triumphs and pitfalls. *Antioxidants Redox Signal.* 2014;20(17):2741–2754.
  207. Altenhöfer S, Radermacher KA, Kleikers PWM, Wingler K, Schmidt HHHW. Evolution of NADPH oxidase inhibitors: Selectivity and mechanisms for target engagement. *Antioxidants Redox Signal.* 2015;23(5):406–427.
  208. Augsburger F, Filippova A, Rasti D, et al. Pharmacological characterization of the seven human NOX isoforms and their inhibitors. *Redox Biol.* 2019;26:101272.
  209. Erdem A, Marin S, Pereira-Martins DA, et al. The Glycolytic Gatekeeper PDK1 defines different metabolic states between genetically distinct subtypes of human

- acute myeloid leukemia. *Nat. Commun.* 2022 131. 2022;13(1):1–16.
210. Matre P, Protopopova M, Feng N, et al. Novel Nanomolar Potency Mitochondrial Complex I Inhibitor Iacs-1131 Selectively Kills Oxphos-Dependent AML Cells. *Blood.* 2014;124(21):622.
211. Aurelius J, Thorén F, Akhiani A, et al. Monocytic AML cells inactivate antileukemic lymphocytes: role of NADPH oxidase/gp91(phox) expression and the PARP-1/PAR pathway of apoptosis. *Blood.* 2012;119(24):5832–5837.
212. Dao VTV, Elbatreek MH, Altenhöfer S, et al. Isoform-selective NADPH oxidase inhibitor panel for pharmacological target validation. *Free Radic. Biol. Med.* 2020;148(December 2019):60–69.
213. Seredenina T, Nayernia Z, Sorce S, et al. Evaluation of NADPH oxidases as drug targets in a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radic. Biol. Med.* 2016;97:95–108.
214. Qin YY, Li M, Feng X, et al. Combined NADPH and the NOX inhibitor apocynin provides greater anti-inflammatory and neuroprotective effects in a mouse model of stroke. *Free Radic. Biol. Med.* 2017;104:333–345.
215. Savla SR, Laddha AP, Kulkarni YA. Pharmacology of apocynin: a natural acetophenone. *Drug Metab. Rev.* 2021;53(4):542–562.
216. Sun QA, Hess DT, Wang B, Miyagi M, Stamler JS. Off-target thiol alkylation by the NADPH oxidase inhibitor 3-benzyl-7-(2-benzoxazolyl)thio-1,2,3-triazolo[4,5-d]pyrimidine (VAS2870). *Free Radic. Biol. Med.* 2012;52(9):1897.
217. Urbańska K, Orzechowski A. Unappreciated role of LDHA and LDHB to control apoptosis and autophagy in tumor cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(9):1–15.
218. Moreno C, Muñoz C, Terol MJ, Hernández-Rivas JÁ, Villanueva M. Restoration of the immune function as a complementary strategy to treat Chronic Lymphocytic Leukemia effectively. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2021;40(1):1–16.
219. Curran EK, Godfrey J, Kline J. Mechanisms of Immune Tolerance in Leukemia and Lymphoma. *Trends Immunol.* 2017;38(7):513.
220. Bar M, Othus M, Park HM, et al. Elevated lymphocyte count at time of acute



- myeloid leukemia diagnosis is associated with shorter remission. *Leuk. Lymphoma*. 2015;56(11):3109–3115.
221. Hao F, Sholy C, Wang C, Cao M, Kang X. The Role of T Cell Immunotherapy in Acute Myeloid Leukemia. *Cells*. 2021;10(12):3376.
222. Shepshelovich D, Edel Y, Goldvaser H, et al. Pharmacodynamics of cytarabine induced leucopenia: a retrospective cohort study. *Br. J. Clin. Pharmacol*. 2015;79(4):685.
223. Chen X, Burkhardt DB, Hartman AA, et al. MLL-AF9 initiates transformation from fast-proliferating myeloid progenitors. *Nat. Commun*. 2019 101. 2019;10(1):1–15.
224. Chapellier M, Peña-Martínez P, Ramakrishnan R, et al. Arrayed molecular barcoding identifies TNFSF13 as a positive regulator of acute myeloid leukemia-initiating cells. *Haematologica*. 2019;104(10):2006–2016.
225. Butler D, Brown QB, Chin DJ, et al. Cellular responses to protein accumulation involve autophagy and lysosomal enzyme activation. *Rejuvenation Res*. 2005;8(4):227–237.
226. Mikalayeva V, Pankevičiūtė M, Žvikas V, Skeberdis VA, Bordel S. Contribution of branched chain amino acids to energy production and mevalonate synthesis in cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2021;585:61–67.
227. Zhao Z, Han F, Yang S, Wu J, Zhan W. Oxamate-mediated inhibition of lactate dehydrogenase induces protective autophagy in gastric cancer cells: involvement of the Akt-mTOR signaling pathway. *Cancer Lett*. 2015;358(1):17–26.
228. Pollyea DA, Jordan CT. Therapeutic targeting of acute myeloid leukemia stem cells. *Blood*. 2017;129(12):1627–1635.
229. Škrtić M, Sriskanthadevan S, Jhas B, et al. Inhibition of Mitochondrial Translation as a Therapeutic Strategy for Human Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Cell*. 2011;20(5):674–688.
230. Ferrara F, Lessi F, Vitagliano O, Birkenghi E, Rossi G. Current Therapeutic Results and Treatment Options for Older Patients with Relapsed Acute Myeloid Leukemia. *Cancers (Basel)*. 2019;11(2):224.

231. DiNardo CD, Rausch CR, Benton C, et al. Clinical experience with the BCL2-inhibitor venetoclax in combination therapy for relapsed and refractory acute myeloid leukemia and related myeloid malignancies. *Am. J. Hematol.* 2018;93(3):401–407.
232. Culp-Hill R, D'Alessandro A, Pietras EM. Extinguishing The Embers: Targeting AML Metabolism. *Trends Mol. Med.* 2021;27(4):332.
233. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 2022;12(1):31–46.
234. Niu B, Liao K, Zhou Y, et al. Application of glutathione depletion in cancer therapy: Enhanced ROS-based therapy, ferroptosis, and chemotherapy. *Biomaterials.* 2021;277:121110.
235. Silber R, Farber C, Papadopoulos E, et al. Glutathione Depletion in Chronic Lymphocytic Leukemia B Lymphocytes. *Blood.* 1992;80(8):2038–2043.
236. Canaani J, Beohou E, Labopin M, et al. Impact of FAB classification on predicting outcome in acute myeloid leukemia, not otherwise specified, patients undergoing allogeneic stem cell transplantation in CR1: An analysis of 1690 patients from the acute leukemia working party of EBMT. *Am. J. Hematol.* 2017;92(4):344–350.
237. Prata C, Maraldi T, Fiorentini D, et al. Nox-generated ROS modulate glucose uptake in a leukaemic cell line. *Free Radic. Res.* 2008;42(5):405–414.
238. Bullinger L, Döhner K, Bair E, et al. Use of Gene-Expression Profiling to Identify Prognostic Subclasses in Adult Acute Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2004;351(4):2605–2615.
239. Ng SWK, Mitchell A, Kennedy JA, et al. A 17-gene stemness score for rapid determination of risk in acute leukaemia. *Nature.* 2016;540(7633):433–437.
240. Döhner H, Estey E, Grimwade D, et al. Global Acute Myeloid Leukemia Epidemiology and Patient Flow Analysis 2016. *Blood.* 2017;129(4):424–448.
241. Mrożek K, Marcucci G, Nicolet D, et al. Prognostic significance of the European LeukemiaNet standardized system for reporting cytogenetic and molecular alterations in adults with acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2012;30(36):4515–4523.

242. Bullinger L, Dohner K, Bair E, et al. New England Journal Medicine. *N. Engl. J. Med.* 2004;351(4):2605–2615.
243. Nehme A, Dakik H, Picou F, et al. Horizontal meta-analysis identifies common deregulated genes across AML subgroups providing a robust prognostic signature. *Blood Adv.* 2020;4(20):5322–5335.
244. Robinson AJ, Davies S, Darley RL, Tonks A. Reactive Oxygen Species Rewires Metabolic Activity in Acute Myeloid Leukemia. *Front. Oncol.* 2021;11:1–10.
245. Murphy MP, Bayir H, Belousov V, et al. Guidelines for measuring reactive oxygen species and oxidative damage in cells and in vivo. *Nat. Metab.* 2022;4(6):651–662.
246. M B, S C, J C, et al. Improved leukemia-free survival after postconsolidation immunotherapy with histamine dihydrochloride and interleukin-2 in acute myeloid leukemia: results of a randomized phase 3 trial. *Blood.* 2006;108(1):88–96.
247. Wang J, Li L, Cang H, Shi G, Yi J. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species are responsible for the high susceptibility to arsenic cytotoxicity in acute promyelocytic leukemia cells. *Leuk. Res.* 2008;32(3):429–436.
248. Chou WC, Jie C, Kenedy AA, et al. Role of NADPH oxidase in arsenic-induced reactive oxygen species formation and cytotoxicity in myeloid leukemia cells. *PNAS.* 2004;101(13):4578–4583.
249. Zhang XD, Qin ZH, Wang J. The role of p53 in cell metabolism. *Acta Pharmacol. Sin.* 2010;31(9):1208–1212.
250. Bensaad K, Tsuruta A, Selak MA, et al. TIGAR, a p53-Inducible Regulator of Glycolysis and Apoptosis. *Cell.* 2006;126(1):107–120.
251. Daver N, Schlenk RF, Russell NH, Levis MJ. Targeting FLT3 mutations in AML: review of current knowledge and evidence. *Leukemia.* 2019;33(2):299–312.
252. Sillar JR, Germon ZP, De Iuliis GN, Dun MD. The role of reactive oxygen species in acute myeloid leukaemia. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(23):1–20.
253. Saitoh K, Miura I, Ohshima A, et al. Translocation (8;12;21)(q22.1;q24.1;q22.1): A new masked type of t(8;21)(q22;q22) in a patient with acute myeloid leukemia. *Cancer Genet. Cytogenet.* 1997;96(2):111–114.