



**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE LA SANTÍSIMA CONCEPCION  
FACULTAD DE MEDICINA.**

**Identificación de loci candidatos en la caracterización molecular de la Leucemia Mieloide  
Aguda provocada por la proteína de fusión *driver MLL-AF9***

POR

Diego Cuevas Moya

Tutor Dr. Carlos Farkas Pool  
Departamento de Ciencias Básicas y Morfología  
Facultad de Medicina  
Universidad Católica de la Santísima Concepción

Co- Tutor: -

Evaluador externo: Dr. Claudio Carril Pardo, Facultad de Medicina, Universidad San Sebastián.  
Evaluador interno: Dra. Valentina González Pecchi, Facultad de Medicina, Universidad Católica de la  
Santísima Concepción.

**AÑO 2024**

**Concepción, Chile**



## **Acta de tesis**

*Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mi tutor, el Dr. Carlos Farkas por su dedicación y orientación durante todo este proceso.*

*A mi familia por su constante apoyo y comprensión.*

*A mi equipo de laboratorio y todos aquellos que en mayor o menor medida contribuyeron al desarrollo de esta tesis.*

## Resumen.

La Leucemia Mieloide Aguda es una malignidad heterogénea originada en células progenitoras mieloides, caracterizada por una diversidad genética y clínica distintiva. Los sistemas de clasificación, French-American-British [1] y World Health Organization (WHO), distinguen subtipos de LMA basados en morfología, inmunofenotipo y características genéticas. A pesar de estas clasificaciones, el panorama molecular de la LMA, marcado por aberraciones genéticas recurrentes como FLT3, NPM1 y la fusión *MLL-AF9*, dicta el pronóstico y guía las estrategias terapéuticas.

La variabilidad genética de la LMA, especialmente mutaciones en genes como FLT3, NPM1 y MLL, subraya la complejidad de la enfermedad. Las implicaciones terapéuticas subsiguientes y el pronóstico basado en estas mutaciones ilustran el potencial de terapias dirigidas. La proteína de fusión *MLL-AF9*, prevalente en la LMA inducida por terapia, presenta desafíos para la intervención directa debido a sus funciones intrincadas.

Las familias de genes *ZEB* y *SNAI*, reguladores de la transición epitelial-mesenquimal (EMT) y metástasis en el cáncer, ofrecen nuevas perspectivas sobre la regulación hematopoyética y posibles objetivos terapéuticos. Sus roles multifacéticos en la proliferación, diferenciación y metástasis en la LMA sugieren vías para tratamientos innovadores.

En la investigación sobre loci candidatos en Leucemia Mieloide Aguda (LMA), se encontró que al *deletar in vivo* los factores de transcripción *Zeb1* y/o *Zeb2* se puede revertir el fenotipo molecular y la citología característicos de la LMA, de forma más dramática con la delección de *Zeb2*. Este hallazgo se logró mediante la creación de un modelo *in vivo* de LMA, lo que permitió la secuenciación y análisis exhaustivo de la médula ósea de estos animales, incluyendo histología asociada. El propósito de este estudio fue identificar y dar prioridad a las mutaciones y genes alterados específicos en la LMA, resaltando la importancia de una estratificación diagnóstica precisa y las implicaciones significativas que tiene una única mutación en el tratamiento de la LMA.

**Palabras clave:** Leucemia Mieloide Aguda, *Zeb1*, *Zeb2*, AML M5, Hematoxilina & Eosina, *MLL-AF9*, invasión, metástasis.

## ABSTRACT

Acute Myeloid Leukemia (*LMA*) is a heterogeneous malignancy originating in myeloid progenitor cells, characterized by distinctive genetic and clinical diversity. Classification systems, such as the French-American-British [1] and World Health Organization (WHO), distinguish *LMA* subtypes based on morphology, immunophenotype, and genetic features. Despite these classifications, the molecular landscape of *LMA*, marked by recurrent genetic aberrations such as FLT3, NPM1, and *MLL-AF9* fusion, dictates prognosis and guides therapeutic strategies.

The genetic variability of *LMA*, especially mutations in genes like FLT3, NPM1, and MLL, underscores the complexity of the disease. Subsequent therapeutic implications and prognosis based on these mutations illustrate the potential of targeted therapies. The *MLL-AF9* fusion protein, prevalent in therapy-induced *LMA*, presents challenges for direct intervention due to its intricate functions.

The ZEB and SNAI gene families, regulators of epithelial-mesenchymal transition (EMT) and metastasis in cancer, offer new insights into hematopoietic regulation and potential therapeutic targets. Their multifaceted roles in proliferation, differentiation, and metastasis in *LMA* suggest pathways for innovative treatments.

Research on candidate loci in Acute Myeloid Leukemia (*LMA*) found that deleting the transcription factors Zeb1 and/or Zeb2 *in vivo* can reverse the molecular phenotype and characteristic cytology of *LMA*, more dramatically with Zeb2 deletion. This finding was achieved by creating an *in vivo* model of *LMA*, enabling comprehensive sequencing and analysis of bone marrow from these animals, including associated histology. The purpose of this study was to identify and prioritize specific mutations and altered genes in *LMA*, highlighting the importance of precise diagnostic stratification and the significant implications of a single mutation in *LMA* treatment.

**Key words:** Acute Myeloid Leukemia, Zeb1, Zeb2, AML M5, Haematoxylin & Eosin, MLL-AF9, invasion, metastasis.

## Índice

Portada	1
Acta	3
Agradecimientos	4
Resumen de tesis y abreviaciones	5
I. Introducción ¿Qué es la leucemia mieloide aguda?	11
II. Clasificaciones clásicas de la LMA	11
III. Variabilidad genética de LMA	13
IV. Heterogeneidad en las proteínas de fusión <i>MLL-AF9</i> y su incidencia.	15
V. Tratamientos actuales de la Leucemia Mieloide Aguda que presenta la proteína de fusión <i>MLL-AF9</i>	17
VI. La Importancia de los Factores EMT y los genes <i>Zeb</i> en el Riesgo y la Progresión de la LMA.	20
Hipótesis	22
Objetivos generales	22
Objetivos específicos	22
Metodología	23
- Generación de partidores y análisis bioinformático	23
- Parte A: Generación de partículas retrovirales <i>MLL-AF9</i> desde células <i>HEK293</i>	26
- Parte B: Generación de modelo <i>in vivo</i> para generar células LMA con expresión de <i>GFP: Spinoculación</i>	29
- Parte C: Monitoreo de los animales	31
- Protocolo de Extracción/Fijación de tejidos u análisis histológico	33
Resultados	37
- Verificación y caracterización del plásmido <i>MLL-AF9</i> Asociado a <i>YFP</i>	37
- Diseño de partidores específicos para <i>MLL-AF9</i>	45
- Estandarización del modelo " <i>in vivo</i> " para la generación de LMA en modelo de ratón	50
- Monitoreo de la progresión de LMA " <i>in vivo</i> "	52
- Análisis Histológico de médula ósea – <i>Deep learning</i> análisis	55
Discusión	69
Conclusión y proyecciones	71
Referencias	72

## Índice de figuras

Figura 1. Diagrama de carga del gel de agarosa	23
Figura 2. Representación esquemática de la generación de un retrovirus <i>MLL-AF9 in vitro</i>	28
Figura 3. secuencia de trabajo para la extracción de médula ósea	30
Figura 4. esquema de locus rosa 26	30
Figura 5. Flujograma de trabajo que esquematiza la generación de LMA <i>in vivo</i> y su posterior análisis histológico	32
Figura 6. Análisis electroforético del plásmido <i>MLL-AF9</i>	38
Figura 7. Análisis de cobertura y anotación génica de los segmentos <i>MLL-AF9</i> y <i>YFP</i> en el plásmido <i>MLL-AF9-YFP</i> , basado en lecturas de RNA-seq TruSeq de Illumina de células leucémicas c-kit positivas, alineadas contra el plásmido ensamblado	40
Figura 8: Resultados de secuenciación Sanger y análisis de dominios conservados del plásmido <i>MLL-AF9-YFP</i>	41
figura 9. Análisis de expresión de los segmentos <i>MLL-AF9</i> y <i>YFP</i> en células de médula ósea <i>MLL-AF9</i> de ratones C57BL6, utilizando single cell RNA-seq. A través de un análisis de visualización <i>k-nearest-neighbor</i> , se exploraron las tendencias de diferenciación celular y la expresión de los transcritos que codifican para las proteínas <i>MLL-AF9</i> e <i>YFP</i> bajo distintas condiciones	43
Figura 10. Resultado de la secuenciación de tipo sanger realizada en el plásmido <i>MLL-AF9</i> y transformada en secuencia aminoacídica mediante la herramienta Expsy Tools	45
Figura 11. Resultado del alineamiento fue realizado en Clustal omega, utilizando el plásmido secuenciado de <i>MLL-AF9</i> y varias secuenciaciones obtenidas mediante análisis bioinformático en NCBI	46
Figura 12. Caracterización de los dominios de la proteína de fusión <i>MLL-AF9</i>	47
Figura 13. Detección de la proteína de fusión <i>MLL-AF9</i> mediante PCR en tiempo real	48
Figura 14. Comprobación del plásmido <i>MLL-AF9-GFP</i> mediante electroforesis en gel de agarosa	51
Figura 15. Citometría de flujo proveniente de sangre periférica de ratones infectados con retrovirus luego de 16 semanas de la inoculación	53
Figura 16. Citometría de flujo proveniente de sangre periférica de ratones infectados con retrovirus luego de 18 semanas de la inoculación	54
Figura 17. Características citopatológicas de la LMA tras la delección de doble de <i>Zeb1</i> y <i>Zeb2</i>	56

Figura 18. Histología de médula ósea de ratón con tinción de hematoxilina eosina aumento 100x	<b>58</b>
Figura 19. Histología de médula ósea de ratón con tinción de Giemsa eosina aumento 10x y 100x	<b>59</b>
Figura 20: Análisis Histopatológico y Computacional de la Progresión de la LMA Post-Eliminación de <i>Zeb1/2</i>	<b>60</b>
Figura 21: Invasión hepática en diferentes genotipos post-delección de <i>Zeb1/2</i>	<b>62</b>
Figura 22. IHQ <i>CD3</i>	<b>65</b>
Figura 23. IHQ <i>BCL-2</i>	<b>66</b>
Figura 24. IHQ <i>CD34</i>	<b>67</b>

## Índice de tablas

Tabla 1. Resumen de la clasificación otorgada por la OMS a los subtipos de LMA	14
Tabla 2. Reguladores de los genes <i>ZEB2</i>	21

## **I. Introducción: ¿Qué es la Leucemia Mieloide Aguda?**

Las leucemias son un grupo de enfermedades caracterizadas por la inhibición de la maduración adecuada y la diferenciación de las células del tejido sanguíneo. Las células leucémicas exhiben una naturaleza maligna, agresiva y de rápido crecimiento [2]. Si la inhibición de la maduración en las células del tejido sanguíneo ocurre a nivel de las células madre hematopoyéticas (HSC), la progresión de la enfermedad será más agresiva y se categorizará como 'leucemia aguda'. Respecto a lo anterior, actualmente se reconocen dos tipos. La leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) que es el tipo más común de leucemia en infantes, adolescentes y adultos jóvenes. También puede ocurrir en adultos y afecta a la línea linfóide. [3]. Por otro lado, la Leucemia Mieloide Aguda (LMA) es un tipo menos común de leucemia que es predominante en adultos que en niños y afecta la línea mieloide. [4].

En el contexto de la LMA, la leucemia más prevalente entre adultos, que representa aproximadamente el 80% de los casos, se caracteriza por una expansión clonal maligna de células inmaduras llamadas 'blastos' en la médula ósea, que se pueden detectar en la sangre periférica. Esta eventualidad provoca eritropoyesis patológica, diferenciación aberrante y fallo de la médula ósea. Los tratamientos más recientes han mejorado las tasas de curación a alrededor del 15% en pacientes de 60 años y aproximadamente el 40% en pacientes menores de 60 años [5]. Respecto a lo anterior, el sistema global de vigilancia del cáncer [6] - un sistema mundial de vigilancia para rastrear las tendencias del cáncer - , ha informado una incidencia global significativa de 474,519 casos totales de *LMA*, entre los cuales se han identificado 67,784 en la región de América del Norte. Las tasas estandarizadas por edad [7] se registran consistentemente en aproximadamente 11 casos por cada 100,000 habitantes, reflejando la prevalencia de esta malignidad. [6].

## **II. Clasificaciones clásicas de la LMA**

Existen dos clasificaciones para la LMA: la French-American-British [1] y la generada en 2008 y actualizada en 2016 por la Organización Mundial de la Salud (OMS). La FAB se basa en la caracterización morfológica de las leucemias en base a parámetros tales como la histoquímica (HQ) e la inmunohistoquímica (IHQ). Se clasifica de M0 a M7 [8].

M0 corresponde a una LMA de mínima diferenciación, caracterizada por una reacción negativa a la peroxidasa y la presencia de dos o más marcadores mieloides según la citometría de flujo. También se asocia con anomalías cromosómicas complejas y un pronóstico pobre [9]. El subtipo M1 de LMA se caracteriza por

tener menos del 10% de promielocitos y una proporción más alta de formas mieloides maduras. Estas células blasto no contienen gránulos y a menudo tienen nucléolos distintos. Al menos el 3% de las células blasto son positivas para la mieloperoxidasa (Gen MPO). El subtipo M2 de LMA muestra maduración de células en etapas más avanzadas y comúnmente está asociado con la translocación favorable t(8;21) que genera las proteínas de fusión *LMA1-ETO* y/o *ETO-LMA1*, respectivamente [10]. La presencia de bastones de Auer en las células leucémicas también es típica [10].

La LMA tipo M3, o leucemia promielocítica aguda (APL), se caracteriza por la presencia difusa de granulocitos hipergranulados que también muestran en la mayoría de los casos granulación densa y un núcleo bilobulado. Este subtipo está estrechamente asociado con la translocación t(15;17) que resulta en la proteína de fusión *PML-RAR $\alpha$* , que tiene un pronóstico favorable, dado que el tratamiento *all trans retinoic acid* sumado con trióxido de arsénico ha demostrado alta efectividad [11] [12] [13] [13]

Por otra parte, la LMA M4, conocida como leucemia mielomonocítica aguda, se caracteriza por un exceso de monocitos y promonocitos en la médula ósea. Una variante de este subtipo, M4Eo, muestra eosinófilos anormales y está asociada con la anomalía citogenética inv(16), de un pronóstico favorable [8, 14] [15]. La, LMA M5, o leucemia monocítica, también se caracteriza por un alto número de células de linaje monocítico (80%), con la presencia adicional de al menos el 30% de células blasto en muestras de médula ósea (BM) o sangre periférica (PB). Está asociado con enfermedad extramedular y anomalías en el brazo largo del cromosoma 11 (11q). [16] y dependiendo de la mutación, del mal pronóstico.

El subtipo M6, también conocido como eritroleucemia, se caracteriza por una alta proporción (más del 50%) de células eritroides nucleadas en la médula ósea, que a menudo muestran anomalías severas en su desarrollo. Estas células eritroides muestran una fuerte positividad para ácido periódico de Schiff (PAS) y glicoforina A. [17, 18].

Por último, el subtipo LMA M7, también conocido como leucemia megacariocítica/megacarioblástica, exhibe una amplia variedad morfológica. La mayoría de las células son pequeñas con una diferenciación megacariocítica pobre, caracterizadas por un citoplasma escaso y núcleos con cromatina densa. Los megacarioblastos son negativos para esterasa de cloroacetato, Sudan Black B y peroxidasa. El diagnóstico se confirma mediante técnicas de inmunofenotipificación (CD41) o microscopía electrónica (peroxidasa plaquetaria) [19, 20].

Con el advenimiento de avances tecnológicos y una comprensión más profunda de los factores moleculares y genéticos que contribuyen al desarrollo y progresión de la LMA, la necesidad de una clasificación más completa y precisa se hizo evidente. Como respuesta a esta situación, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha desarrollado y actualizado una clasificación que incorpora información molecular, citogenética y clínica para una estratificación mejorada de los subtipos de LMA. [21-23] (tabla 1).

La clasificación de la OMS de la LMA se centra en la variabilidad genética, proporcionando una clasificación basada en translocaciones específicas y sus mutaciones asociadas. Esta clasificación también puede subdividirse según el pronóstico y las tasas de supervivencia, como el "Estado de riesgo". Por ejemplo, la presencia de NPM1 mutado indica un pronóstico favorable, mientras que FLT3-ITD se asocia con un pronóstico pobre y una supervivencia reducida. Además, la presencia de proteínas de fusión tales como *MLL-AF9* o *MLL-AF4*, se categoriza dentro de la clasificación de la OMS (ver Tabla 1) [8].

### **III. Variabilidad genética de la LMA**

La leucemia mieloide aguda, requiere una distinción meticulosa entre las líneas celulares linfoides y mieloides desde las etapas tempranas del proceso diagnóstico, especialmente debido a la significativa variabilidad genética que exhibe cada tipo de leucemia. En particular, un estudio que han empleado la secuenciación de ARN de células individuales (scRNA-seq) ha caracterizado la LMA y su microentorno en profundidad, perfilando 38,410 células de 40 muestras (16 pacientes con LMA, 5 donantes sanos). Un clasificador de aprendizaje automático distinguió tipos celulares malignos, correlacionados con mutaciones genéticas como FLT3-ITD, revelando significancia pronóstica en células LMA inmaduras. Se demostró que aparte de la expansión clonal de estas células inmaduras, las células LMA diferenciadas expresaron genes inmunomoduladores y suprimieron la actividad de células T in vitro, confiriendo nuevas funciones oncogénicas a las células de LMA diferenciadas, en la evasión del sistema inmune. [24]

El gen más comúnmente mutado en LMA es FLT3, activado en aproximadamente un tercio de los casos de LMA. [25] La presencia de duplicaciones tándem internas (ITDs) en el gen FLT3, y las mutaciones en los genes c-KIT, RAS, ASXL1 y WT1 se asocian con un pronóstico desfavorable. Por el contrario, al igual que las mutaciones en el gen CEBPA, las mutaciones en el gen NPM1, la segunda alteración genética más común en LMA, ocurren principalmente dentro del exón 12 y se vinculan con un pronóstico favorable [26] [27]. , Por otro lado, las mutaciones en los genes DNMT3A y TET2 indican un pronóstico intermedio de la misma manera que ocurre con las mutaciones en los genes IDH y RUNX1.

Es importante destacar que la prevalencia de estas mutaciones genéticas puede variar entre pacientes e incluso dentro de subclones del mismo tumor. Estas mutaciones genéticas son valiosos marcadores pronósticos y posibles objetivos para intervenciones terapéuticas en LMA. [28, 29] En particular, la translocación cromosómica t(9;11) que resulta en la proteína de fusión *MLL-AF9*, es una anomalía genética relativamente recurrente en la leucemia mieloide aguda que resulta en la fusión de los genes *MLLT3* y *MLL* (Leucemia de Línea de fusión *MLL-AF9* [30].

Subtipo	Anormalidad genética	Recuento de blastos}	Estado de riesgo
<b>LMA con anomalías genéticas definidas</b>			
LMA con mutación en RUNX1	RUNX1 mutado	≥10%	Alto riesgo
LMA con mutación en NPM1	NPM1 mutado	≥10%	Bajo riesgo
LMA con mutación en FLT3-TID	FLT3-TID mutado	≥10%	Alto riesgo
LMA Megacarioblástica con t(1;22)(p13.3;q13.1); RBM15-MKL1	t(1;22)(p13.3;q13.1)	≥10%	Alto riesgo
MLA con t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214	t(6;9)(p23;q34)	≥10%	Alto riesgo
Leucemia promielocítica aguda (LPC) con PML-RARA	t(15;17)(q22;q12)	≥10%	Bajo riesgo
LMA con t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1	t(8;21)(q22;q22)	≥10%	Riesgo intermedio
LMA con inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11	inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22)	≥10%	Bajo riesgo
LMA con t(9;11)(p22;q23); MLLT3-MLL	t(9;11)(p22;q23)	≥10%	Alto riesgo

LMA con inv(3)(q21.3q26.2) o t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM	inv(3)(q21.3q26.2) o t(3;3)(q21.3;q26.2)	≥10%	Alto riesgo
LMA con BCR-ABL1	t(9;22) (q34.1;q11.2)	≥20%	Alto riesgo
LMA con mutación bialélica en CEBPA	CEBPA mutado	≥10%	Bajo riesgo
<b>LMA asociada a mielodisplasia</b>			
Leucemia mielode aguda con otras anormalidades genéticas	> 3 mutaciones clonales cromosómicas		Alto riesgo

**Tabla 1.** Resumen de la clasificación otorgada por la OMS a los subtipos de LMA según sus características moleculares y nivel de riesgo

En el caso de las leucemias que presentan proteínas de fusión con pronóstico desfavorable tales como la *MLL-AF9*, actualmente hay pocos tratamientos disponibles que puedan dirigirse a estas proteínas de fusión. A diferencia de PML que dispone del tratamiento *all-trans Retinoic Acid + ATRA*, el mecanismo de acción de *MLL-AF9* permanece en investigación, incluyendo los mecanismos moleculares asociados. [31] [32, 33]. Hay que mencionar que las mayorías de las proteínas de fusión generadas por translocaciones presentan heterogeneidad a nivel de transcritos formados y/o proteínas de *splicing*.

#### **IV. Heterogeneidad en las proteínas de fusión *MLL-AF9* y su incidencia.**

Las reorganizaciones de MLL en leucemias infantiles representan entre el 70% y el 80%, mientras que la incidencia en pacientes adultos con LMA es del 10% al 15%, con un pronóstico desfavorable [34] [35]. En la clasificación de la OMS para la LMA, la translocación t(9;11)(p22;q23) que da origen a proteínas de fusión *MLL-AF9* exhibe una incidencia del 25% en la LMA *de novo* en niños [32]. Sin embargo, la ocurrencia de la LMA con reordenamiento MLL fue notablemente mayor en la LMA relacionada con la terapia (t-LMA) en comparación con la LMA *de novo* [36]. Por otro lado, entre los 80 posibles tipos de reordenamiento en LMA, la proteína de fusión AF9 fue la más común, apareciendo en un 25% a un 30% de los casos [37] [32]. Adicionalmente, los casos de LMA con reordenamientos de MLL muestran comúnmente diferenciación monocítica, correspondiente a morfologías de LMA-M4 o LMA-M5 de la clasificación FAB, en alrededor del

80% de los casos. Típicamente, la presencia de un reordenamiento *MLL-AF9* se relaciona con un pronóstico desfavorable en la LMA [33], en contraste con la translocación (15;17)(q22;q12) que causa Leucemia Promielocítica (APL) [38].

El reconocimiento de la presencia del gen de fusión *MLL-AF9* en la LMA es clínicamente significativo, ya que esta alteración genética puede influir en la selección del tratamiento y en el monitoreo de la respuesta terapéutica. En línea con lo anterior, los pacientes que presentan proteínas de fusión pueden requerir enfoques terapéuticos más agresivos y estrategias de tratamiento combinadas para mejorar los resultados y superar la resistencia a los tratamientos convencionales [39].

MLL corresponde a una proteína grande (431 kDa) codificada por el gen *KMT2A*, ubicado en el cromosoma 11q23 [40]. Este gen está sujeto a un proceso de clivaje intracelular por la proteasa Taspasa1 que resulta en el clivaje de MLL en dos subunidades: una subunidad N-terminal (MLL-N) y una subunidad C-terminal (MLL-C) [41]. MLL es un componente central del complejo MLL, que incluye al menos cuatro proteínas que ayudan a preparar la cromatina para una transcripción eficiente de genes críticos durante el desarrollo y la hematopoyesis (MLL, WDR5, RbBP5, ASH2L, entre otras) [42] [43] [44]. Además, MLL regula positivamente la expresión de los genes *HOX* mediante la metilación de lisina 4 en la histona H3 (H3K4) [45] [46].

AF9 es una proteína pequeña (63~ 88 kDa) codificada por el gen del Complejo de Superelongación Subunidad (MLLT3). Esta, es un regulador crucial de la hematopoyesis y juega un papel en el mantenimiento de la población de células madre o progenitoras hematopoyéticas (HSPC) [47] [48]. Además, desempeña un papel crucial en la regulación de la expresión génica al unirse a residuos de lisina 27 acetilados en la histona H3. Asimismo, la proteína AF9 puede unirse a la histona H3 acetilada para mejorar el reclutamiento de la metiltransferasa de lisina similar a la histona (DOT1L). La función de DOT1L es metilar residuos de lisina 79 en la histona H3. Esta metilación desencadena la remodelación de la cromatina, lo que lleva a la descompactación y promueve la transición de la heterocromatina a la eucromatina [49], activando la transcripción génica. DOT1L tiene tres motivos separados para la unión con AF9: sitio 1 (aa 628–653), sitio 2 (aa 863–878) y sitio 3 (aa 877–900), resueltos por resonancia magnética nuclear (NMR) [50].

En el contexto de la interacción entre AF9 y MLL, se ha observado que la unión de AF9 a la histona H3 acetilada permite que la enzima MLL se reclute a promotores génicos específicos que se encuentran en un estado de transcripción activo. Esto, a su vez, promueve la activación de los genes *HOX* [51].

Los genes **HOX** son factores de transcripción que actúan como reguladores maestros en el desarrollo del eje anteroposterior en varios organismos. Su expresión continua mantiene el estado indiferenciado de las células progenitoras, como los blastos en la LMA. Se ha informado que existen cuatro familias de genes HOX en mamíferos (HOXA, HOXB, HOXC y HOXD) [52] [53] [54]. La activación espacial de cualquier gen Hox está en gran medida fijada por su posición relativa dentro de su loci genómico. En vertebrados, estos loci génicos permanecen altamente condensados e inaccesibles desde las primeras etapas del cigoto hasta el inicio de la gastrulación, razón por la cual permanecen densamente compactados y no se expresan [55]. Por lo tanto, los genes Hox son expresados durante la embriogénesis, pero regulados a la baja durante la vida adulta, y se re-expresan en neoplasias. Este es el mecanismo clave de inicio de la LMA en adultos.

## **V. Tratamientos actuales de la Leucemia Mieloide Aguda que presenta la proteína de fusión *MLL-AF9***

El panorama genómico de la LMA se ha delimitado, revelando una inestabilidad genética infrecuente con un número limitado de mutaciones *driver* [56, 57]. Las mutaciones en genes que gobiernan la regulación epigenética son comunes, representando eventos tempranos en la iniciación de la LMA [57]. Aunque la subclasificación de la LMA tradicionalmente se basa en la morfología y la citogenética, los enfoques modernos integran análisis mutacionales específicos derivados de la secuenciación masiva de nueva generación [58, 59].

La LMA, al ser una enfermedad multifactorial, requiere un enfoque multidisciplinario para el tratamiento [60]. Típicamente, el tratamiento se desarrolla en dos etapas: inducción y consolidación [59]. La etapa de inducción puede requerir repetición antes del inicio de la consolidación. Investigaciones recientes exploran las muchas complejidades moleculares y celulares de la LMA, abarcando alteraciones genéticas y epigenéticas, el microambiente de la médula ósea y el *splicing* aberrante de varios oncogenes en LMA [24]. Una comprensión integral de estos mecanismos es crucial para el desarrollo de terapias dirigidas en beneficio de los pacientes con LMA [59].

Las opciones de tratamiento para la Leucemia Mieloide Aguda (LMA) exhiben variabilidad dependiendo del subtipo de LMA, la edad del paciente, la salud general, los factores pronósticos y la historia previa de quimioterapia para otros tipos de cáncer. Las estrategias de tratamiento para la LMA abarcan un espectro que va desde la quimioterapia de inducción intensiva estándar hasta terapias menos intensas o cuidados de soporte. La modalidad de tratamiento primario para la mayoría de los tipos de LMA implica quimioterapia,

a menudo combinada con un fármaco de terapia dirigida, seguida por un posterior trasplante de células madre [59] [61].

La quimioterapia constituye una vía terapéutica prevalente para la LMA, utilizando fármacos anticancerígenos para eliminar las células cancerosas. La administración de estos fármacos puede realizarse por vía intravenosa, subcutánea o en el fluido cerebroespinal, o por ingestión oral, con el objetivo de erradicar o controlar las células cancerosas. Estos fármacos circulan por el torrente sanguíneo, llevando a cabo una terapia sistémica para destruir las células cancerosas en todo el cuerpo [60]. El régimen habitual de quimioterapia para la LMA generalmente implica una combinación de citarabina y un fármaco antracíclico, como daunorubicina o idarubicina, administrados en ciclos de tratamiento. El protocolo 7+3 corresponde al tratamiento estándar en LMA e implica la administración continua de citarabina durante 7 días, seguida de la administración diaria de antracíclico durante 3 días [60] [61]. Otros fármacos de quimioterapia utilizados para la LMA pueden incluir cladribina, fludarabina, mitoxantrona, etopósido y tioguanina. Aunque la quimioterapia es el tratamiento principal para la LMA, se pueden considerar terapias alternativas según los casos individuales. Debido a los posibles efectos secundarios graves y a lo tóxico del tratamiento, la quimioterapia suele administrarse en un entorno hospitalario, lo que requiere una vigilancia cuidadosa del paciente durante el tratamiento [59].

Otras modalidades de tratamiento para la LMA incluyen la radioterapia, la cirugía y fármacos específicos para ciertos tipos de leucemia, tales como la leucemia promielocítica aguda (APL), que corresponde al tratamiento con ácido retinoico *all-trans* más trióxido de arsénico. Esta terapia ha probado ser efectiva en un 85% de los casos, con buen pronóstico, dado que el blanco de tratamiento bloquea directamente el mecanismo molecular asociado a la proteína de fusión PML-RAR $\alpha$  para generar transformación mieloide. Este es un caso muy particular y la mayoría del resto de las LMA se tratan con Terapia 7 + 3 independiente de la proteína de fusión. [62] [63]

A pesar de que la quimioterapia sigue siendo un tratamiento primario, existe un creciente interés en las terapias dirigidas [59]. Sin embargo, estas se utilizan frecuentemente como complemento a la quimioterapia estándar, especialmente en casos con mutaciones genéticas específicas [58]. Algunos tratamientos alternativos, como las inmunoterapias y las terapias génicas, todavía se encuentran en etapas tempranas de desarrollo o ensayos clínicos para la LMA [60] [61]. La escasez de datos sobre su eficacia y seguridad a largo plazo dificulta su adopción generalizada. La rápida progresión y la naturaleza agresiva de la LMA requieren una intervención rápida y potente. La quimioterapia a menudo resulta ser el método más efectivo para reducir rápidamente la carga de células leucémicas y lograr la remisión. En este sentido el desarrollo de tratamientos alternativos que se dirijan selectivamente a las células cancerosas mientras preservan las células sanas sigue siendo un desafío

formidable. La quimioterapia, a pesar de sus efectos secundarios, tiene la ventaja de dirigirse a células que se dividen rápidamente, una característica compartida por las células cancerosas [60] [61].

Si bien la quimioterapia sigue siendo el pilar del tratamiento de la LMA, los esfuerzos continuos de investigación tienen como objetivo identificar y desarrollar opciones terapéuticas más dirigidas y personalizadas. A medida que avanza nuestra comprensión de los aspectos moleculares y genéticos de la enfermedad, el panorama del tratamiento de la LMA puede evolucionar para integrar alternativas diversas y más efectivas. Sin embargo, la adopción de tratamientos alternativos como práctica estándar requiere pruebas clínicas rigurosas y posterior validación [57, 60].

La diversidad de mutaciones depende de varios factores, observando un aumento reciente en los casos de LMA después de terapias (tLMA), surgidos después de la exposición a agentes que dañan el ADN [61]. La fusión proteica *MLL-AF9*, originada a partir de una translocación entre el gen *MLL* en el cromosoma 11 y el gen *AF9* en el cromosoma 9, emerge como un driver pivotal, particularmente prevalente en tLMA relacionada con la terapia [39]. Funcionalmente, la fusión proteica *MLL-AF9* combina las propiedades de iniciación y elongación de la transcripción de las proteínas *MLL* y *AF9*, intensificando la activación de sus genes blanco [64]. Esta fusión proteica predomina en la LMA infantil, asociada particularmente con la LMA monocítica (clasificación FAB M5) [39] [64] [31].

La naturaleza oncogénica de la fusión proteica *MLL-AF9* se manifiesta principalmente en células mieloides o comprometidas con la línea mielóide río arriba [65]. Las estrategias terapéuticas actuales que buscan interferir directamente con las funciones de *MLL-AF9* enfrentan desafíos para encontrar fármacos contra las interacciones proteína-proteína y proteína-ADN, junto con la necesidad de preservar funciones vitales de las proteínas tipo salvaje [59].

## VI. La Importancia de los Factores EMT y los genes Zeb en el Riesgo y la Progresión de la LMA.

Las proteínas *ZEB* (Zinc finger E-box-binding) son una familia de factores de transcripción que desempeñan un papel crítico en la formación de muchos órganos y tejidos antes del nacimiento. Están involucradas en la regulación de la transición epitelial-mesenquimal (EMT por sus siglas en inglés) y la metástasis de las células cancerosas [66] [67] [68].

Sin embargo, en patologías malignas, las funciones de las familias *ZEB* no son obvias. Tanto *ZEB1* como *ZEB2* poseen un dominio de dedo de zinc amino-terminal (*NZF*) y un dominio de dedo de zinc carboxi-terminal (*CZF*) que se unen a secuencias de ADN en sus genes blanco (*E2-box*). Las proteínas *ZEB* pueden reclutar tanto al complejo correpresor (*CtBP*) para suprimir la transcripción, como, por el contrario, reclutar más complejos de transcripción para promoverla. Como resultado, los genes *ZEB1* y *ZEB2* han demostrado interacciones complejas que involucran sistemas compensatorios y funciones antagonistas [69] [70].

*ZEB1* juega un papel crucial en la modulación de los linfocitos T, particularmente en las células T CD4+. Niveles disminuidos de *ZEB1* se asocian con atrofia tímica, el desarrollo de leucemia linfoblástica aguda de células T y una reducción en la detención del ciclo celular mediada por la estimulación del ligando TGFβ1. Además, conduce a la regulación directa del inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina p21 [71].

Cuando los ligandos TGFβ1 activan quinasas que fosforilan proteínas *Smad*, estas proteínas *Smad* fosforiladas actúan en el núcleo como dímeros y trabajan en conjunto con *ZEB1* para detener el ciclo celular. En contraste, *ZEB2* actúa como un oncogén en estos casos, aumentando la expresión del receptor de interleucina-7 (IL7R) a través de la activación IL7R-JAK/STAT y promoviendo la progresión del ciclo celular [72] [73].

Además, las proteínas *ZEBs* tienen un Dominio de Unión *SMAD* (SBD) dentro del *NZF*. *ZEB1* colabora con las proteínas *SMAD* para mejorar la transcripción mediada por *SMAD*, mientras que *ZEB2* tiende a inhibirla. En consecuencia, sigue sin estar claro si las proteínas *ZEB* funcionan como un oncogén o como un supresor tumoral de forma global en los cánceres y parece ser que sus funciones como supresor de tumor u oncogén dependen del cáncer en cuestión. Sin embargo, esta distinción parece estar regulada por el reclutamiento específico de coactivadores o represores para *ZEB1* y *ZEB2* (tabla 2) [74].

**Tabla 2: Reguladores de los genes ZEB2 [72]**

	Co-activadores o Co-represores de ZEB2
Adhesión y quimiotaxis	<i>α4-integrina, CCR7, CXCR3, CXCR3R1, CXCR4, CXCR5, EPCAM, ITGB2</i>
Citoquinas específicas de linaje hematopoyético	<i>IL2, IL7R, IL15, IL6, G-CSF</i>

Tabla 2. Resumen de algunos de los factores más importantes en la regulación de ZEB 2 que se ha demostrado, pueden actuar como co-activadores o co-represores de su expresión.

Las proteínas ZEB originalmente se descubrieron por su función en el proceso de **transición epitelial-mesenquimal (EMT)**: Este proceso es impulsado por la disminución de los genes epiteliales responsables de la adhesión, la polaridad celular, la composición de la matriz extracelular y el citoesqueleto. Si bien es crucial para la plasticidad celular normal en el desarrollo embrionario, corresponde a un mecanismo común en la patogenia del cáncer. Por el contrario, una regulación al alza de los genes ZEB se correlaciona con la adquisición de propiedades y funciones de las células madre del cáncer (CSC), lo que hace que las CSC sean altamente variables y resistentes a los tratamientos convencionales contra el cáncer [75] [72] [35] [73].

Experimentos sugieren que ZEB2 es un blanco directo de la proteína de fusión MLL-AF9. Además, se ha demostrado que ZEB2 puede inhibir genes involucrados en la diferenciación mieloide, lo que conduce a un aumento de los blastos, **por ende, su inhibición mejoraría la progresión de la leucemia mieloide aguda (LMA)**. Todos esta evidencia sugiere que ZEB2 es un factor de transcripción responsable de controlar el compromiso y la fidelidad de las células de la médula ósea en el proceso de hematopoyesis [76].

**En conclusión, los genes ZEB pueden servir como nuevos reguladores de la proliferación y diferenciación en la hematopoyesis. Como posibles blancos terapéuticos, las proteínas ZEB ofrecen una estrategia prometedora para tratar la leucemia mieloide aguda [77].**

## **Hipótesis.**

La detección de mutaciones clonales en un modelo de leucemia mieloide aguda permitirá la correcta estratificación de los subtipos de leucemia mieloide aguda para descubrir nuevos blancos terapéuticos.

## **IV. Objetivos**

### **General:**

Desarrollar una metodología para priorizar mutaciones y genes alterados en Leucemia Mieloide Aguda (LMA) en base al uso de secuenciación masiva y/o técnicas de laboratorio.

### **Específicos:**

- 1) Verificar alteraciones moleculares obtenidas en LMA desde cDNA provenientes de bazo y/o médulas óseas de ratones con o sin Leucemia Mieloide Aguda, mediante bioinformática y el uso de diversos métodos moleculares.
- 2) Ensayar una alteración molecular del punto 1 en un modelo de LMA *in vivo*
  - 2.1) Obtención de un retrovirus *MLL-AF9* para infectar células madre hematopoyéticas de ratones CRISPR-Cas9 y transplantar ratones C57BL6 para generar LMA
  - 2.2) Utilizar el cDNA proveniente de tejidos del punto 2.1 para verificar genes del punto (1).
- 3) Analizar metástasis de las células leucémicas generadas en el modelo *in vivo* a lo largo de diversos tejidos.

## Metodología

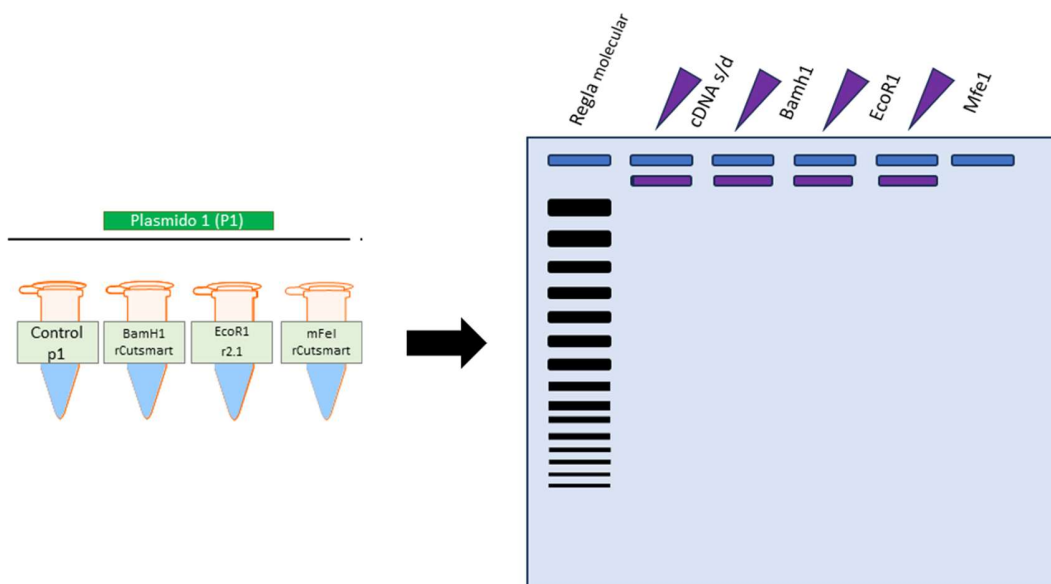
**Objetivo Específico 1:** Verificar alteraciones moleculares obtenidas en LMA desde cDNA provenientes de bazos y/o médulas óseas de ratones con o sin Leucemia Mieloide Aguda, mediante bioinformática y el uso de diversos métodos moleculares.

Verificación del plásmido que codifica para la proteína MLL-AF9 con el que se generaría LMA *in vivo*: Para la verificación del plásmido que codifica para la proteína MLL-AF9 con el que se generaría LMA *in vivo*, se realizó un gel de agarosa de 50mL y para esto fue utilizada agarosa marca winkler al 2% de concentración, para la intercalación de ADN fue utilizado 1uL de Saber safe y se dejó reposar por al menos 40 minutos para su solidificación.

Una vez solidificado el gel fue cargado en el primer carril una regla molecular de 1000pb y los carriles subsiguientes con ADN plasmidial purificado y digeridos con distintas enzimas de restricción durante 2 horas, todas las enzimas pertenecían a la marca Biolabs, tal y como se muestra en la **Figura 1**. También, fue utilizado buffer de carga color púrpura de marca Biolabs

Fue puesto en una cámara de electroforesis previamente rellena con buffer TAE 1X y se dejó correr durante 35 minutos a 90volts en corriente constante.

Finalmente la visualización fue realizada en un scanner de marca Diagenode.



**Figura 1.** Diagrama de carga del gel de agarosa que demuestra el corte con las enzimas se vizualizo con NebCutter: <https://nc3.neb.com/NEBcutter/>

El proceso de secuenciación fue llevado a cabo en la empresa GenomeQuebec en Canadá. Inicialmente, se evalúa la calidad e integridad del ADN plasmídico utilizando QC Bioanalyzer. Posteriormente, las lecturas de secuenciación obtenidas mediante tecnología Illumina son sometidas a una verificación de calidad con el software fastp en su configuración predeterminada. Una vez asegurada la calidad, se procede al ensamblaje del genoma con Unicycler. Las secuencias ensambladas son identificadas usando BLAST, y finalmente, se realiza la traducción de ADN a proteína mediante la herramienta online ExPasy Tools.

Generación de Leucemia Mieloide Aguda (LMA) en Ratones: Los ratones C57BL6 fueron utilizados para generar LMA. Esto se logró mediante la infección de células de médula ósea con un retrovirus que contenía el plásmido *MLL-AF9*. Las células infectadas se introdujeron en ratones para desarrollar la enfermedad.

Edición Genética mediante CRISPR-Cas9: Se utilizó la tecnología CRISPR-Cas9 para realizar cortes genéticos específicos en los ratones con LMA. Los ratones se dividieron en cuatro grupos basados en las modificaciones genéticas realizadas: a) Cre: sin modificaciones genéticas, b) Delección del gen *Zeb1*, c) Delección del gen *Zeb2*, y d) Delección de ambos genes, *Zeb1* y *Zeb2*. El corte de genes se indujo mediante la administración de Tamoxifeno.

Análisis del Plásmido *MLL-AF9-YFP*: Tras la secuenciación, identificación y traducción del plásmido, se realizó un análisis detallado del perfil de cobertura y anotación génica de los segmentos *MLL-AF9* y *YFP* presentes en el plásmido.

Secuenciación de RNA de Célula Única (Single Cell RNA-seq): Con las muestras de ratones modificados genéticamente, se realizó una secuenciación de RNA de célula única para evaluar el impacto de la delección de los genes *Zeb1* y *Zeb2* en el desarrollo de la LMA.

Análisis Bioinformático: Se llevó a cabo un análisis bioinformático en el que se alinearon las secuencias de las regiones críticas para la generación de LMA del plásmido *MLL-AF9* con la secuencia del plásmido mediante BLAST. El objetivo era identificar secuencias específicas de puntos de ruptura para dirigir los partidores (*primers*) hacia ellas.

Diseño y Validación de Partidores: Los partidores específicos fueron diseñados utilizando la herramienta Primer-Blast, posteriormente fueron sintetizados y finalmente validados mediante ensayos de qPCR para confirmar su especificidad y eficacia.

**Objetivo Específico 2:** Verificar y consolidar el modelo de generación de LMA “*in vivo*” mediante su replicación con y sin irradiación de médula ósea

Previo a la implementación de este modelo *in vivo*, es importante detallar que: a) se encargó un nuevo plásmido de *MLL-AF9 GFP* positivo, con el cual se generaron retrovirus y b) nuestro laboratorio llevó a cabo este protocolo sin irradiación de médula ósea, mientras que, en paralelo, otro laboratorio ejecutó exactamente el mismo protocolo, pero con irradiación de médula ósea. Ambos protocolos se basaron en el trabajo escrito por Jun Lu y colaboradores en el año 2022. [78]

### **Parte A: Generación de partículas retrovirales *MLL-AF9* desde células *HEK293* (Figura 3)**

**1. Cultivo celular:** Se realizó un cultivo celular sembrando células *HEK293T* en placas de cultivo de 100 mm a una densidad de  $2 \times 10^6$  células por placa. Se utilizó 7 mL de medio DMEM completo suplementado con 10% de FBS. Las placas se mantuvieron en una incubadora de CO<sub>2</sub> al 5% a 37 °C

**2. Generación y purificación de plásmidos *MLL-AF9 gag-POL* y pECO (Fig. 2):** Se seleccionaron dos tubos de bacterias *E. coli DH5 $\alpha$* , que se cultivaron en 400 mL de medio de cultivo cada uno. Se aseguró que al menos un 30% del volumen estuviera disponible para oxígeno y se incubaron en una estufa con agitación a 32 °C durante 16 horas. Posteriormente, se purificaron los plásmidos utilizando el protocolo de purificación de plásmidos MACHEREY-NAGEL maxi-prep, siguiendo los pasos a continuación:

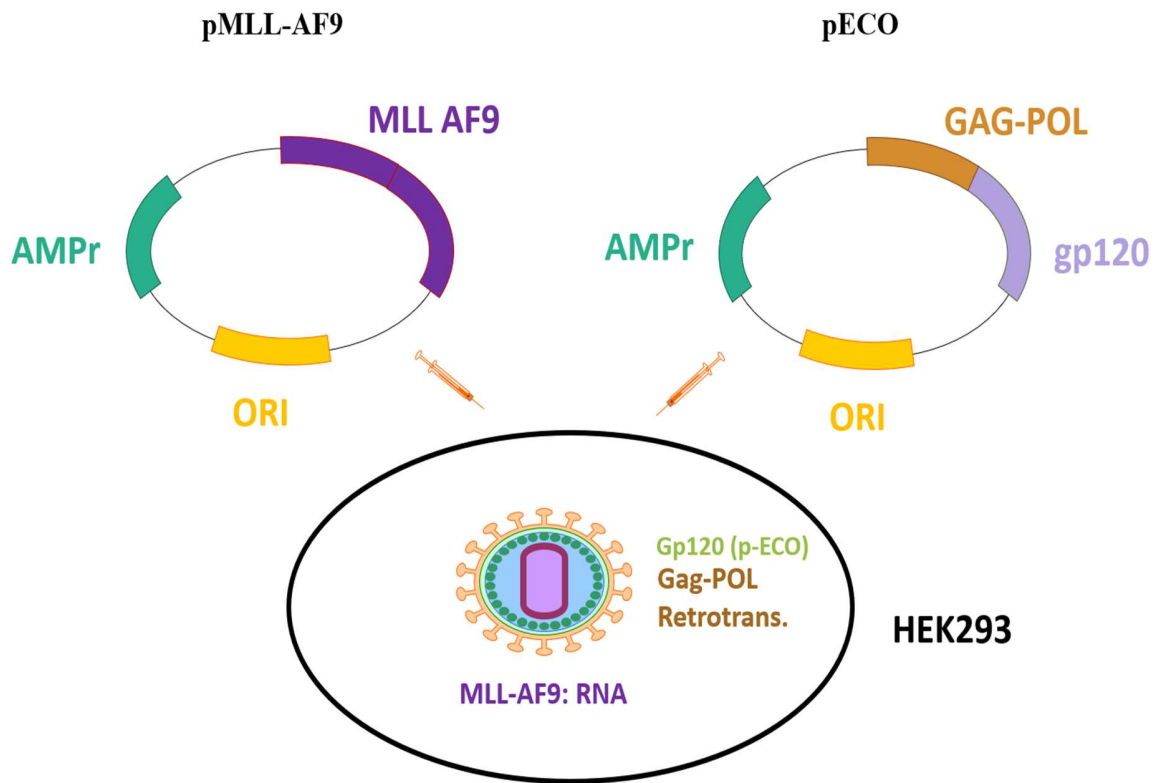
- a) Los cultivos bacterianos se centrifugaron durante 10 minutos a 7000 rpm. Los sedimentos resultantes se resuspendieron en 16 mL de buffer RES (usando vortex) y se procedió a su lisis con 16 mL de buffer de lisis, invirtiendo suavemente los recipientes de arriba abajo cinco veces. Tras una incubación de 5 minutos, se añadió el buffer Neu para neutralizar la mezcla, repitiendo la inversión de los recipientes las veces necesarias hasta aclarar las muestras.
- b) En paralelo, se prepararon las columnas (25 mL) con buffer Equ. Después de la neutralización, se clarificaron los lisados neutralizados centrifugándolos en tubos falcon de 50 mL durante 20 minutos a 10000 rpm. El sobrenadante obtenido se filtró a través de la columna y se lavó esta última con 15 mL de buffer Equ.
- c) Se eliminó el filtro y se lavó la columna con 25 mL de buffer Wash. (En este punto, se pudo desechar el tubo falcon, ya que los plásmidos se encontraban en la columna). Se eluyeron los plásmidos de la columna utilizando 15 mL de buffer ELU.
- d) Los plásmidos se precipitaron añadiendo 10.5 mL de isopropanol directamente al tubo falcon y se centrifugaron durante 40 minutos a 12000 rpm para obtener los sedimentos de plásmidos. Finalmente, los sedimentos se lavaron con etanol al 70%, se centrifugaron una última vez durante

5 minutos a 12000 rpm, se dejaron secar y se resuspendieron cada uno en 150 a 500  $\mu$ L de agua grado biología molecular, según la cantidad de sedimento.

- e) Este procedimiento se repitió varias veces hasta obtener suficiente cantidad de plásmido para la transfección. Además, cada plásmido fue validado mediante electroforesis en gel de agarosa.

**3. Transfección de plásmidos *MLL-AF9* en células *HEK293*:** Se utilizaron 18,2  $\mu$ L de plásmido *MLL-AF9*, 19  $\mu$ L de plásmido Gag-Pol y 20  $\mu$ L de plásmido pECO, mezclados con 300  $\mu$ L de DMEM sin suplementos y 30  $\mu$ L de p3000. Por otro lado, se preparó otra mezcla con 20  $\mu$ L de Lipofectamina 3000 y 100  $\mu$ L de DMEM, dejándola reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, el contenido del segundo tubo se combinó con el del primero, añadiéndose gota a gota en el centro de las placas de cultivo con una pipeta P200. Las placas se incubaron luego a 37 °C. Tras 24 horas, se añadió polibreno a una concentración final de 10  $\mu$ L por placa. Este procedimiento se repitió diariamente durante cuatro días.

**4. Purificación de virus generados en la transfección:** Se utilizó un buffer TNE con un 10% p/v de sacarosa (marca Great Value). Primero, el medio que contenía los virus se filtró a través de un filtro de 0.45  $\mu$ m para eliminar el exceso de células muertas. Luego, con mucho cuidado, se añadieron 10 mL del buffer TNE-sacarosa a un tubo falcon. Luego, de manera gradual, se vertieron 10 mL del medio que contenía los virus sobre el buffer TNE-sacarosa, inclinando el tubo falcon a un ángulo de 45° para que el medio con los virus se depositara cuidadosamente sobre la capa de buffer-sacarosa, formando dos fases claramente diferenciadas. Finalmente, el tubo falcon se centrifugó durante 5 horas a 10,000 rpm y se desechó el sobrenadante y se recolectaron los virus (pellet). Este procedimiento se repitió las veces que fueran necesarias hasta obtener la cantidad deseada de virus.



**Figura 2.** Representación esquemática de la generación de un retrovirus *MLL-AF9* *in vitro*, transfectando los plásmidos *pMLL-AF9* y *pEco* en células *HEK293*. El plásmido *pMLL-AF9* contiene la proteína de fusión *MLL-AF9* y el plásmido *pEco* contiene la retrotranscriptasa (*gag-pol*) y la proteína de la cápside del retrovirus.

## **Parte B: Generación de modelo *in vivo* para generar células LMA con expresión de *GFP*: *Spinoculación***

A) Se utilizaron siete ratones hembra C57BL6/J de 8 semanas de edad, que expresan constitutivamente las proteínas CRISPR Cas9 y *EGFP*, denominados CRISPR-Cas9 B6(C)-Gt(RSA)26Soreml.1(CAG-cas9\*,*-EGFP*)Rsky/J (Figura 4). Para generar una ablación parcial de la médula ósea en los ratones, se les inyectó intraperitonealmente una solución de 5-Fluorouracilo a una concentración de 150 mg/kg por animal. La evidencia bibliográfica indica que, tras 24 horas de tratamiento, se induce una disminución del 80% de las células formadoras de colonias en la médula ósea, efecto que se intensifica durante los días de tratamiento hasta un máximo de seis días. En un experimento paralelo, después de este paso, los ratones fueron irradiados.

B) Se sacrificaron de dos en dos para su procesamiento. Primero se anestesiaron con isofluorano y luego se les aplicó dislocación cervical. Después del sacrificio, se abrieron los animales desde la parte inferior del peritoneo utilizando tijeras y pinzas. Se separó la piel de los muslos y se cortaron los huesos de la cadera de ambos lados de las patas, manteniéndolos lo más intactos posible, para luego limpiar los huesos del tren inferior con un par de pinzas y tijeras.

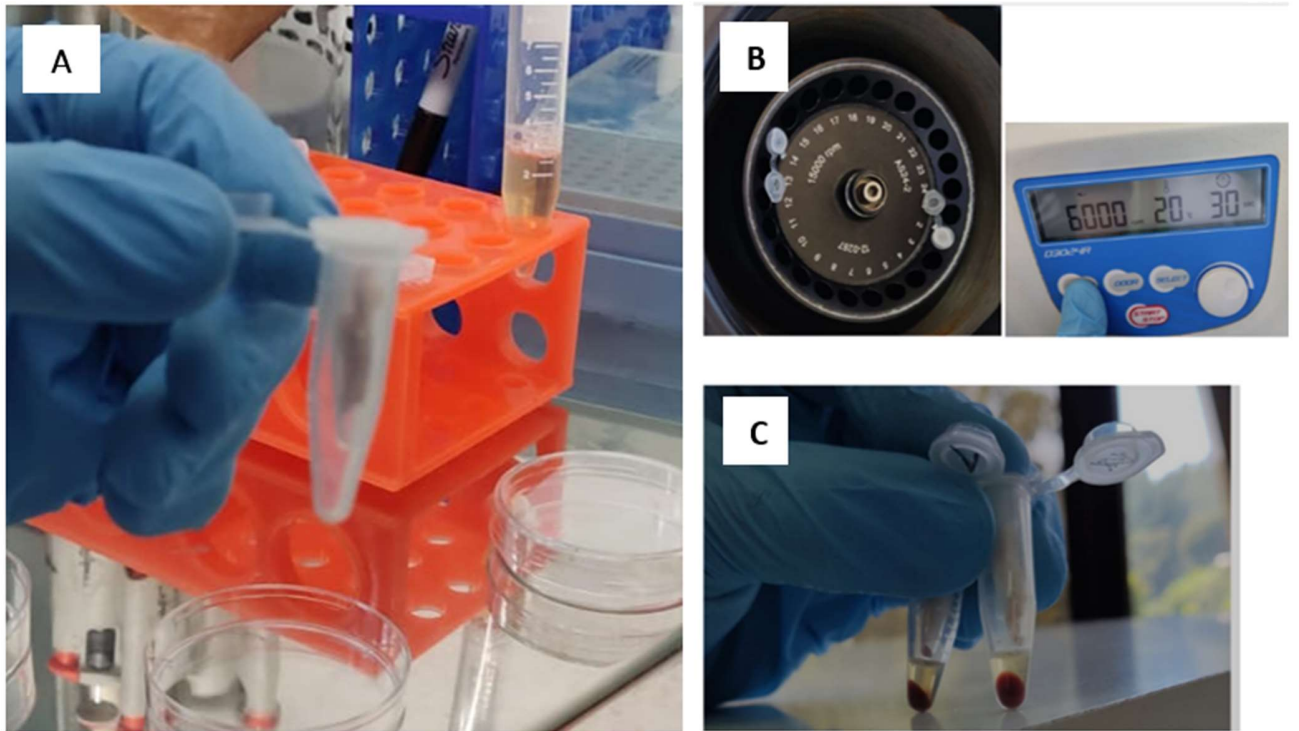
C) Paralelamente, se perforó la base de tubos eppendorf de 0.6 mL con una aguja de jeringa de 23 g (preferentemente) y se colocaron en un eppendorf de 1.5 mL con 300  $\mu$ L de FBS.

D) Una vez limpios los huesos (tibias, crestas ilíacas y fémures), se les realizó un corte entre la diáfisis y la epífisis, y se colocaron aproximadamente tres en cada tubo eppendorf de 0.6 mL. Luego se realizó una centrifugación durante 1 minuto a 8500 rpm (Figura 3).

E) Después de la centrifugación, las células de la médula ósea se recogieron de los eppendorfs (Figura 3) y se sembraron en frascos T25 con medio R20/20 (iMEM 50%, DMEM 50%, FCS 10%, IL6 a 5 ng por 10 ml de medio, SCF a 20 ng por 5 mL de medio e IL3 a 5 ng por 10 ml de medio). La infección con el virus se realizó aproximadamente 24 horas después.

F) Para la infección con retrovirus, se utilizaron seis eppendorfs con virus para infectar tres frascos T25 con células de médula ósea. Se combinó el medio de los tres frascos y se centrifugó durante 5 minutos a 1000 rpm. Después, se eliminó el sobrenadante y se añadió medio DMEM con virus. El volumen total se dividió entre los

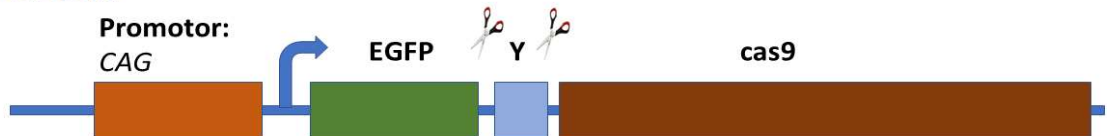
tres T25, añadiendo 4 mL de medio a cada uno. Finalmente, estas células fueron sometidas a "spinnoculation" durante 1 hora a 1500 rpm para completar la infección.



**Figura 3.** A) C57BL6/J CRISPR huesos largos de ratones C57BL6/J CRISPR cas9 depositados en los eppendorf antes del spin B) Centrifuga para eppendorf utilizada en el spin C) Células de la médula ósea extraídas en SFB dentro del tubo eppendorf de 1.5mL

*CRISPR-Cas9 B6(C)-Gt(RSA)26Sorem1.1(CAG-cas9\*, -EGFP)Rsky/J*

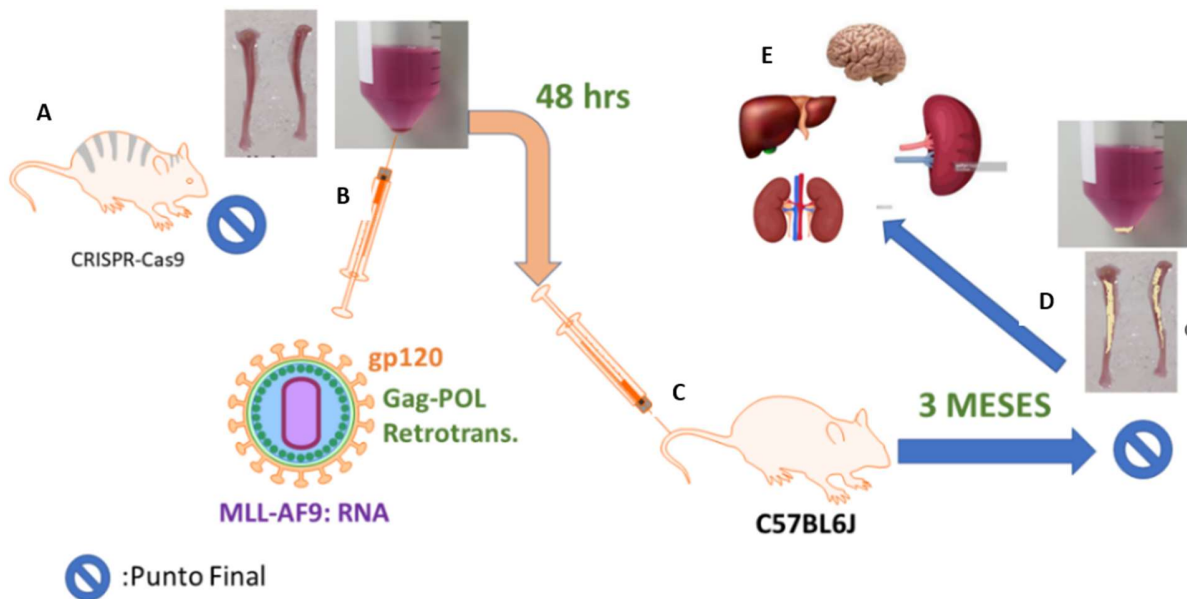
**Rosa26 Locus:**



**Figura 4.** Representación de locus Rosa26 en los ratones C57BL6J-CRISPR-Cas9 (Donantes). Un promotor Fuerte (CAG) lleva expresión constitutiva de EGFP y Cas9. El péptido de insecto "Y" hace que después de la traducción, EGFP se *clive* de Cas9 para que Cas9 adquiera mayor estabilidad y los gRNA guías puedan unirse a la proteína de forma efectiva.

## Parte C: Monitoreo de los animales

- A) Los ratones que se utilizaron como donantes de médula ósea fueron sacrificados a más tardar el quinto día después de recibir la inyección de 5-Fluorouracilo. Se evaluó diariamente el estado de los animales. Para prevenir infecciones, el agua fue acidificada y se administraron paracetamol intravenoso y/o antiinflamatorios no esteroides (AINEs) basados en los signos de dolor que presentaron los animales, tales como disminución del movimiento, postura encorvada, pelaje descuidado, reducción repentina en la ingesta de alimentos y agua, o estrabismo [79, 80]. Como recompensa, se les ofreció a los animales puré suave (nutri-gel).
- B) Se utilizaron diez hembras C57BL6/J *wild type* como receptoras de células de médula ósea infectadas con *MLL-AF9*. El trasplante se llevó a cabo mediante una inyección intravenosa en la vena de la cola, usando una jeringa de 27 Gauge que contenía 200  $\mu$ L del medio con las células infectadas. Los animales fueron inmovilizados usando un dispositivo restrainer y se limpió previamente la cola con etanol para evitar contaminaciones. Después del procedimiento, se suministró a los animales agua acidificada con ácido clorhídrico a un pH de 2.5-3.0. [Hall, White et al. 1980] [Tober-Meyer and Bieniek 1981] [Blaser and Luthy 1988].
- C) La leucemia mieloide aguda se monitoreó mediante el conteo de blastos en extendidos de sangre periférica de los ratones C57BL6/J, utilizando tinción Giemsa. Cuando la cantidad de blastos excedió el 2% de las células sanguíneas, se procedió al sacrificio de los animales por dislocación cervical. La extracción de sangre se realizó según el protocolo descrito, que consiste en la extracción de sangre mediante venopunción en la vena safena sin anestesia, con ayuda veterinaria. Las tomas de sangre se realizaron a las dos semanas post-trasplante, al mes post-trasplante y, posteriormente, cada dos semanas.



Mod. de [STAR Protoc.](#) 2022 Sep 16; 3(3): 101559. Published online 2022 Jul 18. doi: [10.1016/j.xpro.2022.101559](https://doi.org/10.1016/j.xpro.2022.101559)

**Figura 5.** Flujograma de trabajo que esquematiza: A) extracción de las células de la médula ósea de los ratones CRISPR-Cas9 que expresan constitutivamente *EGFP* y Cas9. B) la infección de estas células previamente recolectadas de la médula de los huesos largos de los ratones por el retrovirus MLL.AF9 mediante *spinoculation*. C) Inyección de las células de la médula del ratón CRISPR-Cas9 ya infectadas con el retrovirus en los ratones C57BL/6J *wild type*. D) extracción de los huesos largos y posteriormente también, las células de la médula ósea para ser analizadas mediante métodos moleculares. E) estudio histo-morfológico de tejidos como Bazo, Riñón, pulmones, hígado y cerebro.

**Objetivo específico 3:** Analizar la metástasis de células leucémicas generadas en un modelo *in vivo* a través de varios tejidos.

Para evaluar la diseminación de células leucémicas y su impacto en diversos órganos, se extrajeron bazo, hígado y huesos de ratones del modelo *in vivo*. Se sometieron a análisis mediante inmunohistoquímica para identificar la presencia y distribución de células leucémicas. Además, se aplicaron técnicas de histoquímica clásica, incluyendo la tinción de Giemsa y la hematoxilina y eosina (H&E), para evaluar morfológicamente los tejidos y detectar posibles alteraciones estructurales asociadas a la infiltración leucémica. Este enfoque permitió una evaluación detallada de la extensión de la metástasis leucémica y su efecto en los tejidos examinados.

### **Protocolo de Extracción/Fijación de tejidos**

Punto final a ratones C57bl6J wild type

- 1.- Los ratones se adormecieron con isoflurano en una cámara cerrada
- 2.- inyección intraperitoneal de ketamina/xilacina (50/50) y se esperó unos minutos que el ratón se anestesiará completamente.
- 3.- posicionamiento del animal en una tabla (boca arriba), sellando sus extremidades con “tipe o cinta” en posición de supinación.
- 4.- remoción del pelaje con tijeras
- 5.- remoción de la piel, en conjunto con la grasa y la musculatura abdominal exponiendo los órganos de la caja torácica
- 6.- Introducción de la bomba de PBS inyectada directamente en el ventrículo izquierdo (sin inocular el PBS)
- 7.- Se realizó un pequeño corte en la aurícula derecha.
- 8.- comenzar a perfundir el PBS (muy lentamente) a través de la bomba hasta terminar los 50mL
- 9.- cambiar la bomba de PBS por una de PFA al 1% (o 4%)
- 10.- comenzar a perfundir el PFA 1% a través de la bomba, observando que el hígado comience a tornarse menos rojizo y más blanquecino.

11.- Si el fijador se perfundió bien (hígado aclarado, goteo de PFA por la nariz del ratón, levantamiento de la cola) proceder con la extracción de los órganos objetivos

12.- Si el fijador no se perfundió completamente bien, inocular 50mL más de PFA al 1%

13.- extracción de órganos: cerebro, hígado, bazo y médula ósea

14.- El hígado, bazo y riñones fueron almacenados en tubos de 50mL con PFA al 4% en una proporción de diez veces más volumen de fijador que el volumen de los tejidos (1:10). Por (al menos) 24 horas, antes de ser embebidos en parafina para la construcción de un taco histológico.

En el caso de las médulas, Se realizó también un protocolo para extraer células provenientes de médula ósea aisladas para generar extendidos.

#### **Protocolo para la extracción de células aisladas de médula ósea**

1.- Extracción de los huesos largos previamente fijados por perfusión

2.- Eliminación del tejido muscular que rodea el músculo utilizando pinzas y/o tijeras para descarnar

3.- Corte del hueso largo entre la epífisis y la diáfisis para exponer la médula

4.- dejar los huesos con el corte en un tubo de 0,6mL en el que previamente se realizó un agujero con jeringa

5.- depositar los tubos de 0,6mL en tubos de 1,5mL

6.- centrifugar los tubos

7.- generar un extendido con las células extraídas de la médula ósea

Los huesos fueron descalcificados previo a su inclusión en parafina, para esto fueron sumergidos en EDTA ph 8.0 durante 4 días en el caso de las muestras de Canadá y ácido nítrico al 5% durante 3 días en el caso de los controles negativos.

Las tinciones utilizadas para el estudio histológico fueron Hematoxilina eosina para las médulas óseas/ bazo e hígados, y Giemsa para médulas óseas y extendido celular proveniente de médula ósea. Además, se realizó un protocolo de Inmunohistoquímica cromogénica para los anticuerpos CD3, BCL6 y CD34.

Los cortes fueron realizados con un micrótopo y variaron de los 3 a las 7 micras dependiendo del tejido

### **Protocolo de tinción de H/E**

Para el h/e fue utilizado el equipo automatizado que cumple con el siguiente proceso

- 1.- Desparafinación de muestras
- 2.- Tinción con hematoxilina de Harris
- 3.- Azulamiento nuclear
- 4.- Tinción con eosina
- 5.- Deshidratación de los cortes
- 6.- Aclaración en xilol
- 7.- Montaje con resina/entellan

### **Protocolo para tinción de Giemsa para cortes histológicos**

- 1.- Desparafinación de las muestras
- 2.- Sumergir en solución de Giemsa marca Merk al 25% por 10 minutos
- 3.- Diferenciar en agua acetificada al 10% con 3 inmersiones y rápidamente detener la reacción con agua corriente para controlar al microscopio (repetir el proceso hasta obtener la coloración deseada)
- 4.- deshidratación en alcohol isopropílico
- 5.- aclarar en xilol y montar con resina.

### **Protocolo para tinción de Giemsa extendido histológico**

- 1.- Fijar las células sumergiendo los extendidos en metanol frío (-4°C) durante al menos 8 minutos
- 2.- Sumergir las muestras en solución de Giemsa marca Merk al 25% por 10 minutos
- 3.- Diferenciar en agua acetificada con 3 inmersiones y rápidamente detener la reacción con agua corriente para controlar al microscopio (repetir el proceso hasta obtener la coloración deseada)
- 4.- deshidratación en alcohol isopropílico
- 5.- aclarar en xilol y montar con resina.

### **Protocolo de Inmunohistoquímica cromogénica.**

Las IHQ fueron realizadas con el equipo automatizado Ventana-benchmark cada anticuerpo se diluyó 1:500 y la tinción nuclear se realizó (dentro del mismo equipo) con hematoxilina de Harris.

Para la extracción de células aisladas de médula ósea, se retiraron los huesos largos fijados por perfusión y se despejó el tejido muscular adyacente. Luego se realizó un corte entre la epífisis y la diáfisis para exponer la médula ósea, se colocaron los huesos con el corte hacia abajo en un tubo de 0,6 mL perforado y se depositaron en tubos de 1,5mL para ser centrifugados y recuperar las células de médula ósea, las cuales se utilizaron para preparar extendidos citológicos.

Los huesos se descalcificaron previamente a su inclusión en parafina, sumergiéndolos en EDTA pH 8.0 durante cuatro días o ácido nítrico al 5% durante tres días.

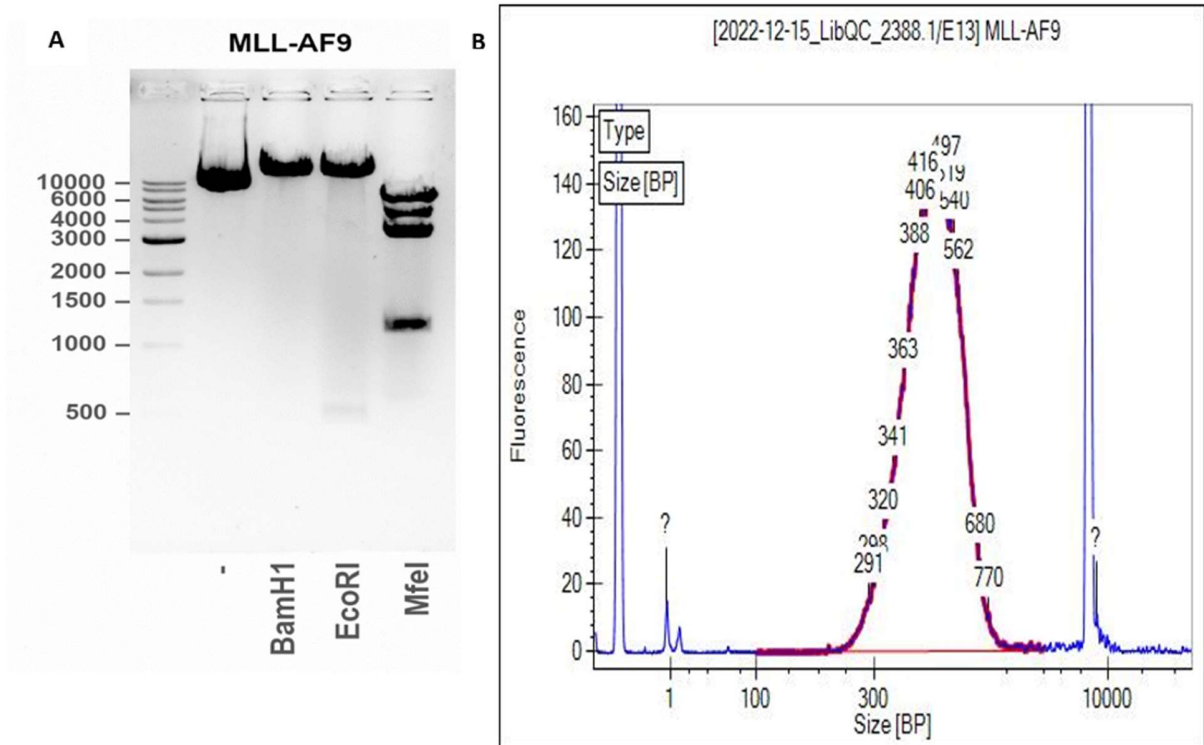
Las tinciones utilizadas para el análisis histológico incluyeron Hematoxilina y Eosina para la visualización de médulas óseas, bazo e hígados, mientras que la tinción de Giemsa se aplicó a médulas óseas y extendidos celulares. Se llevó a cabo un protocolo de inmunohistoquímica cromogénica para la detección de los anticuerpos *CD3*, *BCL6* y *CD34*, utilizando el equipo automatizado Ventana-benchmark para cada anticuerpo diluido 1:500 (en el buffer comercial ventana) y la tinción nuclear con hematoxilina de Harris.

## **Resultados**

**Resultados de objetivo Específico 1:** Verificar mutaciones obtenidas en LMA desde cDNA provenientes de bazos y/o médulas óseas de ratones con o sin Leucemia Mieloide Aguda, mediante bioinformática y el uso de diversos métodos moleculares.

### **Verificación y caracterización del plásmido *MLL-AF9* Asociado a *YFP***

Se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 2% para verificar la presencia del plásmido *MLL-AF9* fusionado a *GFP* de 11.500 pares de bases de tamaño, utilizado en la generación de retrovirus para el modelo *in vivo* de LMA, antes del inicio de esta tesis. Tras la digestión con la enzima EcoR1, se observó una banda inespecífica de 500 pares de bases y, en el carril adyacente, múltiples bandas que sumaban entre 13.000 y 14.000 pares de bases (**Figura 6A**). Esto hizo necesaria la caracterización mediante electroforesis capilar para identificar estas secuencias dudosas (**Figura 6B**). Como resultado, se descubrió que estas secuencias correspondían a la proteína amarilla fluorescente (*YFP*) en lugar de la verde fluorescente (*GFP*). Por consiguiente, el ADN de los ratones C57BL6 *wild type* con LMA inducida en Canadá, utilizado previamente a la elaboración de esta tesis, contenía la proteína *YFP* y no *GFP*. Así, los resultados presentados en las Figuras 7 y 8, que se basaron en este ADN, muestran la presencia de la proteína *YFP* en lugar de *GFP*.

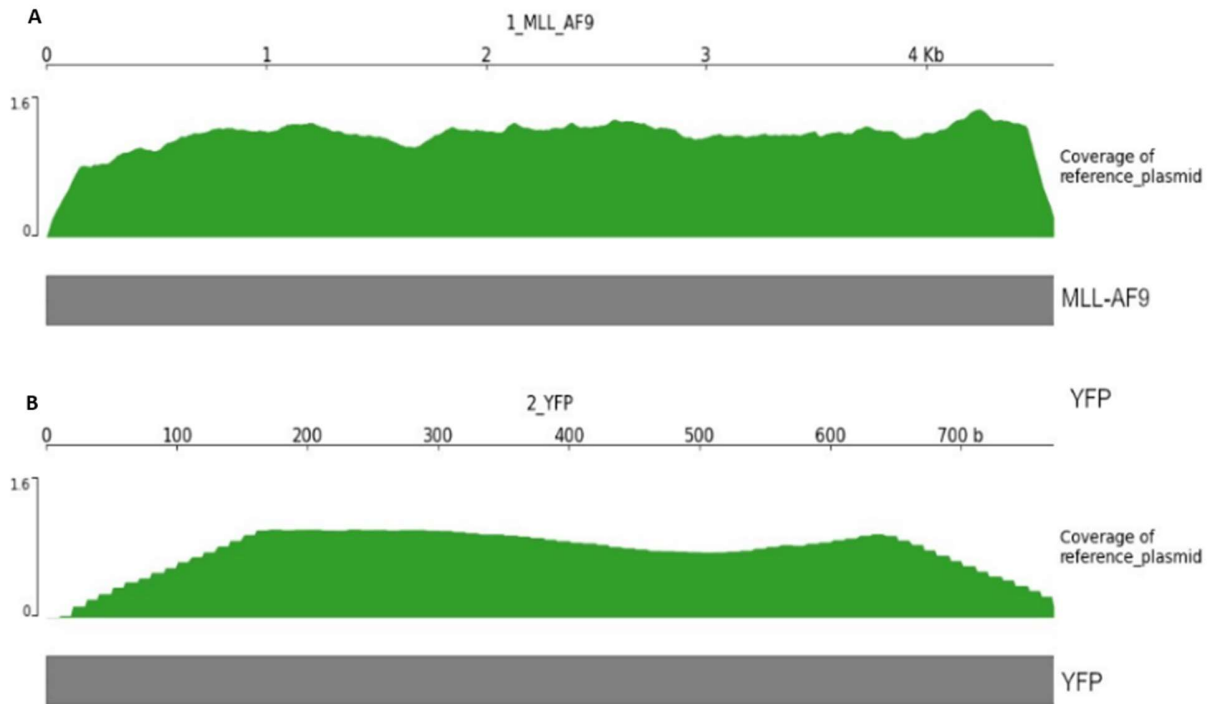


**Figura 6. Análisis electroforético del plásmido *MLL-AF9***

A) Electroforesis en gel de agarosa al 2% mostrando el plásmido *MLL-AF9* de 11,150 pares de bases (pb). El primer carril corresponde al plásmido sin digerir; el segundo, al plásmido linealizado tras la digestión con la enzima BamHI; en el tercer carril, después de la digestión con EcoRI, se observa una banda inespecífica de 500 pb; y el cuarto carril revela múltiples bandas de origen incierto tras el corte con MfeI.

B) Resultados de la electroforesis capilar fluorescente realizada después del ensamblaje del plásmido *MLL-AF9* a partir de datos de Illumina QC Bioanalyzer. Se compara la intensidad de fluorescencia en el eje X con el tamaño en pares de bases en el eje Y, indicando que el tamaño más frecuente de las secuencias es de 497 pb, con un total de 55,092,783 lecturas, un puntaje Phred de 36 y un porcentaje de secuencias duplicadas del 77.076%.

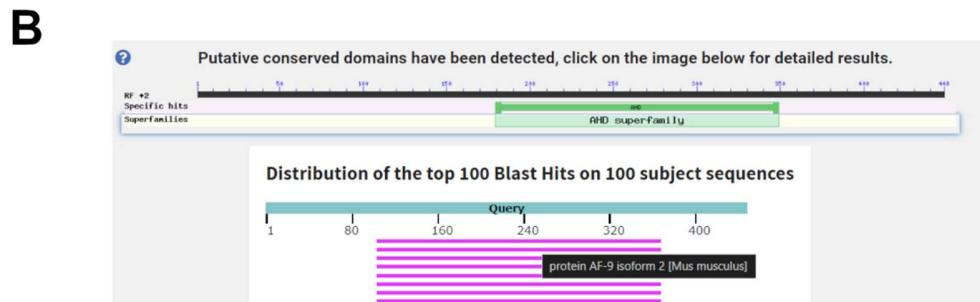
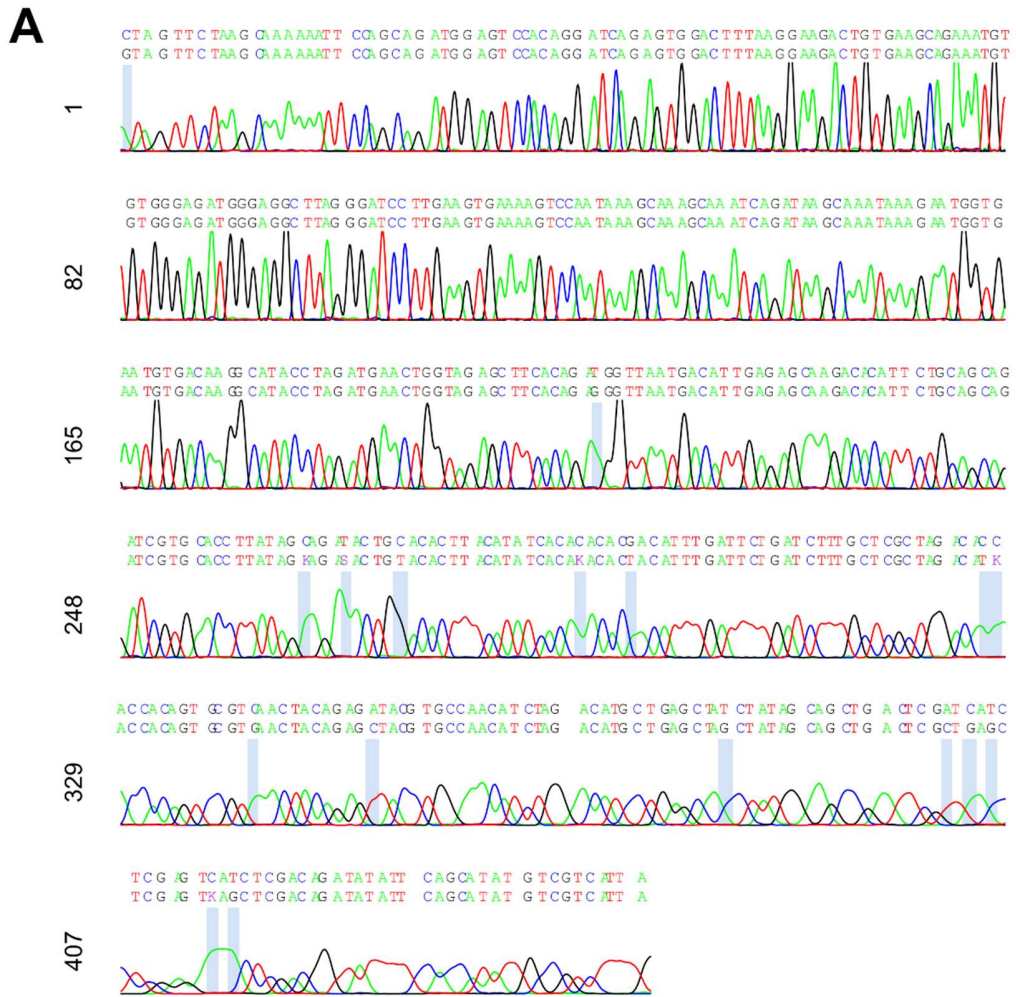
La Figura 7 se obtuvo al alinear lecturas de RNA-seq, utilizando kits TruSeq de Illumina, provenientes de células leucémicas c-kit positivas contra el plásmido ensamblado *MLL-AF9-YFP*. Este proceso permitió la evaluación precisa de la cobertura y expresión de las proteínas *MLL-AF9* y *YFP*, demostrando un ensamblaje completo del 100% para ambas proteínas. Se destaca una proporción de 2:1 de *MLL-AF9* respecto a *YFP*. Los análisis subsecuentes de célula única revelaron que la expresión de *MLL-AF9* es mayor que la de *YFP*, lo cual se refleja en la escala colorimétrica de las Figuras 8A a 8D, corroborando los resultados de cobertura de la Figura 7 y enfatizando la relevancia de alinear las secuencias de RNA-seq con el plásmido ensamblado para una caracterización detallada.



**Figura 7. Análisis de cobertura y anotación génica de los segmentos *MLL-AF9* y *YFP* en el plásmido *MLL-AF9-YFP*, basado en lecturas de RNA-seq TruSeq de Illumina de células leucémicas c-kit positivas, alineadas contra el plásmido ensamblado.** Este análisis se realizó utilizando la herramienta pyGenomeTracks en Python usando como input los archivos BAM conteniendo las lecturas de RNA-seq alineadas.

A) El segmento correspondiente a la proteína *MLL-AF9* muestra una cobertura total, evidenciando un ensamblaje completo al 100%. Además, se destaca una proporción de 2X en comparación con *YFP*.

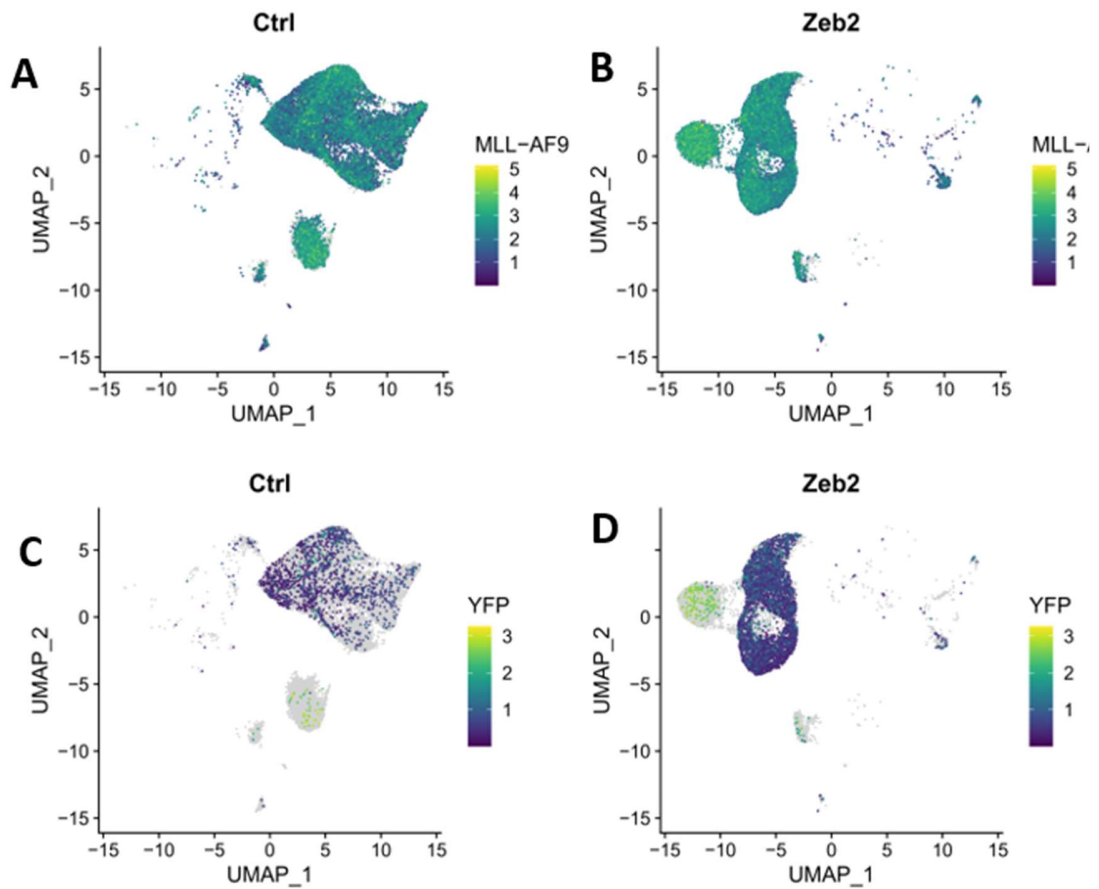
B) El segmento de la proteína *YFP* también presenta una cobertura completa, lo que indica un ensamblaje al 100%. La proporción de *YFP* se mantiene en 1X en relación con *MLL-AF9*, reflejando la diferencia en la expresión de ambas proteínas en las células analizadas.



**Figura 8: Resultados de secuenciación Sanger y análisis de dominios conservados del plásmido *MLL-AF9-YFP*.**

A) Cromatograma de la secuenciación Sanger mostrando la lectura de bases nucleotídicas (A, T, C, G) con su correspondiente color. Se presentan distintas secciones del cromatograma, cada una con una numeración que indica la posición de la base en la secuencia. Las áreas sombreadas indican SNPs y los picos indican la calidad de la llamada de bases en diferentes puntos de la secuencia.

B) Análisis bioinformático de la secuencia obtenida, donde se ilustran los dominios conservados detectados, representados en la barra superior con marcas y letras que indican la familia de proteínas o dominios funcionales identificados por BLASTX. El gráfico de barras muestra la distribución de los primeros 100 mejores hits de BLASTX, destacando la homología con la proteína AF-9 isoforma 2 de *Mus musculus*. En el caso del gen AF9, la porción de la proteína AF9 murina mostrada tiene 100% de homología con la proteína AF9 humana.



**Figura 9.** Análisis de expresión de los segmentos *MLL-AF9* y *YFP* en células de médula ósea *MLL-AF9+* de ratones C57BL6, utilizando single cell RNA-seq. A través de un análisis de visualización k-nearest-neighbor, se exploraron las tendencias de diferenciación celular y la expresión de los transcritos que codifican para las proteínas *MLL-AF9* e *YFP* bajo distintas condiciones: A) La expresión de *MLL-AF9* se observa con intensidades entre 2 y 4 en la escala colorimétrica, agrupando las células principalmente cerca del centro, en los cuadrantes superiores con una ligera inclinación hacia la derecha. B) Tras la delección de *Zeb2*, la expresión de *MLL-AF9* se mantiene en el rango de 2 a 4 en la escala colorimétrica, pero las células tienden a diferenciarse hacia el cuadrante superior izquierdo. C) La expresión de *YFP* muestra intensidades de 0 a 2 en la escala colorimétrica, con células agrupadas cerca del centro de los cuadrantes superiores, similar a la observación sin delección. D) Con la delección de *Zeb2*, la expresión de *YFP*, también en un rango de 0 a 2 en la escala colorimétrica, muestra una tendencia de diferenciación hacia el cuadrante superior izquierdo, alineándose con la tendencia observada para *MLL-AF9* bajo la misma condición.

El análisis detallado del gráfico de single cell, que muestra la expresión de los segmentos *MLL-AF9* y *YFP* en células de médula ósea de ratones C57BL6 (**Figura 9**), fue posible gracias a la secuenciación previa del plásmido *MLL-AF9-YFP* (**Figura 8**). La inclusión de esta secuencia como referencia adicional en el análisis permitió alinear con precisión las lecturas de single cell RNA-seq contra el genoma de ratón, enriquecido con la secuencia del plásmido. Este enfoque fue crucial para identificar las células infectadas por el retrovirus *MLL-AF9*.

Para el diseño de partidores específicos que se enfocan en el punto de ruptura entre los genes *MLL* y *AF9*, así como para la creación de nuestro modelo *in vivo* para el objetivo número 2, fue necesario comenzar con la secuenciación y validación de nuestro plásmido *MLL-AF9* fusionado a *GFP* (**Figura 10**). Después de obtener la secuencia, se procedió a traducirla a una secuencia de aminoácidos usando la herramienta ExPasy Tools (translate DNA → Protein). Los detalles de esta traducción se pueden ver en la Figura 11, donde se destaca la localización del punto de ruptura. Este paso en el diseño de los *primers* asegura la especificidad para la detección y cuantificación del transgén *MLL-AF9* en nuestras muestras de *LMA*.

## Diseño de partidores específicos para *MLL-AF9*

### Secuencia de aminoácidos *MLL-AF9*

```
MDYKDDDDKGNANMAHSCRWRFPARPGTTGGGGGGRRGLGGAPRQRPALLLPPGPPVGGGGPG
APPSPPAVAAAAAAGSSGAGVPGGAAAASAASSSSASSSSSSSSASSGPALLRVGPGFDAALQVSAAI
GTNLRRFRAVFGESGGGGGSGEDEQFLGFGSDEEVVRVRSPTRSPSVKTSRKPGRGRPSGSDRNSAILSDP
SVFSPLNKSETKSGDKIKKKKDSKSIEKKRGRPPTFPGVKIKITHGKDISELPGKNKEDSLKKIKRTPSATFQ
QATKIKKLRAGKLSPLKSKFKTGKLGQGRKGVQIVRRRGRPPSTERIKTPSGLLINSELEKPKQKVRKDKEG
TPPLTKEDKTVVRQSPRRIKPVRIIPSSKRTDATIAKQLLQRAKKGAKKIEKEAAQLQGRKVKTVQVKNI
RQFIMPVVSAAISSRIKTPRRFIEDEDYDPPIKIARLESTPNSRFSAPSCGSSEKSSAASQHSQMSDSSRSSS
PSVDTSTDSQASEEIQVLPEERSDTPVHPPPLISQSPENESNDRRSRRYSVSERSFGSRTTKKLSLTLQSAPQ
QQTSSSPPPPLLTPPPPLQPASSISDHTPWLMPTIPLASPLPASTAPMQGKRKSILREPTFRWTSKHSRS
EPQYFSSAKYAKEGLIRKPIFDNFRPPPLTPEDVGFASGFSASGTAASARLFSPLHSGTRFDMHKRSPLLR
APRFTPSEAHSRIFESVTLPSNRTSAGTSSSGVSNRKRKRKVFSPRSEPRSPSHMRTRSGRLSSSELSPLTP
PSSVSSSLSISVSPLATSALNPTFTFPSSHLSLQSGESAENQRPRKQTSAPAEFSSSSPTPLFPWFPTGSQTE
RGRNKDKAPEELSKDRDADKSVEKDKSRERDREREKENKRESRKEKRKKGSEIQSSSALYPVGRVSKKEK
VVGEDVATSSSAKKATGRKKSSSHDSGTDITSVTLGDTTAVKTKILIKKGRGNLEKTNLDLGPAPSLEK
EKTLCSTPSSSTVKHSTSSIGSMLAQADKLPMTDKRVASLLKKAQAQLCKIEKSKSLKQTDQPKAQGQ
ESDSSETS VRGPRIKHVCRRAAVALGRKRAVFPDDMPTLSALPWEEREKILSSMGNDKSSIAGSEDAEP
LAPPIKPIKPVTRNKAPQEPVKKGRRSRRCGQCPGCVQPEDCGVCTNCLDKPKFGGRNIKKQCKMRK
CQNLQWMPKAYLQKQAKAVKKKEKSKTSEKKDSKESVVKNVVDSSQKPTPSAREDPAPKKSSSEP
PPRKPVEEKSEGNVSAPGPESKQATTPASRKSQKQVSPALVIPPQPPTTGPPEKVPKTPPSEPKKKQPP
PPESGPEQSKQKQKQVAPRPSIPVKQKPKKEKPPPVNKQENAGTLNILSTLSNGNSSKQKIPADGHRIRVDF
KEDCEAENVWEMGGLGILEVKSPIKQSKSDKQIKNGECDKAYLDELVELHRRMLTLRERHILQQIVNLIE
ETGFHITNTTFDFDLCSLDKTTVRKLSYLETSGTS
```

**Figura 10.** Resultado de la secuenciación de tipo sanger realizada en el plásmido *MLL-AF9* y transformada en secuencia aminoácida mediante la herramienta Expsy Tools

Para la discriminación del área de traslocación y la región clave, se emplearon secuencias obtenidas a través de análisis bioinformático, junto con secuencias disponibles en NCBI. Al alinear estas secuencias con el plásmido, se identificaron coincidencias consistentes en una región de 25 aminoácidos (**Figura 11**), la cual fue utilizada para desarrollar partidores específicos para la detección de la proteína de fusión *MLL-AF9*. Los dominios relevantes de la proteína *MLL-AF9* se identificaron mediante utilizando la herramienta de búsqueda de Interpro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/text/>) (**Figura 12**). Los partidores diseñados fueron evaluados mediante PCR en tiempo real. En este ensayo se analizaron 5 muestras; las muestras 1 a 4 correspondían a ADN de bazo de ratones sin LMA, mientras que la muestra 5 provenía de un bazo esplenomegálico de un ratón afectado por leucemia mieloide aguda (**Figura 13**). Los resultados mostraron una alta expresión de *MLL-AF9* únicamente en la muestra 5, indicando la ausencia de expresión significativa en las demás muestras.

MLL-AF9	PV NKQENAGTLN I LSTLSNGNSSKQKIPADGHRIRVDFKEDCEAENVWEMGGLGILEVKS	1440
Translocación	-----HRIRVDFKEDCEAENVWEMGGLGIL----	25
Indispensable	-----LSTLSNGNSSKQKIPADGHRIRVDFKEDCEAENVWEMGGLGILEVKS	47
	*****	
MLL-AF9	PIKQSKSDKQIKNGECDKAYLDELVELHRRMLTLRERHILQQIVNLIETGHHITNTTF	1500
Translocación	-----	25
Indispensable	PIKQSKSDKQIKNGECDKAYLDELVELHRRMLTLRERHILQQIVNLIETGHHITNTTF	107
MLL-AF9	DFDLCSLDKTTVRKLQSYLETSGTS	1525
Translocación	-----	25
Indispensable	DFD-----	110

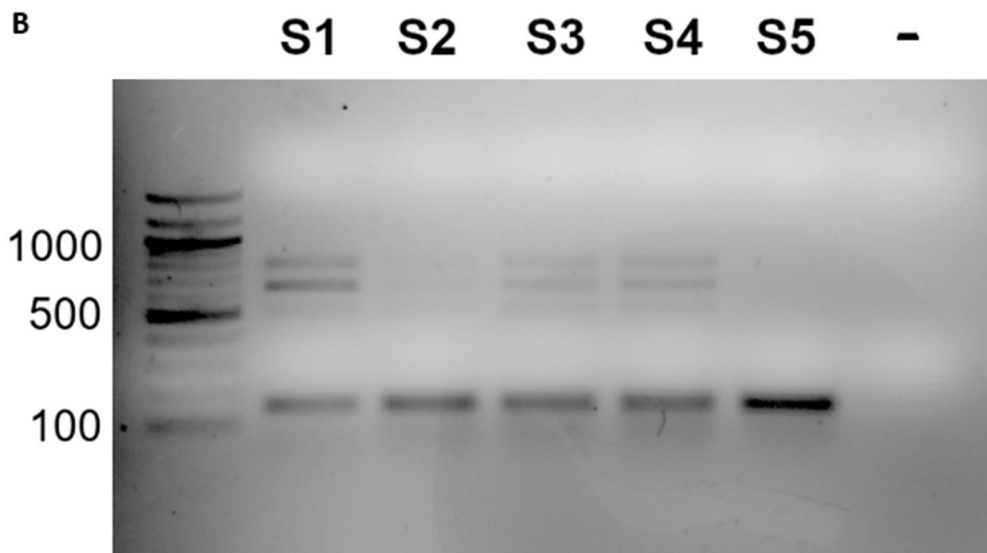
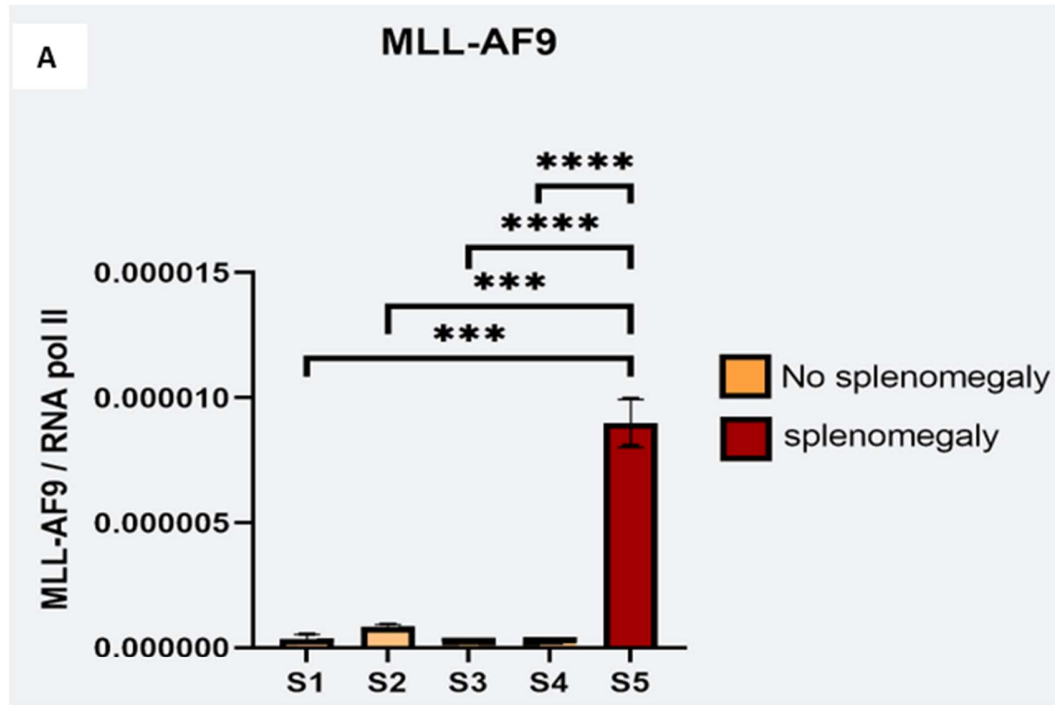
Partidores Forward: 5'-GGCACTTTGAACATCCTCAGCACT-3'  
Reverse: 5'-TTCAAGGATCCCTAAGCCTCCCAT

**Figura 11. Resultado del alineamiento fue realizado en Clustal omega, utilizando el plásmido secuenciado de *MLL-AF9* y varias secuenciaciones obtenidas mediante análisis bioinformático en NCBI.**

Como resultado se obtuvieron los partidores específicos 5'-GGCACTTTGAACATCCTCAGCACT-3' como forward y 5'-TTCAAGGATCCCTAAGCCTCCCAT como reverse para verificar la presencia de la proteína de fusión *MLL-AF9* en LMA.



A continuación, se procedió a ensayar los partidores específicamente diseñados en ARN extraído de bazo afectados y no afectados por esplenomegalia, originada por leucemia secundaria *MLL-AF9*. Esto permitió evaluar la precisión y especificidad de los partidores en la detección de la expresión del gen de fusión *MLL-AF9* en un contexto patológico:



**Figura 13. Detección de la proteína de fusión *MLL-AF9* mediante PCR en tiempo real:**

A) En el gráfico, las muestras S1, S2, S3 y S4 representan bazo normales de ratones, y la muestra S5 proviene de un bazo esplenomegálico de un ratón con LMA. Este patrón indica la presencia exclusiva de expresión significativa de *MLL-AF9* en la muestra S5, en contraste con las muestras S1 a S4, que muestran niveles de expresión indetectables o muy bajos.

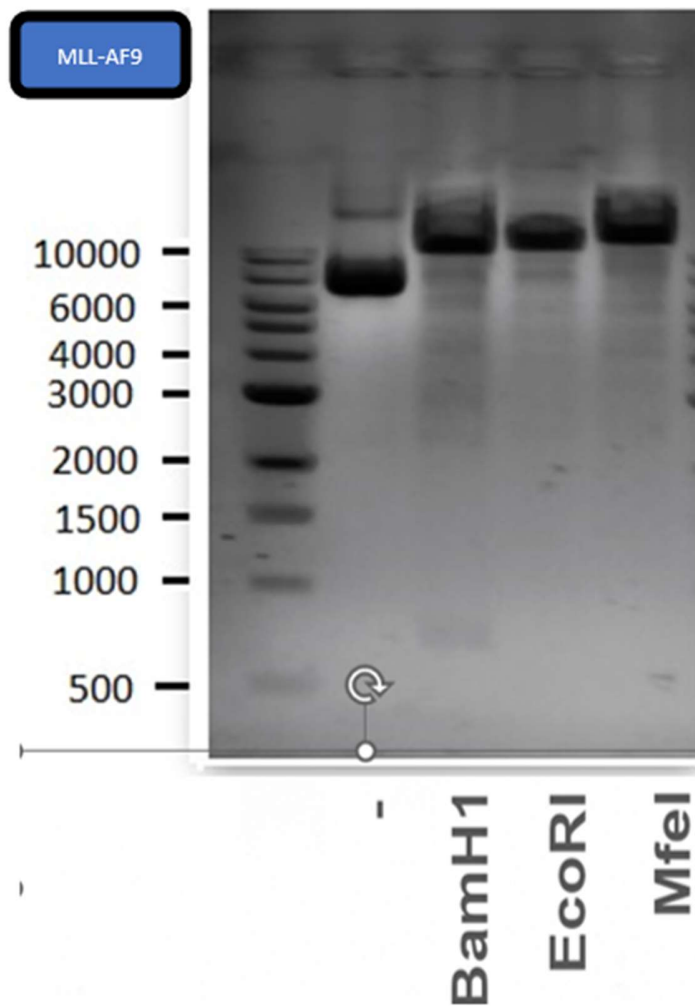
B) El gel de agarosa confirma la presencia de la secuencia específica de *MLL-AF9* en las muestras desde S1 hasta S5, y demuestra la ausencia de contaminantes en el control negativo. Este resultado corrobora la especificidad y eficacia de los partidores diseñados para amplificar el segmento de interés en la muestra afectada por LMA, mientras que en los controles normales y en el control negativo no se observan bandas relevantes. T-test: \* p-value < 0.05, \*\* p-value < 0.01, \*\*\* p-value < 0.005, \*\*\*\* p-value < 0.001

**Resultados de Objetivo específico número 2:** Ensayar una alteración molecular del punto 1 en un modelo de LMA *in vivo*

2.1) Obtención de un retrovirus *MLL-AF9* para infectar células madre hematopoyéticas de ratones CRISPR-Cas9 y transplantar ratones C57BL6 para generar LMA

### **Estandarización del modelo “*in vivo*” para la generación de LMA en modelo de ratón**

Antes de iniciar la generación del modelo *in vivo*, se compró en addgene un nuevo plásmido *MLL-AF9* fusionado a la proteína *GFP*. Para verificar la integridad de este plásmido, se realizó una electroforesis en gel de agarosa, representada en la **Figura 14**, donde el plásmido se cargó en cuatro carriles distintos. En el primer carril, se cargó el plásmido sin digerir; en el segundo, se sometió a digestión con la enzima BamH1 para linealizarlo y liberar el fragmento que codifica para *GFP*, demostrado en una banda de 500 pb correspondiente a la proteína *GFP*. Los carriles tres y cuatro contuvieron el plásmido tratado con las enzimas EcoR1 y MfeI, respectivamente. La digestión con estas dos enzimas debía linealizar el plásmido, cosa que ocurrió. En todos los casos, el tamaño de las bandas observadas coincidía con los tamaños esperados, lo que confirmó la integridad del plásmido para continuar con los experimentos.



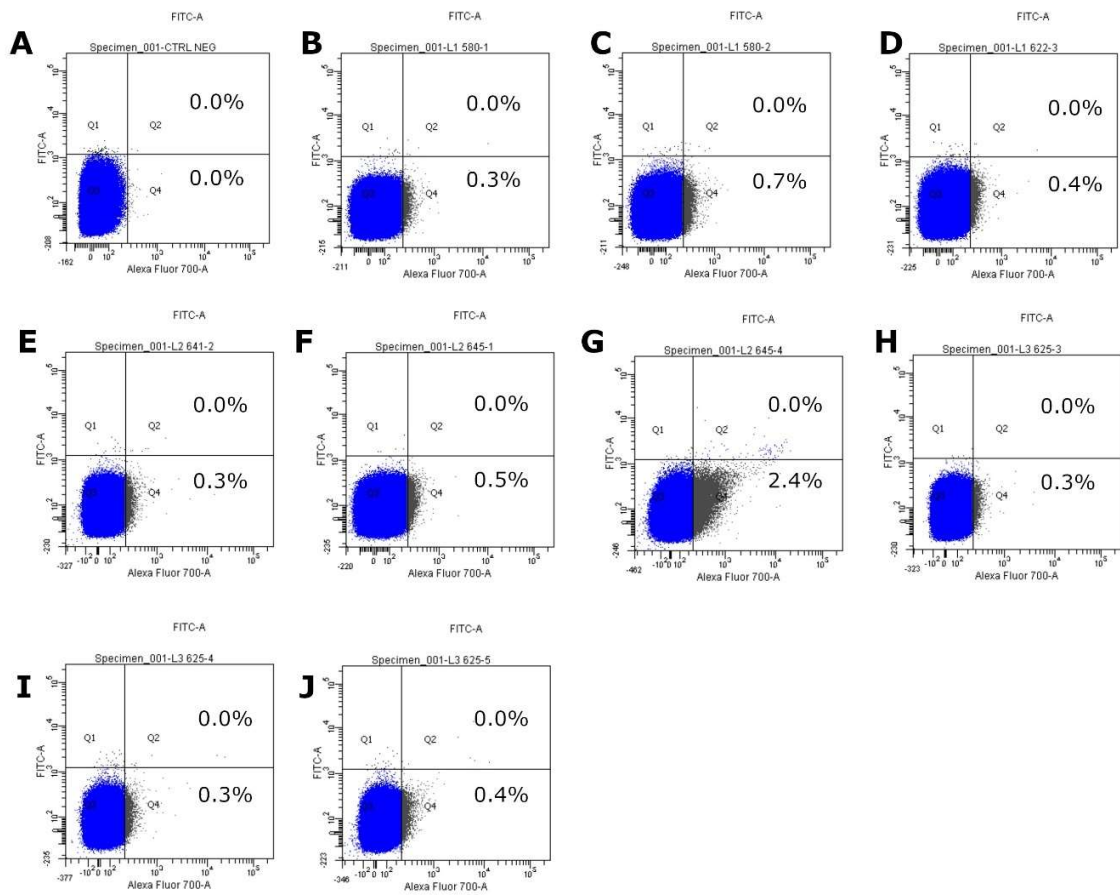
**Figura 14. Comprobación del plásmido *MLL-AF9-GFP* mediante electroforesis en gel de agarosa.**

A) El gel presenta cuatro carriles en los que se cargó el plásmido *MLL-AF9*. En el primer carril, el plásmido aparece en su forma circular cerrada, con un tamaño de 11,150 pares de bases. En los carriles subsiguientes, se muestra el plásmido linealizado tras la digestión con las enzimas BamH1, EcoR1 y MfeI, respectivamente. Nótese que la digestión con BamH1 liberó un fragmento de 500 pb correspondiente a *GFP*. Las ubicaciones de los cortes efectuados por estas enzimas fueron verificadas previamente utilizando la herramienta online NebCutter, lo que permitió confirmar la integridad y la estructura esperada del plásmido.

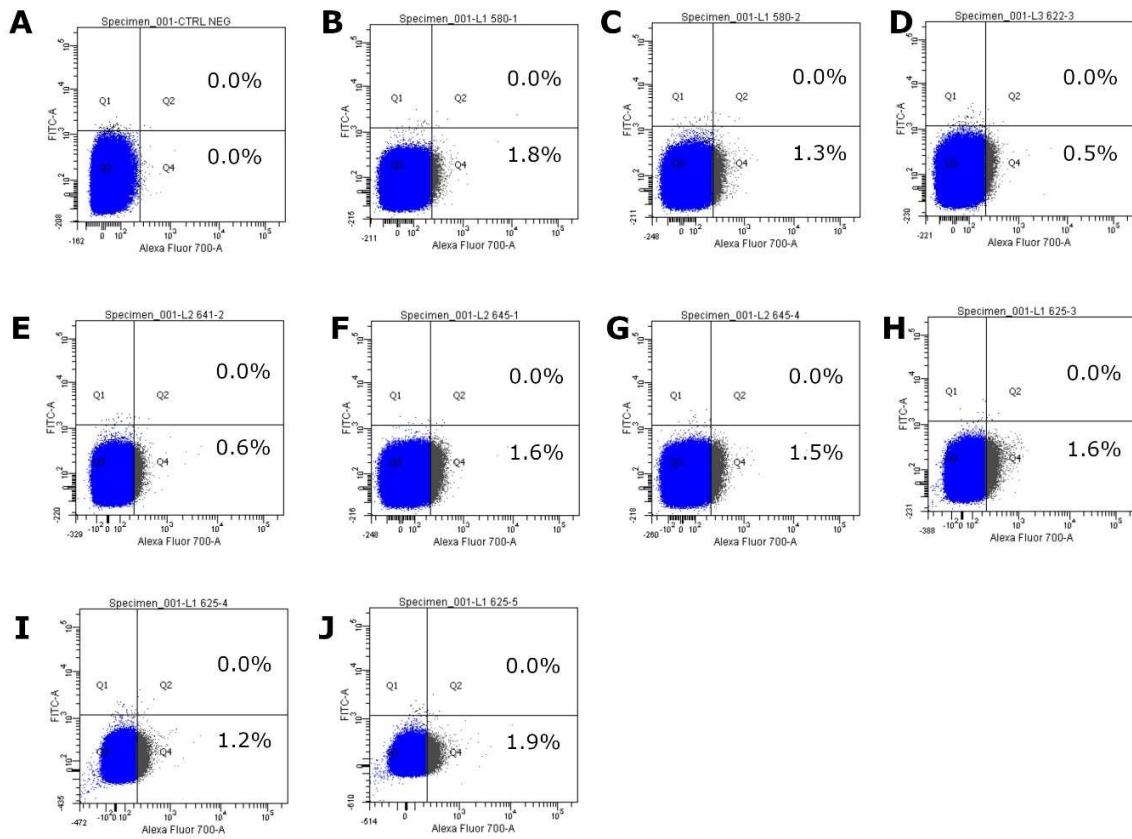
## Monitoreo de la progresión de LMA “*in vivo*”

Para evaluar la progresión de la leucemia, se monitoreó la expresión de la proteína *GFP* acoplada a *MLL-AF9* en células de leucemia mieloide aguda (LMA) utilizadas en la inoculación. Los ratones que no recibieron irradiación mantuvieron una condición estable, sin síntomas ni pérdida de peso durante las primeras 12 semanas post-inoculación. En cambio, los ratones irradiados comenzaron a mostrar signos clínicos de leucemia a las 12 semanas, evidencia que se corroboró en el análisis histológico de médula ósea e hígado, donde se observó metástasis, como se ilustra en las figuras del 17 al 21. Hacia la semana 16, aquellos ratones no irradiados presentaron signos de proliferación leucémica, considerándose una leucemia incipiente, representada en las figuras 15 B-F, siendo particularmente notable en el espécimen 645-4, marcado en la figura 15 G, en contraposición al control negativo de la figura 15 A.

En la semana 18, se hizo seguimiento de los ratones con LMA incipiente que no habían sido irradiados, como se muestra en la figura 16. A pesar de que el control negativo figura en la imagen 16 A, el resto de los ratones infectados con el retrovirus mostró variaciones en la proliferación de células leucémicas, con un aumento leve en algunos casos y una disminución en otros. El espécimen 645-4, que previamente tenía la mayor cantidad de células *GFP* positivas, disminuyó su expresión del 2.4% al 1.5%. Estos niveles resultaron insuficientes para confirmar un diagnóstico de LMA, lo que llevó a la decisión de sacrificar a los sujetos de prueba y continuar los experimentos solo con los ratones que habían sido irradiados. Todos los individuos sacrificados no presentaron LMA ni un bazo agrandado ni metástasis a nivel de las necropsias.



**Figura 15. Citometría de flujo proveniente de sangre periférica de ratones infectados con retrovirus luego de 16 semanas de la inoculación:** A corresponde a un control negativo que no fue inoculado con LMA mientras que el resto de muestras B-J corresponden a ratones que si fueron inoculados y que presentan expresión leve de la presencia de *GFP* que se representa en el cuadrante Q4.



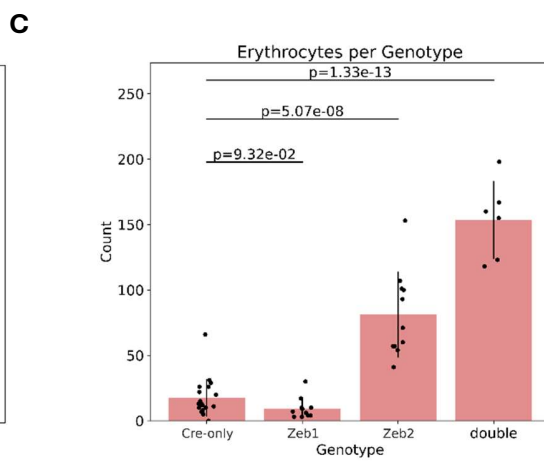
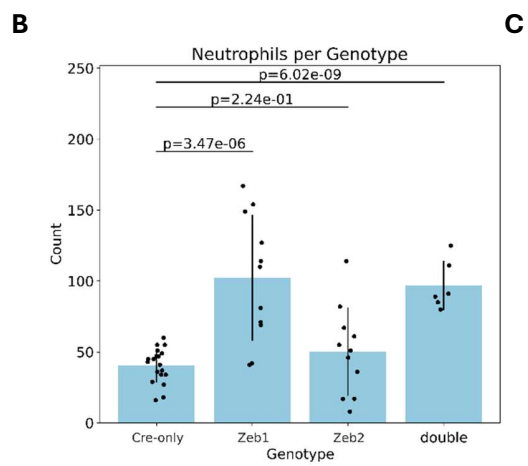
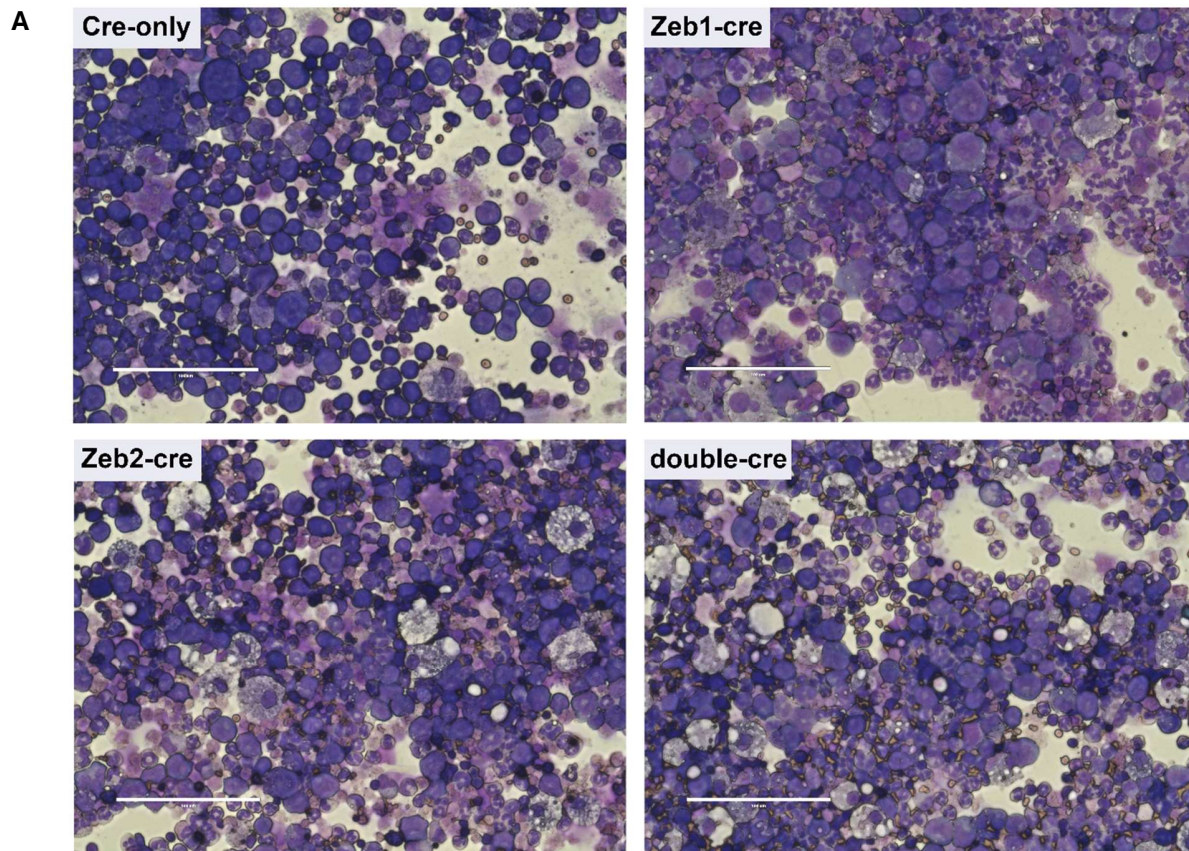
**Figura 16. Citometría de flujo proveniente de sangre periférica de ratones infectados con retrovirus luego de 18 semanas de la inoculación:** A corresponde a un control negativo que no fue inoculado con LMA mientras que el resto de muestras B-J corresponden a ratones que si fueron inoculados y que presentan expresión leve de la presencia de *GFP* que se representa en el cuadrante Q4.

**Resultados de objetivo específico número 3:** Analizar metástasis de las células leucémicas generadas en el modelo *in vivo* a lo largo de diversos tejidos

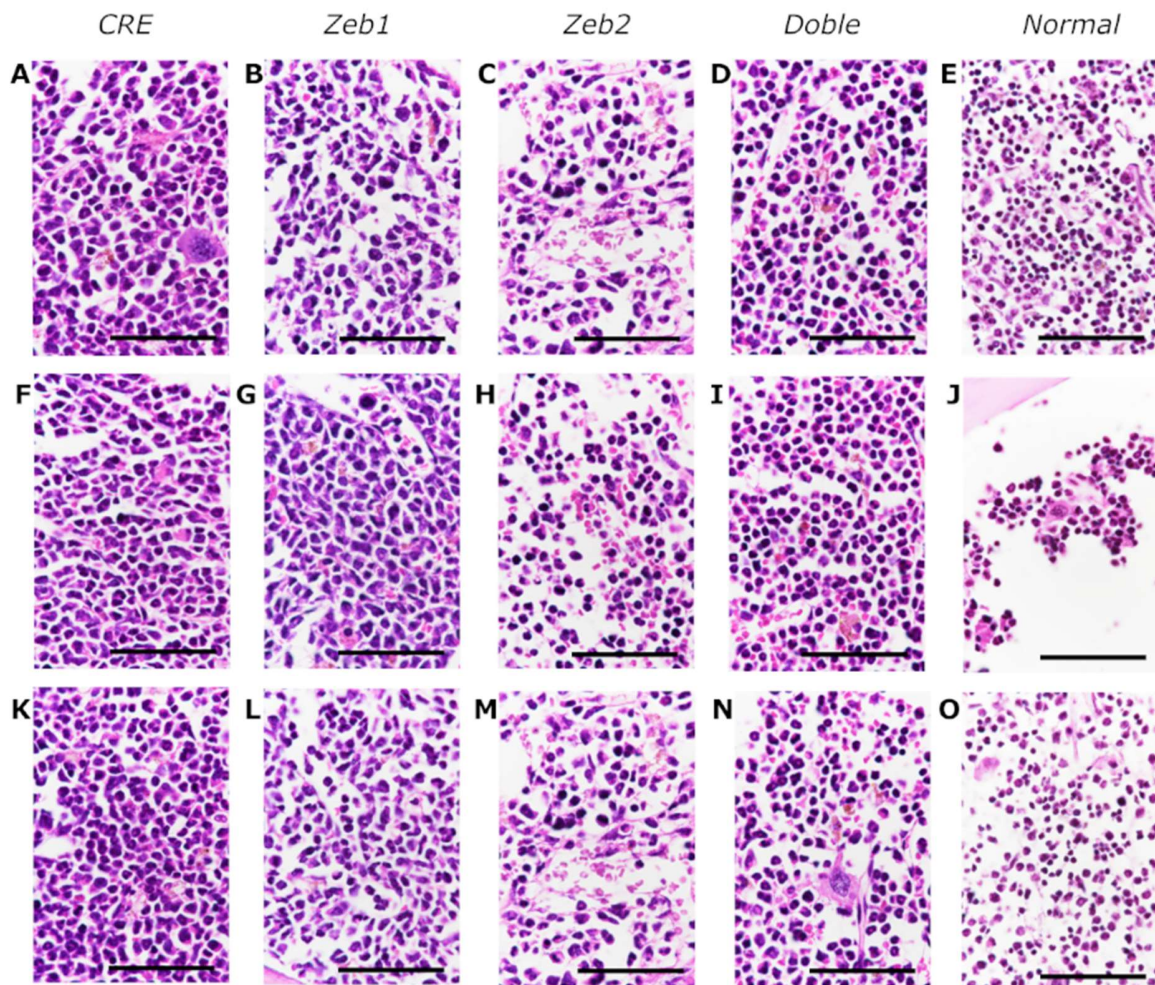
### **Análisis Histológico de médula ósea – *Deep learning* análisis**

El análisis histológico de la médula ósea de los ratones reveló diferencias significativas entre los especímenes *knock-out* para los factores de transcripción *Zeb1*, *Zeb2* o ambos (**Figuras 18 y 19**). Los ratones sin modificaciones genéticas están etiquetados como "*Cre-only*" (**Figuras 18 A/F y K**, respectivamente). En estos cortes, teñidos con Hematoxilina y Eosina, se observa una marcada hipercelularidad, notable pleomorfismo nuclear y un aumento en la relación de tamaño celular en comparación con los controles (**Figuras 18 E, J y O; 19 E, J y O**, respectivamente). Estas características también son evidentes en las fotografías de cortes teñidos con Giemsa (**Figuras 19 A, F y K**, respectivamente). Por otro lado, las muestras de huesos provenientes de ratones con el gen *Zeb1* inactivado no muestran diferencias significativas respecto a las muestras *Cre-only* a nivel celular o citológico, salvo por un aumento estadísticamente significativo en la presencia de megacariocitos y/o megaloblastos primitivos (**Figuras 18 B, G y L; 19 G y L**, respectivamente). Los cortes provenientes de las muestras con inactivación de *Zeb2* presentan una disminución en la celularidad y en el tamaño promedio de las células, junto con un aumento en la segmentación nuclear (**Figuras 18 C, H y M; 19 C, H y M**, respectivamente). En las muestras provenientes del genotipo "doble" (inactivación de ambos genes, *Zeb1* y *Zeb2*), se observa una reducción en la densidad celular y en el diámetro promedio de las células, lo que indica una mayor similitud histomorfológica con los controles negativos. También en este genotipo, se detecta una acumulación considerable de eritrocitos dentro de la médula y una cantidad significativa de megacariocitos y/o megaloblastos primitivos (**Figuras 18 D, I y N; 19 D, I y N**, respectivamente).

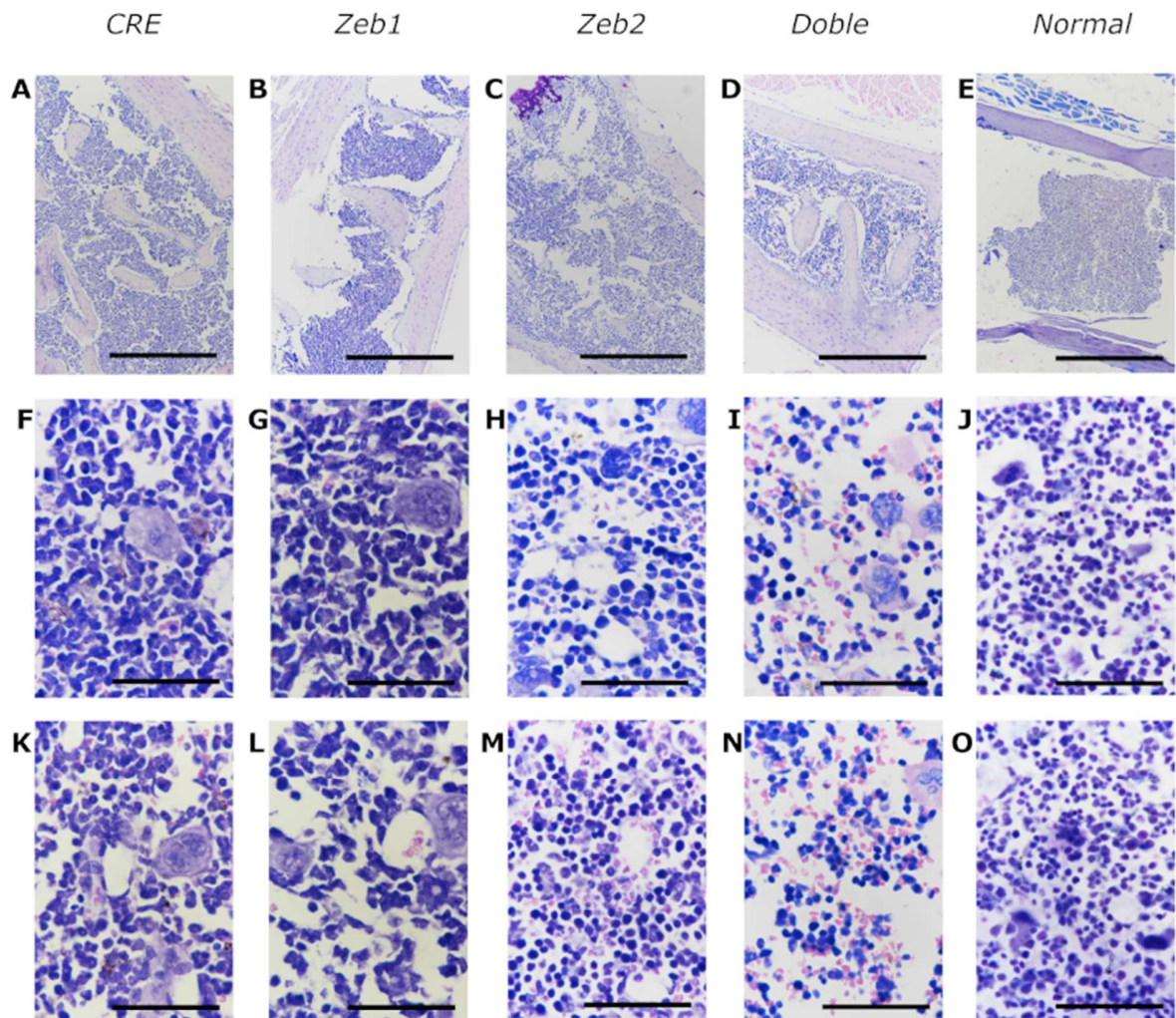
Además, los frotis citológicos teñidos con Giemsa proveniente de los distintos genotipos (*Cre-only*, *Zeb1*, *Zeb2* y doble) (**Figura 17 A-C**, respectivamente) muestran un incremento progresivo en la segmentación nuclear, siendo más pronunciado en el genotipo *Zeb1* y en el doble *knock-out*, y menos en el genotipo *Zeb2*. Al analizar manualmente la línea y maduración celular, se observa que la inactivación de *Zeb1* incrementa la expresión de neutrófilos significativamente en comparación con las muestras *Cre-only*. Este incremento es menos marcado en las muestras con inactivación de *Zeb2*, pero se intensifica nuevamente en el doble *knock-out* (**Figura 16 B**). Por otro lado, la cantidad de eritrocitos aumenta en las muestras con inactivación de *Zeb2* y en las muestras con el genotipo doble (**Figura 16 C**).



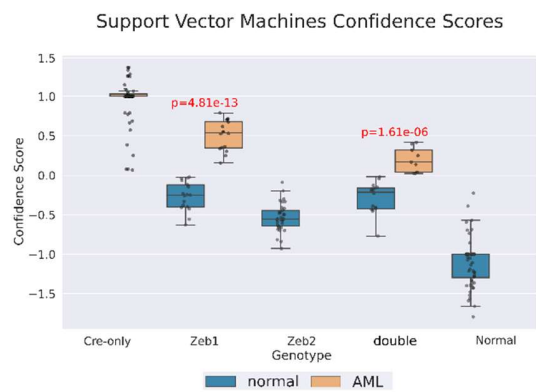
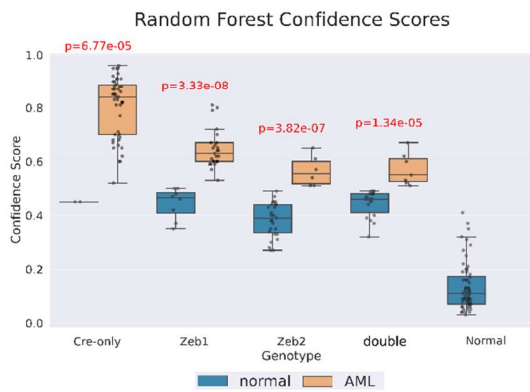
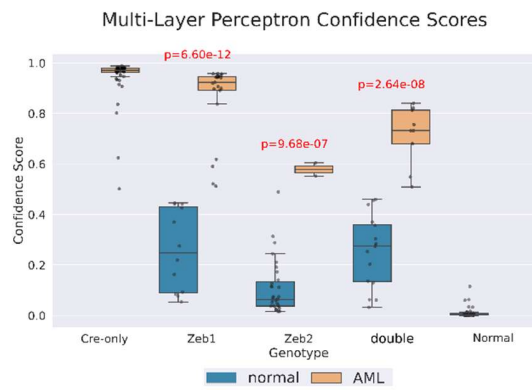
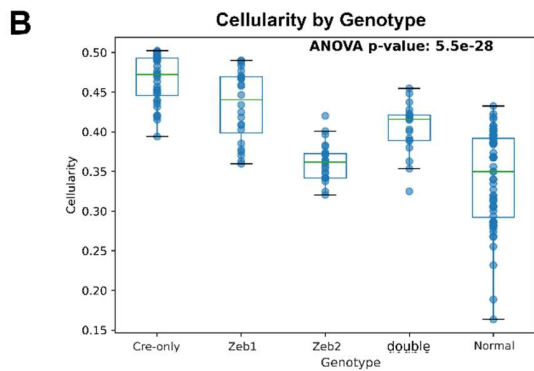
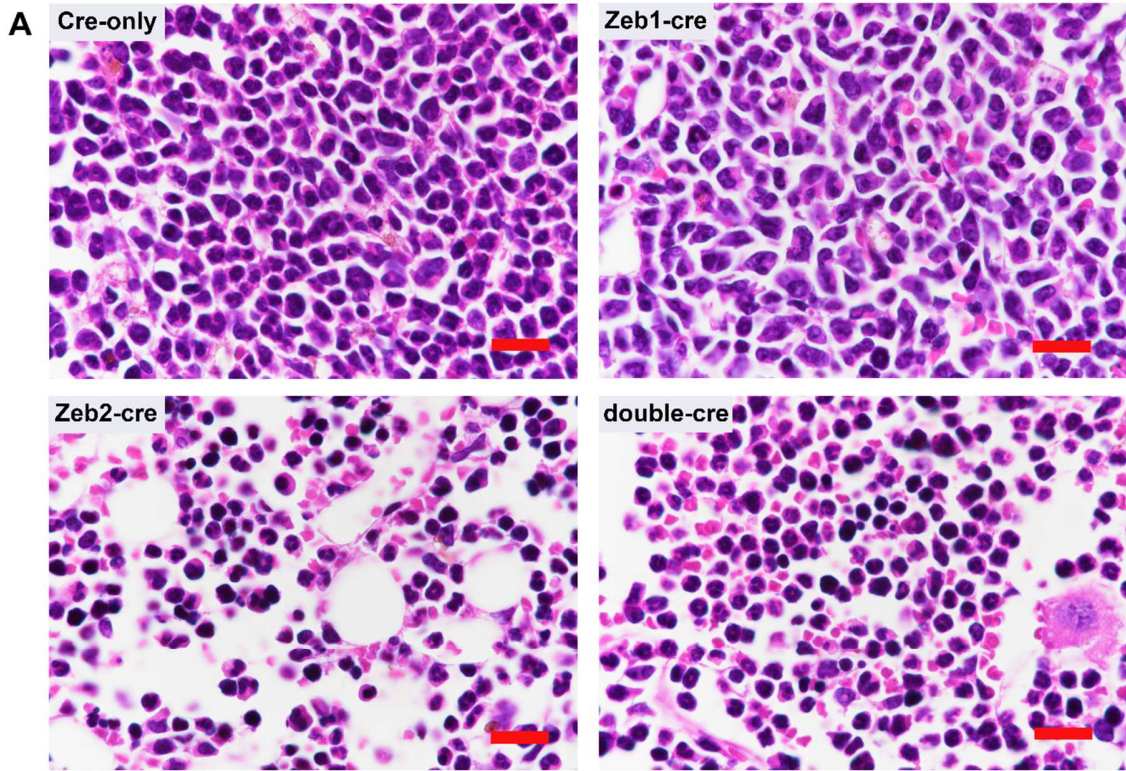
**Figura 17. Características citopatológicas de la LMA tras la delección de doble de *Zeb1* y *Zeb2*.** Presentadas en orden de reloj: Comenzando con las muestras de especímenes *Cre-only*, la tinción de Giemsa revela la presencia de blastos no diferenciados típicos de la LMA. Siguiendo el orden, la delección de *Zeb1* lleva a un incremento en la diferenciación de monocitos. Al avanzar, la eliminación de *Zeb2* se asocia con una mayor diferenciación de neutrófilos. Por último, la supresión de ambos loci *Zeb1* y *Zeb2* conduce a una notable disminución de blastos, evidenciando un aumento en la diferenciación celular y una reducción en la densidad celular. B) Adicionalmente, el análisis cuantitativo muestra que la delección de *Zeb1* resulta en un incremento de neutrófilos comparado con el genotipo *Cre-only*. Este aumento no es tan evidente en las muestras con delección de *Zeb2*, pero se vuelve a destacar en las muestras con delección doble. C) En cuanto a los eritrocitos, hay una baja presencia en las muestras *Cre-only* y *Zeb1-cre*, mientras que los genotipos *Zeb2-cre* y doble presentan un aumento considerable en la cantidad de eritrocitos.



**Figura 18. Histología de médula ósea de ratón con tinción de hematoxilina eosina aumento 100x:** Cortes histológicos provenientes de médula ósea de ratón con barra escala de 50uM. Las microfotografías correspondientes a la primera columna (A, F y K) pertenecen a ratones Cre positivos para *MLL-AF9* y con características clínicas de leucemia, las microfotografías de la segunda y tercera columna (B,G y L – C, H Y M) corresponden a ratones infectados con *MLL-AF9* que generaron leucemia y les fue cotado el gen *Zeb 1* y *Zeb 2* respectivamente, las microfotografías de la cuarta columna (D, I Y N) corresponden a muestras provenientes de ratones infectados con *MLL-AF9* que presentan características clínicas de LMA y que les fueron cortados ambos genes *Zeb*, por último la quinta columna corresponde a microfotografías provenientes de ratones *wild type* sin la presencia de *MLL-AF9* y negativos para la presencia de leucemia



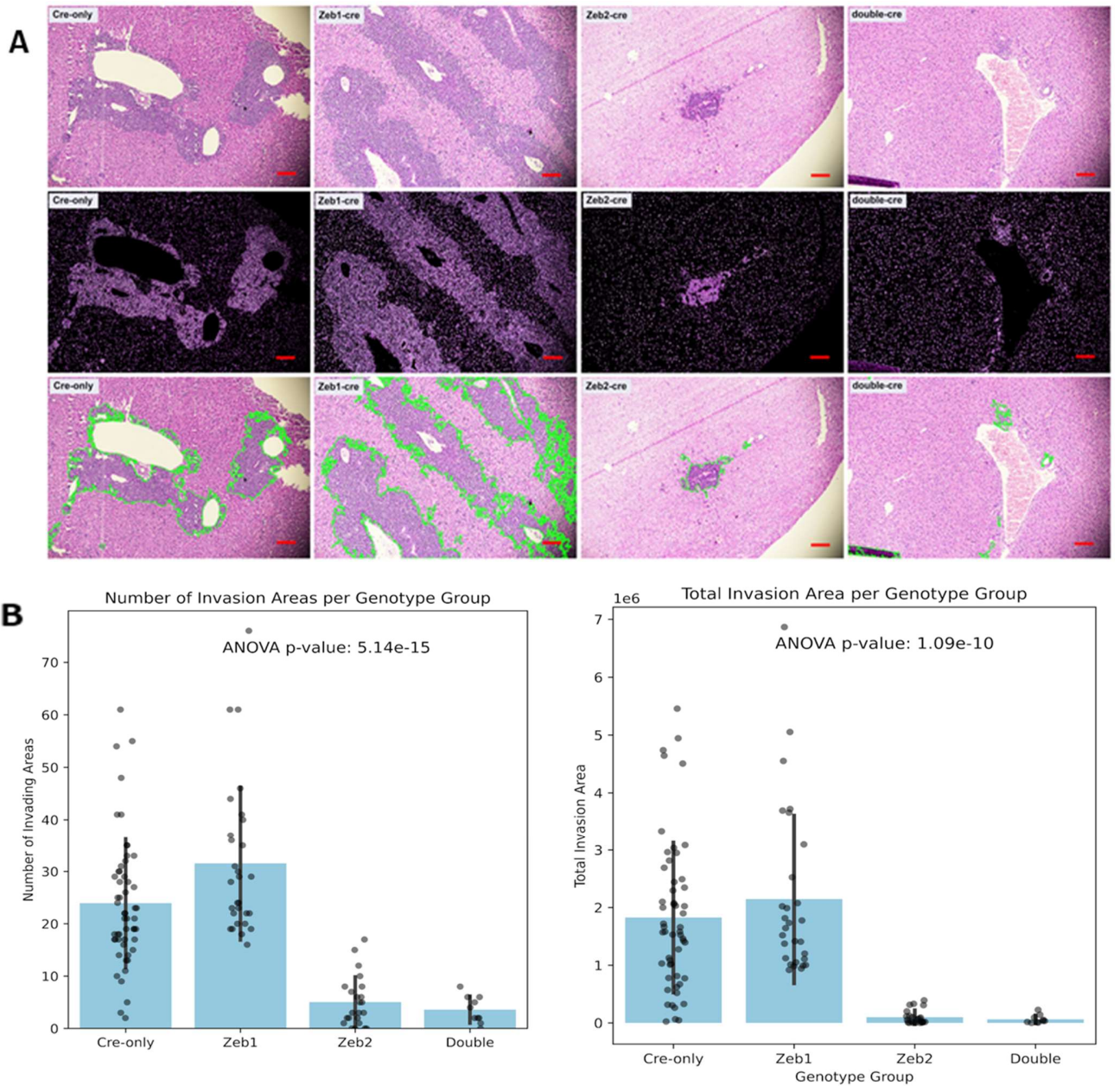
**Figura 19. Histología de médula ósea de ratón con tinción de giemsa eosina aumento 10x y 100x:** Cortes histológicos provenientes de médula ósea de ratón con barra escala de 500 uM en la primera fila (A, B, C, D Y E) y 50uM para las otras dos filas (F, G, H, I, J, K, L, M, N, O) . Las microfotografías correspondientes a la primera columna (A, F y K) pertenecen a ratones Cre positivos para *MLL-AF9* y con características clínicas de leucemia, las microfotografías de la segunda y tercera columna (B,G y L – C, H Y M) corresponden a ratones infectados con *MLL-AF9* que generaron leucemia y les fue cotado el gen *Zeb 1* y *Zeb 2* respectivamente, las microfotografías de la cuarta columna (D, I Y N) corresponden a muestras provenientes de ratones infectados con *MLL-AF9* que presentan características clínicas de LMA y que les fueron cortados ambos genes *Zeb*, por último la quinta columna corresponde a microfotografías provenientes de ratones *wild type* sin sin presencia de *MLL-AF9* y negativos para la presencia de leucemia.



**Figura 20: Análisis Histopatológico y Computacional de la Progresión de la LMA Post-Eliminación de *Zeb1/2*.**

A) Micrografías Histológicas: Cuatro imágenes representativas de secciones de tejido de médula ósea con LMA teñidas con hematoxilina y eosina (H&E) que muestran la morfología celular post eliminación de *Zeb1/Zeb2*. Comenzando desde la parte superior izquierda y moviéndose en el sentido de las agujas del reloj, en el genotipo *Cre-only* se observan blastos no diferenciados típicos en la Leucemia Mieloide Aguda (LMA). En el genotipo *Zeb1-cre*: Se observa una notable diferenciación hacia monocitos tras la eliminación de *Zeb1*. En el genotipo *Zeb2-cre* se observa una mayor diferenciación celular en general tras la eliminación de *Zeb2*. Finalmente, en el genotipo *Double-cre* la eliminación dual de *Zeb1* y *Zeb2* muestra una reducción en el número de blastos, una diferenciación celular mejorada y una disminución en la densidad celular.

B) Análisis Computacional: Gráficos de caja que ilustran la densidad celular y las puntuaciones de confianza basadas en aprendizaje automático para clasificar muestras de tejido en categorías normal y LMA, basadas en variaciones genotípicas: Celularidad por Genotipo: Una prueba ANOVA revela diferencias significativas en la celularidad entre los genotipos (valor-p:  $5.5e-28$ ), con tejido normal demostrando una menor celularidad en comparación con las muestras *Cre-only* y bajo la delección de *Zeb1/Zeb2*. Puntuaciones de Confianza del Perceptrón Multicapa (MLP): Indican una alta confianza en distinguir muestras de LMA de muestras normales en todos los genotipos (el valor-p más bajo:  $6.60e-12$  en *Cre-only*). Puntuaciones de Confianza de *Random Forest*: Reflejan una clasificación robusta con notable confianza, especialmente en las muestras de genotipo doble (el valor-p más bajo:  $1.34e-05$ ). Puntuaciones de Confianza de Máquinas de Vectores de Soporte (SVM): Demuestran fuertes capacidades de discriminación entre muestras de tejido normal y LMA, con significancia estadística (el valor-p más bajo:  $1.61e-06$  en genotipos dobles). Cada modelo computacional indica fuerte clasificación del genotipo *Cre-only* como LMA y en mucha menor medida el genotipo *Zeb2* como normal. Esta clasificación también se refleja en los conteos manuales de neutrófilos y eritrocitos, mostrando un aumento en la expresión de neutrófilos en las muestras con delección de *Zeb1* y doble, y un incremento en el recuento de eritrocitos en genotipos *Zeb2* y doble, respectivamente.



**Figura 21: Invasión hepática en diferentes genotipos post-delección de *Zeb1/2*.**

A: Panel que presenta tres filas de imágenes correspondientes a cortes de tejido hepático en ratones con *LMA*, tras la delección de los genes *Zeb1*, *Zeb2*, o ambos. La primera fila muestra imágenes de H&E, la segunda fila con un filtro morfológico de Python que detecta las células violetas, y la tercera fila una combinación de ambas técnicas, donde las áreas verdes resaltan regiones de invasión. De izquierda a derecha, el genotipo *Cre-only* muestra una estructura hepática con extensa invasión. En el genotipo *Zeb1-cre* se observa similar al genotipo *Cre-only* y el genotipo *Zeb2-cre* se observa un área de invasión muy disminuida que incluso es menor que en el genotipo doble.

B: Análisis cuantitativo de la invasión hepática por genotipo. Esta figura incluye dos gráficos de barras que representan el análisis cuantitativo de la invasión hepática, en donde se ve tanto una disminución significativa de las áreas de invasión y del área total de invasión bajo la delección de *Zeb2* o de ambos factores de transcripción.

Los resultados presentados en la **Figura 20** revelan variaciones significativas en la morfología celular asociada con la delección de los factores de transcripción *Zeb1* y *Zeb2* en el contexto de LMA. La histología indica que, mientras que el genotipo *Cre-only* muestra una predominancia de blastos no diferenciados, típicos en la LMA, la eliminación de *Zeb1* y *Zeb2* conlleva a un aumento de la diferenciación celular, con un perfil más diferenciado en neutrófilos en el caso de *Zeb1-cre* y en eritrocitos para *Zeb2-cre*. Además, la delección doble de ambos genes resulta en una disminución significativa de la densidad celular, lo cual sugiere un entorno menos propicio para la proliferación leucémica.

La **Figura 21** complementa estos hallazgos al examinar la invasión hepática en los mismos modelos. Las imágenes de H&E demuestran que el genotipo *Cre-only* presenta una extensa invasión hepática, mientras que los genotipos *Zeb1-cre* y *Zeb2-cre* muestran una menor invasión, siendo esta última más pronunciada en el genotipo *Zeb2-cre* y aún más disminuida en la delección doble. El análisis cuantitativo corrobora estos datos, destacando que la delección de *Zeb2*, ya sea sola o en combinación con *Zeb1*, reduce significativamente tanto el número como el área total de invasión hepática.

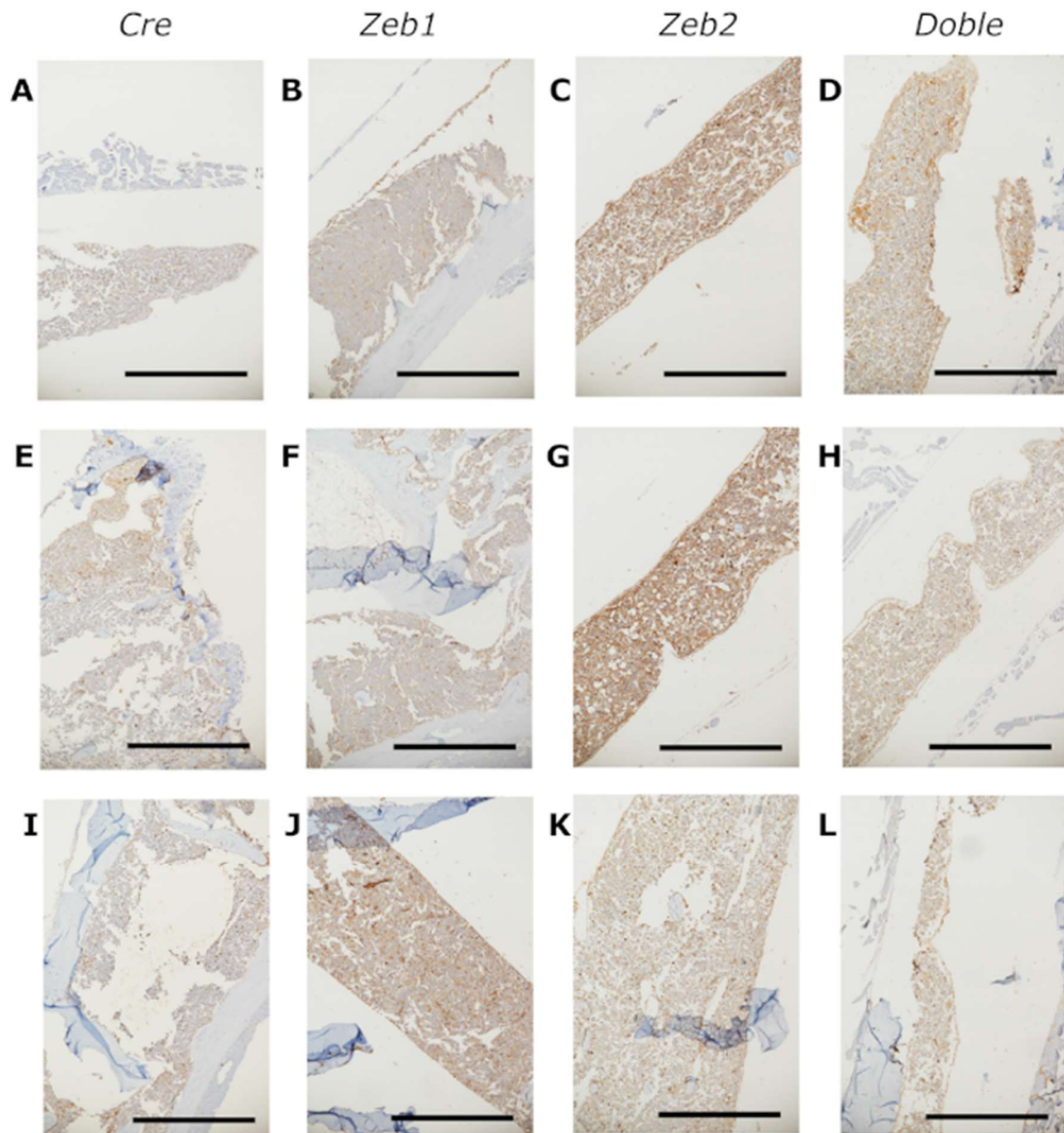
**En conjunto, estos resultados demuestran que la delección de ambos *Zeb1* y *Zeb2* tienen un impacto beneficioso al detener progresión de la LMA.** La delección de *Zeb1* promueve la diferenciación hacia tipos celulares como los neutrófilos, mientras que la delección de *Zeb2* fomenta la diferenciación hacia los eritrocitos, acompañada de una disminución en la invasión hepática y la densidad celular, lo que podría representar un entorno menos favorable para la expansión de la LMA.

Para complementar el análisis histológico, se llevaron a cabo inmunohistoquímicas cromogénicas en cortes de médula ósea, enfocándose en tres marcadores frecuentemente asociados con la leucemia. Esto con el fin de comparar la expresión diferencial en especímenes de LMA tras la delección de *Zeb1*, *Zeb2*, o ambos (doble). Utilizando el anticuerpo anti-*CD3* (Figura 22), las muestras de ratones LMA sin delección génica (*Cre*) exhibieron una positividad escasa y dispersa en el tejido medular (Figura 22 A, E, I), asociada principalmente a células inmaduras. Esta positividad se mantuvo en las muestras de delección de *Zeb1* (Figura 22 B, F, J), con un leve incremento en la intensidad en la tercera imagen. Las muestras con delección de *Zeb2* (Figura 22 C, G, K) mostraron una positividad moderada, y en el caso de las muestras dobles (Figura 22 D, H, L), la positividad continuó siendo moderada y dispersa.

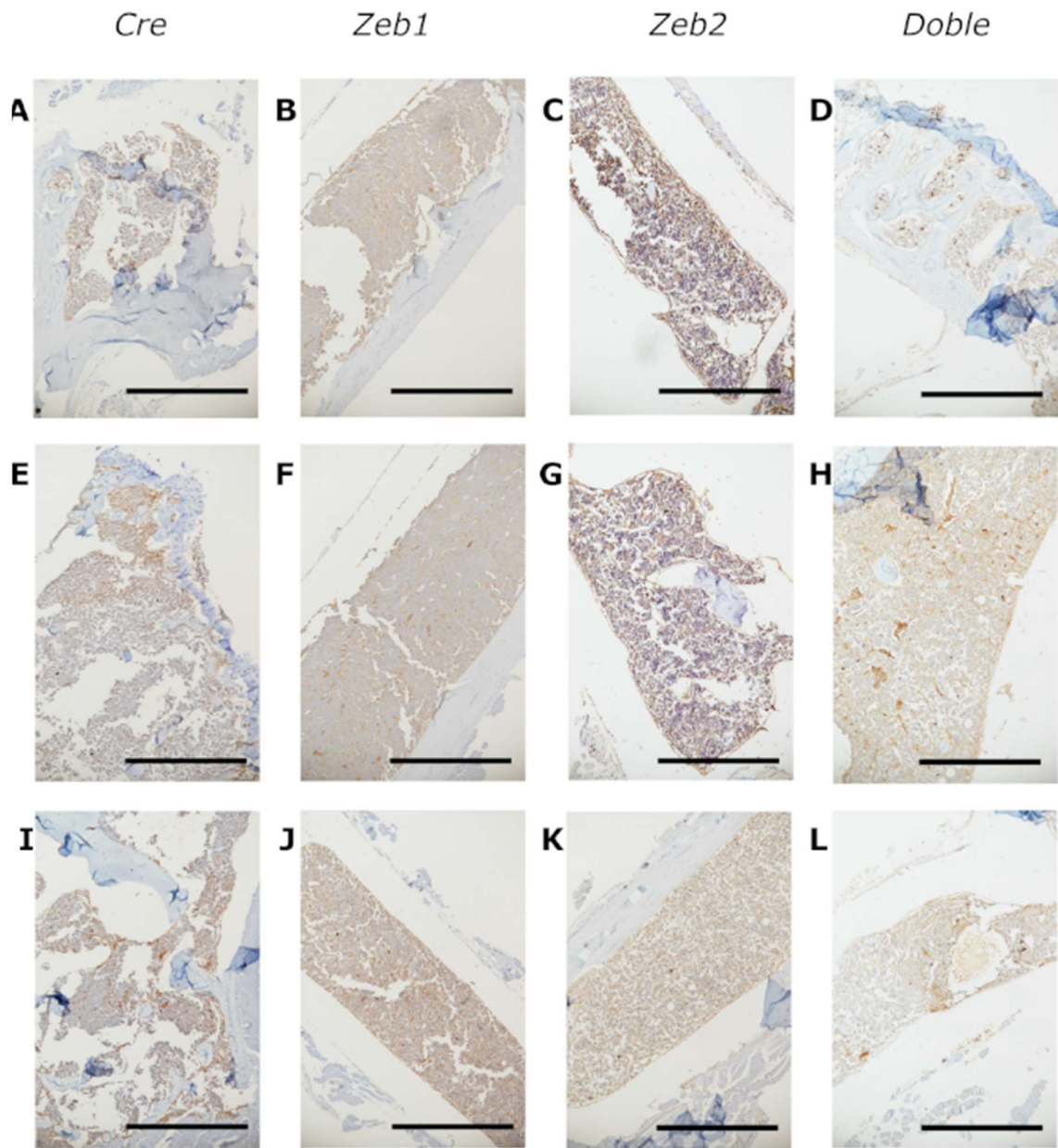
Con el anticuerpo anti-*BCL-2* (Figura 23), todas las muestras presentaron una positividad moderada y un patrón de distribución homogéneo a lo largo del tejido hematopoyético, sin diferencias apreciables entre los distintos fenotipos (*Cre*, *Zeb1*, *Zeb2*, Doble). La inmunohistoquímica con anti-*CD34* (Figura 24 A-L) reveló

una leve positividad en células del linaje mieloide con baja diferenciación, observándose resultados consistentes entre todos los fenotipos examinados.

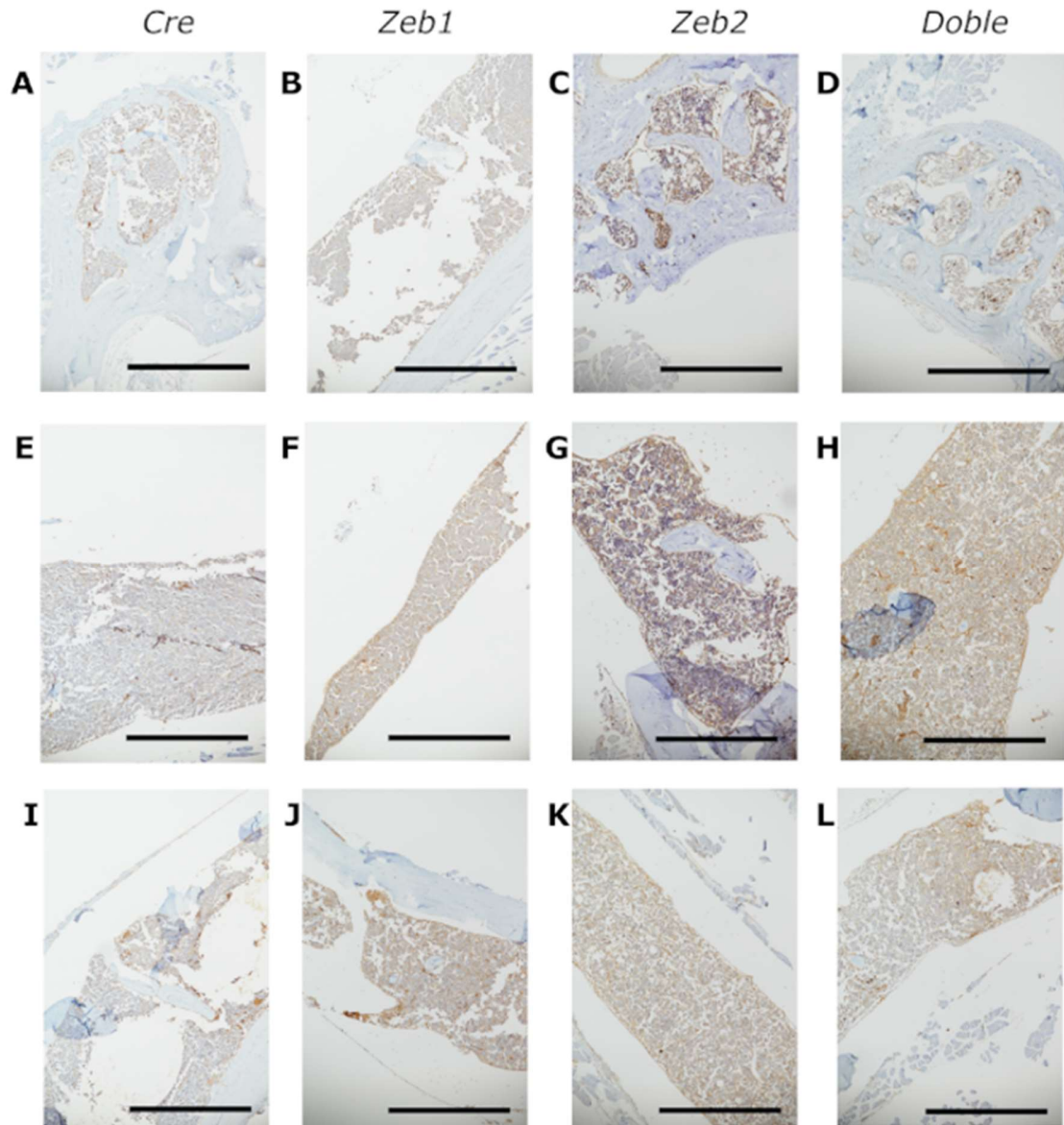
En conclusión, la delección de los genes *Zeb* parece no influir significativamente en la expresión de los marcadores *CD3* y *BCL-2* en la médula ósea. No obstante, la positividad constante para *CD34* sugiere que la presencia de células mieloides poco diferenciadas persiste, independientemente de la delección de uno o ambos genes. *Zeb*.



**Figura 22. IHQ *CD3*:** IHQ *CD3*: Microfotografías a 10X de cortes histológicos de médula ósea de ratón con una barra de escala de 500  $\mu$ m. Se realizó una inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo Anti-*CD3*, y se contrastó los núcleos con hematoxilina. Las imágenes correspondientes a ratones con LMA sin delección de genes (*Cre*) están en la primera columna (A, E, I). Las de ratones con LMA con delección del gen *Zeb1* están en la segunda columna (B, F, J). Las microfotografías de la tercera columna (C, G, K) muestran ratones con LMA y delección del gen *Zeb2*. Finalmente, en la cuarta columna (D, H, L), se presentan las microfotografías de ratones con LMA con delección doble de los genes *Zeb*.



**Figura 23. IHQ *BCL-2*** Microfotografías a 10X de cortes histológicos de médula ósea de ratón, cada una con una barra de escala de 500  $\mu\text{m}$ . Se realizó una inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-*BCL-2*, y los núcleos fueron contrastados con hematoxilina. Las microfotografías de la primera columna (A, E, I) corresponden a ratones con LMA sin delección génica (*Cre*). Las imágenes de la segunda columna (B, F, J) pertenecen a ratones con LMA y delección del gen *Zeb1*. En la tercera columna (C, G, K) se presentan imágenes de ratones con LMA y delección del gen *Zeb2*. La cuarta columna (D, H, L) muestra los cortes de ratones con LMA donde se han eliminado ambos genes *Zeb* (*Doble*).



**Figura 24. IHQ *CD34*.** Se muestran microfotografías con un aumento de 10x de cortes histológicos de médula ósea de ratón, cada una con una barra de escala de 500  $\mu\text{m}$ . Se efectuó una inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo anti-*CD34* y se contrastaron los núcleos con hematoxilina. Las imágenes de la primera columna (A, E, I) corresponden a ratones con LMA sin delección génica (Cre). Las de la segunda columna (B, F, J) pertenecen a ratones con LMA y delección del gen *Zeb1*. La tercera columna (C, G, K) incluye las microfotografías de ratones con LMA y delección del gen *Zeb2*. Finalmente, en la cuarta columna (D, H, L) se presentan los cortes de ratones con LMA en los que se han eliminado ambos genes *Zeb* (Doble).

## Discusión

La leucemia mieloide aguda (LMA) es una enfermedad que interfiere con la maduración y diferenciación del tejido hematopoyético, ocasionando síntomas que pueden llevar a la muerte. Dada su rápida progresión y heterogeneidad, un diagnóstico temprano y una estratificación adecuada son cruciales para mejorar la expectativa de vida y la eficacia del tratamiento [81]. Según GLOBOCAN, su prevalencia es de 11 casos por cada 100.000 habitantes. La OMS en 2016 enfatizó la importancia de las mutaciones genéticas para clasificar los subtipos de LMA [6]. Por tanto, es vital identificar variantes genéticas como predictores de progresión de la enfermedad y también como posibles blancos terapéuticos. [72] [82].

Los genes *Zeb*, que codifican para factores de transcripción Zinc finger E-box-binding, juegan un rol importante en el desarrollo de la LMA, aunque su función exacta como oncogenes o genes supresores de tumores no está completamente definida. Estos genes están implicados en la transición epitelio-mesenquimal y tienen un papel significativo en la inmunidad. Un aumento en su expresión dentro de un contexto cancerígeno puede resultar en quiescencia celular y resistencia tumoral, disminuyendo la supervivencia del paciente [72] [83-85]. De lo anterior se desprende lo siguiente: ¿por qué estos factores son importantes en leucemia?

Según la literatura disponible, cada uno de estos factores de transcripción puede actuar de manera independiente o en conjunto, teniendo distintos efectos según el contexto, pudiendo funcionar como oncogenes o supresores de tumores [72, 86]. En este estudio, en el marco de la leucemia mieloide aguda "*in vivo*", analizamos tejidos de ratones con LMA condicional para *Zeb1*, *Zeb2* o ambos, incluyendo el control *Cre-only*, para examinar el impacto de la ausencia de estos loci poco estudiados en la progresión, desarrollo y metástasis de la LMA. El objetivo es reforzar la caracterización de esta enfermedad, basándonos en los hallazgos recientes sobre los factores de transcripción *Zeb* y evaluar la robustez del método más utilizado actualmente para generar LMA "*in vivo*", propuesto por Jun Lu en 2019 [78]

Nuestros hallazgos sobre la estandarización del método utilizado para inducir leucemia concuerdan con la literatura existente, demostrando que es posible generar LMA solo en los ratones sometidos al procedimiento recomendado con irradiación de médula ósea. En los especímenes no irradiados, se observó una regresión en la progresión de la LMA a partir de la semana 18, presumiblemente debido a la respuesta inmune de los ratones que eliminó las células leucémicas inoculadas [87, 88], ya que como se ha comprobado en estudios anteriores, linfocitos T provenientes de ratones inmunocompetentes poseen un fuerte efecto antileucémico [89], y los neutrófilos maduros ocasionan un efecto apoptótico en líneas celulares de leucemia mieloide y linfoide [90].

Al estudiar las características citológicas de los tejidos, encontramos hiperplasia medular y un aumento en la presencia de blastos bajo condiciones de LMA, junto con una amplia variedad de granulocitos, monoblastos y precursores sanguíneos (**Fig 18-19**), lo que corresponde a características de LMA M5a, M5b o *mixed-leukemia* [3, 10]. La eliminación de los genes *Zeb* mostró que, en ausencia de *Zeb1*, se incrementa la segmentación nuclear, favoreciendo la maduración de neutrófilos. Dado que la neutropenia y eritropenia son síntomas típicos de la leucemia [91], aunque el mecanismo por el cual *Zeb1* regula la maduración de los neutrófilos no está totalmente explicado, nuestros resultados sugieren que este factor de transcripción podría estar implicado en la inhibición de la maduración de este linaje sanguíneo. Por otro lado, la expresión de *Zeb2* tiene una relación inversamente proporcional con la maduración de eritrocitos (**Fig 17 B y C**). Aunque estudios previos sugirieron que la eliminación de *Zeb2* podría afectar la maduración de los glóbulos rojos [92], nuestros hallazgos indican lo contrario en el contexto de LMA (**Fig 17**), observándose un aumento positivo en la maduración tanto de neutrófilos como de eritrocitos con la eliminación de ambos genes *Zeb*.

Las células tumorales utilizan la transición epitelio-mesenquimatosa (EMT por sus siglas en inglés *epithelial to mesenchymal transition*) para promover la invasión y metástasis, modificando genes de la matriz extracelular y activando factores de transcripción como *Snail*, *Twist* y *Zeb*, con citocinas inflamatorias como *TNF $\alpha$* , *IL-1*, *IL-8*, *IL-6*, *TGF $\beta$*  desempeñando un papel crucial [93]. Existe evidencia de que un aumento en la expresión de *Zeb2* podría intensificar la EMT, alterando la expresión de cadherinas y, por ende, facilitando la metástasis [94-96]. Esto se refleja en nuestros estudios histopatológicos, que muestran una disminución significativa de células metastásicas en el tejido hepático tras la eliminación de *Zeb2* (**Figura 21**). La infiltración observada alrededor de tejidos endoteliales corresponde a blastos aberrantes de la médula ósea que, favorecidos por la EMT mediada por *Zeb2*, migraron al torrente sanguíneo y se alojaron en estos tejidos. Se destaca la importancia diferencial de *Zeb1* y *Zeb2*, siendo este último más crucial para potenciar la metástasis.

Las alteraciones estructurales e histológicas inducidas por la LMA se observan principalmente en la médula ósea, tejido esencial para el desarrollo hematopoyético. Por ello, la biopsia de médula ósea es el estándar dorado para el diagnóstico de LMA, caracterizada por un aumento en blastos, hiper celularidad medular, falta de maduración de los linajes sanguíneos, aberraciones nucleares y procesos de apoptosis o necrosis, además de la positividad a marcadores IHQ como *CD34* para LMA tipo M5 o *CD42* para LMA megacarioblástica. Nuestro análisis histológico indica que la delección de los genes *Zeb* modifica estas características patológicas, reduciendo la hiper celularidad y promoviendo la maduración celular (**Figura 17-20**). Otros hallazgos, obtenidos mediante técnicas de aprendizaje automático, sugieren un aumento en la maduración celular y una regresión en la progresión de la enfermedad con la delección de *Zeb1*, *Zeb2* o ambos (**Figura 20 B**).

Para complementar el análisis morfológico, realizamos tres inmunohistoquímicas para verificar la presencia de blastos y la expresión de fenotipos aberrantes (**Figuras 22-23-24**). Contrariamente a algunos estudios que reportan una escasa presencia de *CD3* en la mayoría de casos de LMA [97], nuestra histología mostró una positividad leve para *CD3*, que se intensificó en los fenotipos *Zeb2* y Doble. Esto podría indicar que la frecuencia de *CD3* en la LMA es mayor de lo estimado, y que la LMA podría presentar una expresión aberrante de marcadores de linaje linfocítico, lo que generalmente se asocia con un pronóstico desfavorable y una menor supervivencia [98]. Aunque aún falta evidencia que demuestre que la ausencia de los genes *Zeb* pueda afectar la supervivencia.

La inmunohistoquímica contra *BCL-2*, un marcador específico para el linfoma de células B que también puede expresarse en casos de LMA [99], mostró una positividad moderada en todos los fenotipos. Lo anterior podría explicar porque el fármaco venetoclax, un inhibidor altamente selectivo de la proteína *BCL-2*, ha demostrado ser eficaz como tratamiento durante las fases iniciales de LMA, pero con una alta tasa de recidiva, ya que no todas las células de LMA recurren a esta proteína para sobrevivir. [7, 100, 101]. Por último, el marcador *CD34*, fiable para la detección de blastos [102, 103] no mostró diferencias significativas entre los fenotipos, aunque la exposición prolongada automática a los protocolos de tinción podría haber afectado algunos resultados.

En resumen, la reducción de varias características clínicas e histopatológicas de la médula ósea resalta la importancia de los genes *Zeb* en la progresión de la LMA, reforzando su potencial como blancos de estudio y enfoques terapéuticos. Futuras investigaciones podrían ampliar estos hallazgos y esclarecer la compleja interacción de estos genes con las vías de señalización y otros factores de transcripción involucrados. Es crucial reconocer que aún se necesita más información para validar estos hallazgos completamente, ya que las características citológicas de la médula ósea, incluso comparadas con controles sanos, aún presentan anomalías, como una abundancia de células aberrantes y cuerpos envejecidos atrapados en el tejido. No obstante, la delección de los genes *Zeb*, especialmente *Zeb2* o la combinación de ambos, parece revertir casi completamente el fenotipo de la LMA en términos de invasión y en gran medida en la médula ósea, incluyendo características de mal pronóstico como la hiper celularidad y la diferenciación celular, proponiéndose los genes *Zeb*s como un nuevo blanco terapéutico en la LMA.

## Conclusión y proyecciones

La LMA es una patología de naturaleza multifactorial y compleja, estrechamente ligada al fondo genético del individuo. Esta conexión ha elevado la importancia de su caracterización genética, sobre todo en tiempos recientes, convirtiéndola en un pilar fundamental para la clasificación y el abordaje terapéutico de la enfermedad.

Los resultados de nuestras investigaciones avalan y confirman estas premisas, destacando la relevancia del sistema inmunológico tanto en la progresión como en la regresión de la LMA, añadiéndolo como otro elemento crucial al abordar el estudio de la LMA. Este aspecto cobra especial importancia en la evaluación de la eficacia de los modelos *in vivo* para el estudio de la LMA.

Además, es imperativo resaltar la trascendencia de los genes Zeb como loci candidatos en el análisis de la LMA. Nuestros estudios han verificado cómo estos genes inciden directamente en la manifestación de varias características fenotípicas malignas asociadas con el avance de la LMA. Estos hallazgos respaldan nuestra hipótesis de que la detección de mutaciones clonales en modelos de LMA posibilitará una correcta estratificación de sus subtipos y la identificación de nuevos blancos terapéuticos, situando a los genes Zeb como objetivos potenciales para investigaciones futuras con enfoques terapéuticos.

En última instancia, es fundamental complementar nuestros estudios con más investigaciones. Proponemos la generación de un modelo *in vivo* de AML que mantenga las características actuales pero que incluya la evaluación de la supervivencia mediante experimentos de Kaplan-Meier. Asimismo, se sugiere la exploración de marcadores adicionales que interactúen estrechamente con los genes de transcripción Zeb y la ampliación del estudio histológico a tejidos que podrían estar involucrados en la metástasis y progresión de la LMA.

## Referencias

1. Martínez-Sanguinetti, M.A., Petermann-Rocha, Fanny, Villagrán, Marcelo, Ulloa, Natalia, Nazar, Gabriela, Troncoso-Pantoja, Claudia, Garrido-Méndez, Alex, Mardones, Lorena, Lanuza, Fabián, Leiva, Ana María, Lasserre-Laso, Nicole, Martorell, Miquel, & Celis-Morales, Carlos. , *Desde una mirada global al contexto chileno: ¿Qué factores han repercutido en el desarrollo de obesidad en Chile? (Parte 2)*. Revista chilena de nutrición, , 2020. **47**(2): p. 307-316.
2. Arber DA, O.A., Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, Bloomfield CD, Cazzola M, Vardiman JW., *The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia*. 19 ed. Vol. 127. 2016, blood.
3. Chennamadhavuni A, L.V., Mukkamalla SKR, Shimanovsky A. , *Leukemia*. 2023, StatPearls.
4. Davis AS, V.A., Mead MD., *Leukemia: an overview for primary care*. . Am Fam Physician, 2014. **1;89**(9): p. 731-8.
5. Mewawalla1., A.V.P., *Acute Myeloid Leukemia*. 2023, StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): A service of the National Library of Medicine, National Institutes of Health.
6. GLOBOCAN, *estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. 2018: , CA Cancer J Clin: Erratum: Global cancer statistics 2018:.
7. Glytsou C, C.X., Zacharioudakis E, Al-Santli W, Zhou H, Nadorp B, Lee S, Lasry A, Sun Z, Papaioannou D, Cammer M, Wang K, Zal T, Zal MA, Carter BZ, Ishizawa J, Tibes R, Tsigirigos A, Andreeff M, Gavathiotis E, Aifantis I. Mitophagy Promotes Resistance to BH3 Mimetics in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Discov*. 2023 Jul 7;13(7):1656-1677. doi: 10.1158/2159-8290.CD-22-0601. PMID: 37088914; PMCID: PMC10330144., *Mitophagy Promotes Resistance to BH3 Mimetics in Acute Myeloid Leukemia*. *Cancer Discov*, 2023. **7**(13): p. 1656-1677.
8. Griffin P. Rodgers, N.S.Y., *Leucemia aguda mieloblástica*. 4 ed. Bethesda manual de hematología clínica, ed. V.M.e. Christoher S. Vol. 1. 2019, Wolters Kluwer. : Christoher S, Vera M (ed). 148-167.
9. Amin KS, E.A., McGuff HS, Albright SC, *Minimally differentiated acute myelogenous leukemia (LMA-M0) granulocytic sarcoma presenting in the oral cavity*. *Oral Oncol*, 2002. **5**(38): p. 516-9.
10. Tallman MS, K.H., Paietta E, Bennett JM, Dewald G, Cassileth PA, Wiernik PH, Rowe JM; Eastern Cooperative Oncology Group., *Acute monocytic leukemia (French-American-British classification M5) does not have a worse prognosis than other subtypes of acute myeloid leukemia*. *J Clin Oncol*. 2004, 2004. **1;22**(7): p. 1276-86.
11. De Rossi G, A.G., Coluzzi S, Fenu S, LoCoco F, Lopez M, Nanni M, Pasqualetti D, Mandelli F., *Immunological definition of acute promyelocytic leukemia (FAB M3): a study of 39 cases*. *Eur J Haematol.*, 1990. **45**(3): p. 168-71.

12. Randolph, T., *Acute promyelocytic leukemia (LMA-M3)--Part 2: Molecular defect, DNA diagnosis, and proposed models of leukemogenesis and differentiation therapy*. Clin Lab Sci 2000 Spring, 2000b. **13**(2): p. 106-16.
13. Randolph, T., *Acute promyelocytic leukemia (LMA-M3)--Part 1: Pathophysiology, clinical diagnosis, and differentiation therapy*. Clin Lab Sci Spring, 2000a. **13**(2): p. 98-105.
14. Verschuur, A.C., <https://doi.org/10.3389/fped.2022.911093>. orphanet Encyclopedia, 2004.
15. Verschuur, A.C., *Acute myelomonocytic Leukemia*. Orphanet Encyclopedia, 2004.
16. Varotto E, M.E., Stefanachi F, Della Torre F, Buldini B., *Diagnostic challenges in acute monoblastic/monocytic leukemia in children*. Front Pediatr., 2022. **29**;10.
17. Cervera N, L.A., Adélaïde J, Guille A, Murati A, Mozziconacci MJ, Vey N, Birnbaum D, Gelsi-Boyer V., *Acute erythroid leukemias have a distinct molecular hierarchy from non-erythroid acute myeloid leukemias*. Haematologica., 2020. **105**(7): p. 340-342.
18. Santos FP, F.S., Garcia-Manero G, Koller C, Beran M, O'Brien S, Pierce S, Freireich EJ, Huang X, Borthakur G, Bueso-Ramos C, de Lima M, Keating M, Cortes J, Kantarjian H, Ravandi F. *Adult acute erythroleukemia: an analysis of 91 patients treated at a single institution*. Leukemia. 2009 Dec;23(12):2275-80. doi: 10.1038/leu.2009.181. Epub 2009 Sep 10. PMID: 19741728; PMCID: PMC4217206., *Adult acute erythroleukemia: an analysis of 91 patients treated at a single institution*. . Leukemia, 2009. **23**(12): p. 2275-80.
19. Dima D, O.L., Rosu AM, Trifa A, Selicean C, Moisoiu V, Frinc I, Zdrengea M, Tomuleasa C. , *Adult acute megakaryoblastic leukemia: rare association with cytopenias of undetermined significance and p210 and p190 BCR-ABL transcripts*. Onco Targets Ther, 2017. **19**;10: p. 5047-5051.
20. Gassmann W, L.H., *Acute megakaryoblastic leukemia*. Leuk Lymphoma., 1995. **18**(1): p. 69-73.
21. DA., A., *The 2016 WHO classification of acute myeloid leukemia: What the practicing clinician needs to know*. Hematol. 2019. **56**(2): p. 90-95.
22. SM., H., *Classification of acute myeloid leukemia*. Blood Res. 2020, 2020. **31**;55(S1): p. S1-S4.
23. Vardiman JW, T.J., Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellström-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD., *The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes*. . Blood., 2009. **39**;114(5): p. 937-51.
24. van Galen P, H.V., Wadsworth Li MH, Hughes TK, Griffin GK, Battaglia S, Verga JA, Stephansky J, Pastika TJ, Lombardi Story J, Pinkus GS, Pozdnyakova O, Galinsky I, Stone RM, Graubert TA, Shalek AK, Aster JC, Lane AA, Bernstein BE, *Single-Cell RNA-Seq Reveals LMA Hierarchies Relevant to Disease Progression and Immunity*. . Cell, 2019. **176**(6): p. 1265-1281.
25. Lagunas-Rangel FA, C.-V.V., Gómez-Guijosa MÁ, Cortes-Penagos C., *Acute Myeloid Leukemia-Genetic Alterations and Their Clinical Prognosis*. Int J Hematol Oncol Stem Cell Res 2017, 2017. **1**:11(4): p. 328-339.

26. Stetson LC, B.D., Ribeiro SP, Stefan T, Gupta K, Xu X, Fourati S, Roe A, Jackson Z, Schauner R, Sharma A, Tamilselvan B, Li S, de Lima M, Hwang TH, Balderas R, Sauntharajah Y, Maciejewski J, LaFramboise T, Barnholtz-Sloan JS, Sekaly RP, Wald DN., *Single cell RNA sequencing of LMA initiating cells reveals RNA-based evolution during disease progression*. *Leukemia* 2021, 2021. **35**(10): p. 2799-2812.
27. DiNardo CD, C.J., *Mutations in LMA: prognostic and therapeutic implications*. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2016, 2016. **2:2026**(1): p. 348-355.
28. Padmakumar D, C.V., Gopinath P, Vimala Devi ART, Anitha GRJ, Sreelatha MM, Padmakumar A, Sreedharan H., *A concise review on the molecular genetics of acute myeloid leukemia*. *Leuk Res*. 2021, 2021. **111**.
29. Yu J, L.Y., Zhang D, Wan D, Jiang Z., *Clinical implications of recurrent gene mutations in acute myeloid leukemia*. *Exp Hematol Oncol*, 2020. **27;9**(4).
30. Schneidawind C, J.J., Schneidawind D, Kim IS, Duque-Afonso J, Wong SHK, Iwasaki M, Breese EH, Zehnder JL, Porteus M, Cleary ML., *MLL leukemia induction by t(9;11) chromosomal translocation in human hematopoietic stem cells using genome editing*. *Blood Adv*, 2018. **24;2**(8): p.:832-845.
31. De Boer J, W.-V.V., Williams O., *In focus: MLL-rearranged leukemia*. *Leukemia*., 2013. **27**(6): p. 1224–8.
32. Heuts BMH, A.-A.S., Alkema SG, Tijchon E, Jussen L, Bergevoet SM, van der Reijden BA, Martens JHA., *Inducible MLL-AF9 Expression Drives an LMA Program during Human Pluripotent Stem Cell-Derived Hematopoietic Differentiation*. *Cells*. 2023, 2023. **20;12**(8): p. 1195.
33. Marschalek, R., *MLL*. Elsevier, 2017.
34. Winters AC, B.K., *MLL-Rearranged Leukemias-An Update on Science and Clinical Approaches*. *Front Pediatr*. 2017, 2017. **9;5**:4.
35. Almotiri A, A.H., Menendez-Gonzalez JB, Abdelfattah A, Alotaibi B, Saleh L, Greene A, Georgiou M, Gibbs A, Alsayari A, Taha S, Thomas LA, Shah D, Ekins S, Giles P, Stemmler MP, Brabletz S, Brabletz T, Boyd AS, Siebzehnrubl FA, Rodrigues NP. , *Zeb1 modulates hematopoietic stem cell fates required for suppressing acute myeloid leukemia*. *J Clin Invest*. 2021, 2021. **131**(1): p. 129115.
36. Schoch C, S.S., Klaus M, Kern W, Hiddemann W, Haferlach T., *LMA with 11q23/MLL abnormalities as defined by the WHO classification: incidence, partner chromosomes, FAB subtype, age distribution, and prognostic impact in an unselected series of 1897 cytogenetically analyzed LMA cases*. *blood* 2003, 2003. **1;102**(7): p. 2395-402.
37. Hagag AA, S.S., El-Fadaly NH., *Frequency of 11q23/MLL gene rearrangement in Egyptian childhood acute myeloblastic leukemia: Biologic and clinical significance*. *South Asian J Cancer*. 2014, 2014. **3**(4): p. 206-8.
38. Stubbs MC, K.A., *Murine Retrovirally-Transduced Bone Marrow Engraftment Models of MLL-Fusion-Driven Acute Myelogenous Leukemias (LMA)*. *Curr Protoc Pharmacol*. 2017, 2017. **11;78**: p. 14.42.1-14.42.19.
39. Chen, S.-L.Q., Z.-Y.; Hu, F.; Wang, Y.; Dai, Y.-J.; Liang, Y., *The Role of the HOXA Gene Family in Acute Myeloid Leukemia*. *Genes* 2019, 2019. **10**: p. 621.

40. Iacobucci I, M.C., *KMT2A-rearranged leukemia: the shapeshifter*. *blood*, 2022. **27;140**(17): p. 1833-1835.
41. Thiel AT, B.P., Zou T, Feather D, Wu X, Yan J, Zhang H, Liu Z, Ernst P, Koretzky GA, Hua X., *MLL-AF9-induced leukemogenesis requires coexpression of the wild-type Mll allele*. *Cancer Cell*. 2010 2010. **17;17**(2).
42. Slany., R.K., *The molecular biology of mixed lineage leukemia*. *Haematologica* 2009, 2009. **94**(7): p. 984-993;.
43. Vedadi M, B.L., Eram MS, Barsyte-Lovejoy D, Arrowsmith CH, Hajian T., *Targeting human SET1/MLL family of proteins*. *Protein Sci*. 2017, 2017 **26**(4): p. 662-676.
44. Yang, W., Ernst, P., *SET/MLL family proteins in hematopoiesis and leukemia*. *Int J Hematol* 2017. **105**: p. 7–16.
45. Cosgrove MS, P.A., *Mixed lineage leukemia: a structure-function perspective of the MLL1 protein*. . *FEBS J*. 2010, 2010. **277**(8): p. 1832-42.
46. RK., S., *he molecular biology of mixed lineage leukemia*. *Haematologica*. 2009, 2009. **94**(7): p. 984-93.
47. Kabra A, B.J., *The Intrinsically Disordered Proteins MLLT3 (AF9) and MLLT1 (ENL) - Multimodal Transcriptional Switches With Roles in Normal Hematopoiesis, MLL Fusion Leukemia, and Kidney Cancer*. *J Mol Biol*. 2022 Jan, 2022. **15;434**(1): p. 167117.
48. GeneCards., *MLLT3 Gene*. *GeneCards*. 2023.
49. Olsen SN, G.L., Healy JP, Choi YA, Kai Y, Hatton C, Perner F, Haarer EL, Nabet B, Yuan GC, Armstrong SA. , *MLL::AF9 degradation induces rapid changes in transcriptional elongation and subsequent loss of an active chromatin landscape*. *Mol Cell*. 2022, 2022. **17;82**(6): p. 1140-1155.
50. Yi, Y., Ge, S. , *Targeting the histone H3 lysine 79 methyltransferase DOT1L in MLL-rearranged leukemias*. *J Hematol Oncol*, 2022. **15**: p. 35.
51. Stavropoulou V, P.A., Schwaller J. , *Aggressive leukemia driven by MLL-AF9*. *Mol Cell Oncol*. 2017, 2017. **23;5**(3): p. 1241854.
52. Francis, J.C., Gardiner, J.R., Renaud, Y. et al., *HOX genes promote cell proliferation and are potential therapeutic targets in adrenocortical tumours*. *Br J Cancer*, 2021. **124**: p. 805–816.
53. Ikeda D, C.S., Uchiyama S, Nakamura H, Guo YM, Yamauchi N, Yuda J, Minami Y., *Molecular Classification and Overcoming Therapy Resistance for Acute Myeloid Leukemia with Adverse Genetic Factors*. *Int J Mol Sci*. 2022, 2022. **25;23**(11): p. 5950.
54. Myers, P.H.g.i.d.T.H.c.N.E., [http://scienceblogs.com/pharyngula/2007/09/the\\_hox\\_code.php](http://scienceblogs.com/pharyngula/2007/09/the_hox_code.php) *Hox genes in development: The Hox code*. . *Nature Education*, 2008. **1**(1): p. 2.
55. Hubert KA, W.D., *Hox genes in development and beyond*. . *Development*. 2023, 2023. **1;150**(1): p. 192476.
56. Kramer MH, Z.Q., Sprung R, Day RB, Erdmann-Gilmore P, Li Y, Xu Z, Helton NM, George DR, Mi Y, Westervelt P, Payton JE, Ramakrishnan SM, Miller CA, Link DC, DiPersio JF, Walter MJ, Townsend RR, Ley TJ. , *Proteomic and phosphoproteomic landscapes of acute myeloid leukemia*. *Blood.*, 2022. **149**(13): p. 1533-1548.

57. Ley TJ, M.C., Ding L, Raphael BJ, Mungall AJ, Robertson A, Hoadley K, Triche TJ Jr, Laird PW, Baty JD, Fulton LL, Fulton R, Heath SE, Kalicki-Veizer J, Kandoth C, Klco JM, Koboldt DC, Kanchi KL, Kulkarni S, Lamprecht TL, Larson DE, Lin L, Lu C, McLellan MD, McMichael JF, Payton J, Schmidt H, Spencer DH, Tomasson MH, Wallis JW, Wartman LD, Watson MA, Welch J, Wendl MC, Ally A, Balasundaram M, Birol I, Butterfield Y, Chiu R, Chu A, Chuah E, Chun HJ, Corbett R, Dhalla N, Guin R, He A, Hirst C, Hirst M, Holt RA, Jones S, Karsan A, Lee D, Li HI, Marra MA, Mayo M, Moore RA, Mungall K, Parker J, Pleasance E, Plettner P, Schein J, Stoll D, Swanson L, Tam A, Thiessen N, Varhol R, Wye N, Zhao Y, Gabriel S, Getz G, Sougnez C, Zou L, Leiserson MD, Vandin F, Wu HT, Applebaum F, Baylin SB, Akbani R, Broom BM, Chen K, Motter TC, Nguyen K, Weinstein JN, Zhang N, Ferguson ML, Adams C, Black A, Bowen J, Gastier-Foster J, Grossman T, Lichtenberg T, Wise L, Davidsen T, Demchok JA, Shaw KR, Sheth M, Sofia HJ, Yang L, Downing JR, Eley G. , *Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia*. Cancer Genome Atlas Research Network, 2023.
58. EH., E., *Acute myeloid leukemia: 2019 update on risk-stratification and management*. Am J Hematol, 2019. **93**(10): p. 1267-1291.
59. Shimony S, S.M., Stone RM. , *Acute myeloid leukemia: 2023 update on diagnosis, risk-stratification, and management*. Am J Hematol., 2023. **98**(3): p. 502-526.
60. Pich O, C.-B.A., Muiños F, Pratcorona M, Gonzalez-Perez A, Lopez-Bigas N., *The evolution of hematopoietic cells under cancer therapy*. Nat Commun. 202, 2021. **12**(1): p. 4803.
61. Anand U, D.A., Chandel AKS, Sanyal R, Mishra A, Pandey DK, et al *Cancer chemotherapy and beyond: Current status, drug candidates, associated risks and progress in targeted therapeutics*. Genes Dis., 2023. **10**(4): p. 1367–401.
62. Rego EM, J.R., *Epidemiology and treatment of acute promyelocytic leukemia in latin america*. Mediterr J Hematol Infect Dis, 2011. **3**(1): p. 2011049.
63. Alvarez S, B.W., Gronemeyer H, de Lera AR. , *Retinoic acid receptor modulators: a perspective on recent advances and promise*. Expert Opin Ther Pat., 2011. **21**(1): p. 55-63.
64. Cowell IG, A.C., *DNA fragility at the KMT2A/MLL locus: insights from old and new technologies*. Open Biol, 2023. **13**(1): p. 220232.
65. Earnest KG, M.E., Hassan EM, Wunderlich M, Hosseinpour B, Bono BS, et al. , . *Development and characterization of a DNA aptamer for MLL-AF9 expressing acute myeloid leukemia cells using whole cell-SELEX*. Sci Rep. , 2021. **11**(1): p. 19174.
66. Vandewalle C, V.R.F., Berx G., *The role of the ZEB family of transcription factors in development and disease*. Cell Mol Life Sci. 2009 2009. **66**(5): p. 773-87.
67. Suresh Chava, M.B.G., Aramati B.M. Reddy,, *Chapter 3 - EMT Contributes to Chemoresistance in Pancreatic Cancer*,. Academic Press,, 2019. **5**: p. 25-43.
68. Wu, H., Zhong, HT., Li, GW., *Oncogenic functions of the EMT-related transcription factor ZEB1 in breast cancer*. Transl Med, 2020. **18**: p. 51.
69. Postigo AA, D.D., *ZEB represses transcription through interaction with the corepressor CtBP*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999, 1999. **96**(12): p. 6683-8.

70. Stanislav Drápela<sup>1, 3</sup> Jan Bouchal<sup>4</sup> Mohit Kumar Jolly<sup>5</sup> Zoran Culig<sup>2,6</sup> Karel Souček<sup>1,2,3\*</sup>, *ZEB1: A Critical Regulator of Cell Plasticity, DNA Damage Response, and Therapy Resistance*. *Front. Mol. Biosci.*, 19 March 2020

Sec. Molecular Diagnostics and Therapeutics, 2020. **7**.

71. Kroll, A.A.P.J.L.D.J.J.T.K.L., *Regulation of Smad signaling through a differential recruitment of coactivators and corepressors by ZEB proteins*. *The EMBO Journal* (2003, 2003. **22**: p. 2453-2462.
72. Soen B, V.N., Berx G, Schwaller J, Van Vlierberghe P, Goossens S., *ZEB Proteins in Leukemia: Friends, Foes, or Friendly Foes?* *Hemasphere.* , 2018. **2**(3): p. 43.
73. Park MK, L.H., Lee CH. , *ost-Translational Modification of ZEB Family Members in Cancer Progression*. *Int J Mol Sci*, 2022. **23**(23): p. 15127.
74. Bruneel, K.V., J.; Vandamme, N.; Berx, G. , *Intrinsic Balance between ZEB Family Members Is Important for Melanocyte Homeostasis and Melanoma Progression*. *Cancers* 2020, 2020. **12**: p. 2248.
75. Sánchez-Tilló E, S.L., de Barrios O, Cuatrecasas M, Vaquero EC, Castells A, Postigo A. , *Expanding roles of ZEB factors in tumorigenesis and tumor progression*. *Am J Cancer Res*. 2011, 2011. **1**(7): p. 897-912.
76. Carmichael CL, W.J., Nguyen T, Kolawole O, Benyoucef A, De Mazière C, Milne AR, Samuel S, Gillinder K, Hediye-Zadeh S, Vo ANQ, Huang Y, Knezevic K, McInnes WRL, Shields BJ, Mitchell H, Ritchie ME, Lammens T, Lintermans B, Van Vlierberghe P, Wong NC, Haigh K, Thoms JAI, Toulmin E, Curtis DJ, Oxley EP, Dickins RA, Beck D, Perkins A, McCormack MP, Davis MJ, Berx G, Zuber J, Pimanda JE, Kile BT, Goossens S, Haigh JJ., *The EMT modulator SNAI1 contributes to LMA pathogenesis via its interaction with LSD1*. *Blood*. 2020, 2020. **136**(8): p. 957-973.
77. Hubo Li, B.G.M., Huadi Zhang, Rishi V. Puram, Francisca Vazquez, Barbara A. Weir, William C. Hahn, Benjamin Ebert, David Pellman, *The EMT regulator ZEB2 is a novel dependency of human and murine acute myeloid leukemia*. *Blood* 2017. **129**(4): p. 497–508.
78. Jun Lu, H.Z., Lingling Yang, Xi Jiang, *Protocol to establish a stable MLL-AF9\_LMA mouse model*. *Cell press star protocol*, 2022.
79. Dickinson AL, L.M., Flecknell PA. , *The analgesic effects of oral paracetamol in two strains of mice undergoing vasectomy*. *Laboratory Animals*. Sage journals, 2009. **43**(4): p. 357-361.
80. Carstens E, M.G., *Recognizing pain and distress in laboratory animals*. *ILAR J*, 2000. **41**(2): p. 62-71.
81. Cull EH, A.J., *Contemporary treatment of APL*. *Curr Hematol Malig Rep*, 2014. **9**(2): p. 193-201.
82. Erin N, G.J., Brozovic A, Efferth T. *Tumor microenvironment and epithelial mesenchymal transition as targets to overcome tumor multidrug resistance*. *Drug Resist Updat*. 2020 Dec;53:100715. doi: 10.1016/j.drug.2020.100715. Epub 2020 Jun 20. PMID: 32679188., *Tumor microenvironment and epithelial mesenchymal transition as targets to overcome tumor multidrug resistance*. *Drug Resist Updat*. 2020, 2020. **53**: p. 100715.

83. Scott CL, O.K., *ZEBs: Novel Players in Immune Cell Development and Function*. Trends Immunol, 2019. **0**(5): p. 431-446.
84. Gheldof A, H.P., van Roy F, De Craene B, Berx G. , *Evolutionary functional analysis and molecular regulation of the ZEB transcription factors*. Cell Mol Life Sci., 2012. **69**(15): p. 2527-41.
85. Radhakrishnan K, T.L., Carmichael CL., *An "unexpected" role for EMT transcription factors in hematological development and malignancy*. Front Immunol, 2023. **3**(4): p. 1207360.
86. Xie C, L.G., Li M, Fang Y, Qian K, Tang Y, Wu X, Lei X, Li X, Liu Q, Liu G, Liu J, Zhang Y, Huang Z, Hu Z, Cao Z, Hu J, Huang S, Zhong D, Huang J, Wu F, Wang J, Mori M, Yamamoto H, Wang J, Xu X. , *argeting TRPV1 on cellular plasticity regulated by Oval 2 and Zeb 1 in hepatocellular carcinoma*. . Biomed Pharmacother., 2019. **118**: p. 109270.
87. Almosailekh M, S.J., *Murine Models of Acute Myeloid Leukaemia*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(2): p. 453.
88. Kim DY, L.S., Kim DY, Lee JY. , *Effective Murine Model Induction for Niche Study in Immune Cells Against Leukemia*. Adv Exp Med Biol. , 2020. **1232**: p. 415-420.
89. McArthur K, D.C.A., Segal D, Lackovic K, Wilks AF, O'Donnell JA, Nowell CJ, Gerlic M, Huang DCS, Burns CJ, Croker BA., *Defining a therapeutic window for kinase inhibitors in leukemia to avoid neutropenia*. Oncotarget, 2017. **8**(35): p. 57948-5796.
90. Johnson BD, T.R.D.i.o.i.d.c.a.b.m.t.b.g.-h.t.a.f.p.a.r.w.s.g.-v.-h.d.B., *Delayed infusion of immunocompetent donor cells after bone marrow transplantation breaks graft-host tolerance allows for persistent antileukemic reactivity without severe graft-versus-host disease*. Blood., 1995. **85**(11): p. 3302-12.
91. Peseski AM, M.M., Green SD, Beeler C, Konig H., *Management of fever and neutropenia in the adult patient with acute myeloid leukemia*. Expert Rev Anti Infect Ther, 2021. **19**(3): p. 359-378.
92. Li J, R.T., Goossens S, Carrillo García C, Szczepanski S, Brandes M, Pieters T, Dobrosch L, Gütgemann I, Farla N, Radaelli E, Hulpiau P, Mallela N, Fröhlich H, La Starza R, Matteucci C, Chen T, Brossart P, Mecucci C, Huylebroeck D, Haigh JJ, Janzen V., *The EMT transcription factor Zeb2 controls adult murine hematopoietic differentiation by regulating cytokine signaling*. Blood., 2017. **129**(4): p. 460-472.
93. Chattopadhyay I, A.R., Gundamaraju R., *Exploring the Crosstalk between Inflammation and Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer*. Mediators Inflamm, 2021.
94. Schaal C, P.S., Chellappan SP., *The Rb-E2F transcriptional regulatory pathway in tumor angiogenesis and metastasis*. . Adv Cancer Res. 2014;121:147-182. doi: 10.1016/B978-0-12-800249-0.00004-4. PMID: 24889531., 2014. **121**: p. 147-182.
95. Li C, B.G., *A landscape view on the interplay between EMT and cancer metastasis*. NPJ Syst Biol Appl, 2018. **4**: p. 34.
96. Shousha, W.G., Ramadan, S.S., EL-Saiid, A.S. et al, *Expression and clinical significance of SNAI1 and ZEB1 genes in acute myeloid leukemia patients*. Mol Biol Rep, 2019. **46**: p. 4625–4630.

97. Lewis RE, C.J., Sanders CM, Webb RN, Suggs JL., *Aberrant expression of T-cell markers in acute myeloid leukemia*. *Exp Mol Pathol*, 2007. **83**(3): p. 462-3.
98. Pinheiro LHS, T.L., Costa FO, Silva NL, Sandes AF, Nunes MAP, Correa CB, Almeida CAC, da Cruz GS, de Lyra Junior DP, Schimieguel DM. , *Aberrant Phenotypes in Acute Myeloid Leukemia and Its Relationship with Prognosis and Survival: A Systematic Review and Meta-Analysis*. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res*, 2020. **14**(4): p. 274-288.
99. Wei Y, C.Y., Sun R, Cheng L, Xiong X, Jin X, He X, Lu W, Zhao M. , *Targeting BCL-2 Proteins in Acute Myeloid Leukemia*. *Front Oncol*. 2020 2020. **5**(10): p. 584974.
100. Dhakal P, B.M., Tomasson MH, Sutamtewagul G, Dupuy A, Bhatt VR. , *Acute myeloid leukemia resistant to venetoclax-based therapy: What does the future hold?* *Blood Rev*, 2023. **59**: p. 101036.
101. Zhang Q, R.-G.B., Han L, Jia Y, Lodi A, Zhang H, Ganesan S, Pan R, Konoplev SN, Sweeney SR, Ryan JA, Jitkova Y, Dunner K Jr, Grosskurth SE, Vijay P, Ghosh S, Lu C, Ma W, Kurtz S, Ruvolo VR, Ma H, Weng CC, Ramage CL, Baran N, Shi C, Cai T, Davis RE, Battula VL, Mi Y, Wang J, DiNardo CD, Andreeff M, Tyner JW, Schimmer A, Letai A, Padua RA, Bueso-Ramos CE, Tiziani S, Levenson J, Popovic R, Konopleva M., *Activation of RAS/MAPK pathway confers MCL-1 mediated acquired resistance to BCL-2 inhibitor venetoclax in acute myeloid leukemia*. *Signal Transduct Target Ther*, 2022. **7**(1): p. 51.
102. Maichel-W., C., *Immunohistochemistry in Acute Myeloid Leukemia*. *Methods Mol Biol.*, 2017. **1633**:33-49.
103. Orazi, A., O. , *Histopathology in the diagnosis and classification of acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndromes, and myelodysplastic/myeloproliferative diseases*. *Pathobiology.*, 2007. **74**(2): p. 97-114.