



ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca>

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=es>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

Tesis doctoral

Caracterización transcriptómica y epigenética del linfoma plasmablastico

Míriam Verdú Bou

Directores

Dr. José Tomás Navarro Ferrando

Dra. Maria Joao Gomes Monteiro Lopes Baptista

Tutor

Dr. Roberto Muga Bustamante

Programa de Doctorado en Medicina

Departamento de Medicina

Universitat Autònoma de Barcelona

Barcelona, 2024

ABREVIACIONES

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AGO	<i>Argonaute</i>
ALK	Quinasa de linfoma anaplásico (<i>Anaplastic Lymphoma Kinase</i>)
APC/C	Complejo/ciclosoma promotor de la anafase (<i>Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome</i>)
APS	Persulfato amónico (<i>Ammonium persulfate</i>)
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNnc	ARN no codificante
ARNr	ARN ribosómico
ARNsca	ARN pequeño específico del cuerpo de Cajal
ARNsh	ARN <i>short-hairpin</i>
ARNsno	ARN pequeño nucleolar
ATP	Adenosín trifosfato
BART	<i>BamHI-A region rightward transcript</i>
BCR	Receptor de célula B (<i>B-Cell Receptor</i>)
BHRF1	<i>BamHI-A rightward fragment 1</i>
BSA	Albúmina sérica bovina (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CDK	Ciclina dependiente de quinasa (<i>Cyclin-Dependent Kinases</i>)
CG	Centro germinal
CHOP	Ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona
CP	Célula plasmática
CPC	Complejo cromosómico pasajero (<i>Chromosomal Passenger Complex</i>)
CSR	Recombinación de cambio de clase (<i>Class Switch Recombination</i>)
DE	Diferencialmente expresado
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNMT	Metiltransferasa de ADN (<i>DNA methyltransferase</i>)
dNTP	Trifosfato de desoxiribonucleósido (<i>Deoxynucleotide Triphosphate</i>)
EBER	<i>Epstein-Barr-encoded RNA</i>
EBNA	<i>Epstein-Barr nuclear antigen</i>
ECOG	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
EDTA	Ácido etilendiaminetetraacético (<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
FBS	Suero fetal bovino (<i>Fetal Serum Bovine</i>)
FDR	<i>False discovery rate</i>
FFEP	Fijado en formalina-embebido en parafina
FISH	Hibridación fluorescente <i>in situ</i> (<i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>)
FT	Factor de transcripción
Gb	Gigabase
GDEs	Genes diferencialmente expresados
GO	<i>Gene Ontology</i>
GO-BP	Procesos biológicos de <i>Gene Ontology</i>
GSEA	<i>Gene set enrichment analysis</i>
HE	Hematoxilina-eosina
H3K4	Lisina 4 de la histona 3 (<i>Histone H3 Lysine K4</i>)
HDAC	Histona deacetilasa

Abreviaciones

HHV-8	Herpesvirus humano 8
IAP	Proteína inhibidora de la apoptosis (<i>Inhibitor of Apoptosis Protein</i>)
IC₅₀	Concentración inhibitoria media
Ig	Inmunoglobulina
IHC	Inmunohistoquímica
IL-6	Interleuquina-6
IPI	Índice pronóstico internacional
JAK	Quinasa Janus (<i>Janus kinase</i>)
Kb	Kilobases
kDa	Kilodalton
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
KMT2A-D	Lisina metiltransferasa 2A-D (<i>Lysine methyltransferase 2A-D</i>)
KO	<i>Knock-out</i>
LB	Linfoma de Burkitt
LDA	Ensayo de dilución limitante
LDCGB	Linfoma difuso de célula B grande
LDH	Lactato deshidrogenasa
LH	Linfoma de Hodgkin
LLA-T	Leucemia linfoblástica aguda T
LMP	<i>Latent membrane protein</i>
LNH	Linfoma no-Hodgkin
log₂FC	<i>log₂ Fold Change</i>
LPB	Linfoma plasmablastico
LPC	Linfoma primario de cavidades
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos (<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>)
MCA	Membrana corioalantoidéa
mDE	miARNs diferencialmente expresado
Medio LB	Medio Luria-Bertani
miARN	microARN
MM	Mieloma múltiple
MPB	Mieloma plasmablastico
mTOR	Diana de rapamicina en células de mamífero (<i>mammalian Target of Rapamycin</i>)
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5,-difetil tetrazolio
Mut	Mutado
NF-κB	Factor nuclear potenciador de la cadena ligera kappa de célula B activada (<i>Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>)
NES	<i>Normalized enrichment score</i>
NOS	<i>Not otherwise specified</i>
O/N	Durante la noche (<i>overnight</i>)
OMS	Organización mundial de la salud
p-adj.	p-valor ajustado
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)

PCA	Análisis de componente principal (<i>Principal Component Analysis</i>)
PCEM	Plasmacitoma extramedular
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
RT-qPCR	Transcripción reversa-PCR cuantitativa (<i>Reverse Transcription-quantitative PCR</i>)
PD-1	<i>Programmed death 1</i>
PD-L1	<i>Programmed death-ligand 1</i>
PDX	<i>Patient-derived xenograft</i>
PTLD	Enfermedad linfoproliferativa post-transplante (<i>Post-Transplant Lymphoproliferative Disorder</i>)
RB	Retinoblastoma
RISC	Complejo silenciador inducido por ARN (<i>RNA-Induced silencing complex</i>)
Rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
RQ	Cantidad relativa (<i>Relative Quantity</i>)
SCNA	Alteraciones en el número de copias somáticas (<i>Somatic Copy Number Alterations</i>)
SDS	Dodecil sulfato sódico (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
SG	Supervivencia global
SHM	Hipermutaciones somáticas (<i>Somatic hypermutations</i>)
SIDA	Síndrome de la inmunodeficiencia humana adquirida
STAT	Transductor de señal y activador de proteínas de transcripción (<i>Signal Transducer and Activator of Transcription proteins</i>)
T_{amb}	Temperatura ambiente
TBE	Tris-borato-EDTA
TBS-T	Tampón tris salino con Tween 20 (<i>Tris-buffered saline-Tween 20</i>)
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletildiamina
TET	<i>Ten-eleven translocation</i>
t-MYC	Translocación de <i>MYC</i>
UTR	Región no traducida (<i>Untranslated región</i>)
VEB	Virus de Epstein-Barr
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
vs	<i>Versus</i>
WES	Secuenciación completa del exoma (<i>Whole Exome Secuencing</i>)
WT	<i>Wild-type</i>

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS**1. INTRODUCCIÓN**

Tabla 1. Factores pronósticos incluidos en el índice pronóstico internacional (IPI) .	30
Tabla 2. Diagnóstico diferencial del linfoma plasmablastico	33
Tabla 3. Tratamientos en uso para el tratamiento del linfoma plasmablastico (LPB)	46
Tabla 4. Estrategias terapéuticas alternativas	48

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 5. Medios de cultivo usados en los diversos experimentos <i>in vitro</i> .	97
Tabla 6. Composición de la mezcla de preamplificación de la secuencia de interés	99
Tabla 7. Condiciones de la reacción de preamplificación de la secuencia de interés	99
Tabla 8. Composición de la mezcla para la reacción de retrotranscripción.	103
Tabla 9. Composición de la mezcla para la reacción RT-qPCR (<i>BRYT Green</i>).	103
Tabla 10. Composición para la reacción de retrotranscripción (con TaqMan).	104
Tabla 11. Composición de la mezcla de preamplificación del ADNc.	105
Tabla 12. Composición de la mezcla para la reacción RT-qPCR (<i>TaqMan</i>).....	105
Tabla 13. Proporciones de los reactivos para la preparación de dos geles.	107
Tabla 14. Lista de cebadores	120
Tabla 15. Lista de anticuerpos	121
5. RESULTADOS	
Tabla 16. Características clínicas de los pacientes con LPB	125
Tabla 17. Asociación de las infecciones por el VIH y VEB y la t-MYC con las características clínicas de los pacientes con LPB	126

ÍNDICE DE FIGURAS

1. INTRODUCCIÓN

Figura 1. Proceso de diferenciación de una célula B en el centro germinal (CG)28
 Figura 2. Elementos del genoma del virus Epstein-Barr36
 Figura 3. Alteraciones genéticas en el LPB38
 Figura 4. Procesamiento de los miARNs51
 Figura 5. Silenciamiento génico mediado por miARNs52
 Figura 6. Esquema del ciclo de metilación del ADN55
 Figura 7. Regulación transcripcional en base a las marcas de metilación del ADN .56
 Figura 8. Expresión de las ciclinas según la fase del ciclo celular60
 Figura 9. Ciclo celular62
 Figura 10. Estructura E2F64
 Figura 11. Expresión de los E2Fs a través de la progresión del ciclo celular65
 Figura 12. Composición de CPC y su localización en la mitosis71

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 13. Selección de muestras87
 Figura 14. Integridad del ADN evaluada con *Bioanalyzer*.90
 Figura 15. Metodología evaluación de la sobreexpresión de miR-150-5p.100
 Figura 16. Plásmidos para el ensayo de luciferasa114
 Figura 17. Metodología *in vivo* en el modelo de membrana corioalantoidea de pollo .
117

5. RESULTADOS

Figura 18. Supervivencias globales (SG)127
 Figura 19. Expresión de c-Myc en pacientes con o sin t-MYC128
 Figura 20. Diferencias en el perfil de expresión entre los LPBs y los controles129
 Figura 21. Análisis de enriquecimiento en los LPBs respecto a los controles131
 Figura 22. Vías enriquecidas en los controles respecto a los LPBs132
 Figura 23. GO-BP enriquecidos en los controles133
 Figura 24. Expresión de E2F y sus genes diana involucrados en el ciclo celular ...135
 Figura 25. Dianas de E2F y reguladores del punto de control G2/M135
 Figura 26. Enriquecimiento de dianas de E2F en los LPB VEB-positivos136
 Figura 27. Diferencias en la expresión de miARNs entre LPBs y controles139
 Figura 28. GSEA de las dianas de los mDEs en los LPBs vs controles139
 Figura 29. Diagrama de Venn de los GDEs, dianas de los miARNs más DE
 relacionados con el ciclo celular140
 Figura 30. Expresión de miARNs del VEB141
 Figura 31. Correlación entre el eje miR-150-5p/E2F3/BIRC5 y la proliferación142
 Figura 32. Validación de la expresión del eje miR-150/E2F3/BIRC5143
 Figura 33. BIRC5 como diana de miR-150-5p144
 Figura 34. Expresión del eje miR-150-5p/E2F3/BIRC5145
 Figura 35. Evaluación del efecto de la sobreexpresión de miR-150-5p en PBL-1 ..146
 Figura 36. Expresión del eje E2F3/MYC/miR-150-5p147
 Figura 37. Generación de la línea *knockdown* para *E2F3* y *knockout* para *MYC*....148
 Figura 38. Sobreexpresión de miR-150-5p en las células PBL-1 E2F3^{mut}149

Figura 39. Evaluación del efecto de la sobreexpresión de miR-150-5p en PBL-1 <i>E2F3^{mut}</i>	150
Figura 40. Expresión de dianas de miR-150-5p en PBL-1 WT y <i>E2F3^{mut}</i>	151
Figura 41. Expresión de dianas de E2F3 en PBL-1 WT y <i>E2F3^{mut}</i>	152
Figura 42. Contribución de E2F3 a la patogénesis del LPB	153
Figura 43. Evaluación de pesos en los modelos MCA PBL-1 WT i <i>E2F3^{mut}</i>	154
Figura 44. Capacidad proliferativa y migratoria de las células <i>E2F3^{mut}</i>	155
Figura 45. IC ₅₀ de los inhibidores HLM006474 y S12.....	157
Figura 46. Inhibición de E2F3 y survivina en las células PBL-1	157
Figura 47. Efectos biológicos de HLM006474 (H) y S12 (S) en PBL-1.....	158
Figura 48. Efecto de HLM006474 y S12 en la apoptosis en PBL-1 WT y <i>E2F3^{mut}</i> ..	159
Figura 49. Efecto de HLM006474 y S12 en la progresión del ciclo celular en PBL-1 WT y <i>E2F3^{mut}</i>	160
Figura 50. Efectos biológicos de los inhibidores HLM006474 (H) y S12 (S) en PBL-1 <i>E2F3^{mut}</i>	161
Figura 51. Tumores generados en el modelo de xenoinjerto de MCA.....	162
Figura 52. Proliferación de los tumores en el modelo MCA PBL-1 WT	163
Figura 53. Proliferación relativa de las células PBL-1 WT y <i>E2F3^{mut}</i> en los tumores generados en el modelo de xenoinjerto de MCA	164
Figura 54. Proliferación de los tumores en el modelo MCA PBL-1 <i>E2F3^{mut}</i>	164
Figura 55. Células PBL-1 presentes en los tumores del modelo MCA	165
Figura 56. E2F3 y MYC en la diferenciación de los plasmablastos	167
Figura 57. Perfil de metilación de los LPBs comparado con los controles.....	168
Figura 58. Subgrupos de LPB en base a las CDMs.....	169
Figura 59. Implicación de <i>MYC</i> en la regulación de la metilación en el LPB	171
Figura 60. Relación entre la infección del VEB y la metilación en el LPB.....	172
Figura 61. GO-BP enriquecidos en el LPB según el patrón de metilación y la expresión génica.....	173
6. DISCUSIÓN	
Figura 62. Hallazgos en la linfomagénesis del LPB.....	193

ÍNDICE

RESUMEN.....	23
ABSTRACT	24
1. INTRODUCCIÓN.....	25
1.1. El linfoma plasmablástico	27
1.1.1. Célula de origen.....	27
1.1.2. Epidemiología y características clínicas	29
1.1.3. Diagnóstico diferencial.....	31
1.1.4. Etiopatogenia.....	34
1.1.4.1. VIH.....	34
1.1.4.2. VEB.....	35
1.1.4.3. Alteraciones genéticas	37
1.1.5. Pronóstico y estrategias terapéuticas	44
1.1.5.1. Perspectivas terapéuticas futuras	47
1.2. Expresión génica del linfoma plasmablástico.....	49
1.3. Modificaciones epigenéticas	50
1.3.1. Modificaciones del ARN mediadas por microARNs.....	51
1.3.1.1. Procesamiento de los miARNs	51
1.3.1.2. Silenciamiento mediado por miARNs.....	52
1.3.1.3. miARNs en el LPB	53
1.3.1.4. miR-150-5p	53
1.3.2. Metilación del ADN.....	54
1.3.2.1. DNMT	56
1.3.2.2. TET	57
1.3.2.3. VEB en la regulación de la metilación del ADN	57
1.4. Ciclo celular	58
1.4.1. Principales reguladores del ciclo celular	59
1.4.1.1. Proteínas activadoras.....	59
1.4.1.2. Proteínas inactivadoras.....	60
1.4.2. Fases del ciclo celular	61
1.4.3. E2F.....	63
1.4.3.1. E2F en cáncer.....	67
1.4.3.2. E2F en la diferenciación	69
1.4.4. BIRC5/Survivina.....	69
1.4.4.1. Survivina y ciclo celular.....	70
1.4.4.2. Survivina y apoptosis.....	72
1.4.4.3. Survivina en cáncer	72
2. HIPÓTESIS.....	75
3. OBJETIVOS	79
4. MATERIALES Y MÉTODOS	83
4.1. Metodología de estudios en muestras humanas	85
4.1.1. Muestras incluidas en los estudios transcriptómicos y epigenéticos	85
4.1.1.1. Selección de los casos	85
4.1.1.2. Datos clínicos de los pacientes	88
4.1.2. Extracción de ARN y ADN de muestras FFEP y cuantificación	88
4.1.3. Secuenciación de ARN.....	89
4.1.4. Expresión de miARNs	92

Índice

4.1.5.	Evaluación de las interacciones miARNs-genes diana	93
4.1.6.	Metilación del ADN.....	93
4.1.7.	Estudio de integración entre metilación de ADN y expresión génica	95
4.1.8.	FISH.....	95
4.1.9.	Estudios inmunohistoquímicos	96
4.2.	Metodología de estudios <i>in vitro</i>	97
4.2.1.	Líneas celulares	97
4.2.2.	Generación PBL-1 <i>E2F3^{mut}</i> y PBL-1 <i>MYC^{KO}</i>	97
4.2.2.1.	Ensayo de dilución limitante	98
4.2.2.2.	Extracción ADN de líneas celulares	98
4.2.2.3.	PCR de preamplificación	98
4.2.2.4.	Electroforesis en gel de agarosa.....	99
4.2.2.5.	Secuenciación mediante la técnica Sanger	99
4.2.3.	Sobreexpresión o infraexpresión de miARNs	100
4.2.4.	Inhibición de E2F y survivina	101
4.2.4.1.	Determinación de la IC ₅₀	101
4.2.5.	Estudios de expresión.....	102
4.2.5.1.	Extracción de ARN de líneas celulares	102
4.2.5.2.	RT-qPCR.....	102
4.2.5.2.1.	Expresión génica.....	102
4.2.5.2.2.	Expresión miARNs	104
4.2.6.	Expresión de proteína.....	106
4.2.6.1.	Extracción de proteína	106
4.2.6.2.	Cuantificación de proteína	106
4.2.6.3.	Western Blot	106
4.2.7.	Citometría de flujo	109
4.2.7.1.	Apoptosis	109
4.2.7.2.	Ciclo celular	109
4.2.7.3.	Expresión de c-Myc	110
4.2.7.4.	Estudio de diferenciación celular	111
4.2.8.	Ensayos de proliferación celular.....	111
4.2.9.	Ensayos de migración e invasión	113
4.2.10.	Unión miR-150-5p/ <i>BIRC5</i>	113
4.2.10.1.	Diseño de plásmidos	113
4.2.10.2.	Extracción de ADN plasmídico Maxiprep	114
4.2.10.3.	Ensayo de luciferasa	115
4.3.	Metodología de estudios <i>in vivo</i>	116
4.3.1.	Ensayo de membrana corioalantoidea de pollo	116
4.3.2.	Detección de células CD138	117
4.3.3.	Estudios histológicos.....	117
4.3.3.1.	Tinciones hematoxilina-eosina	118
4.3.3.2.	Inmunohistoquímica	118
4.3.4.	Estudio de migración de células del tumor de la MCA a órganos.....	118
4.3.4.1.	Extracción y conservación de los órganos y tejidos	119
4.3.4.2.	Extracción de ADN de muestras de tejidos.....	119
4.3.4.3.	Cuantificación secuencia ALU	119

4.4. Análisis estadísticos.....	122
5. RESULTADOS	123
5.1. Datos clínicos pacientes.....	125
5.2. Estudio de expresión génica	128
5.2.1. Evasión del sistema inmune en el LPB	131
5.2.2. Progresión del ciclo celular en el LPB mediada por E2F	134
5.3. Estudio de expresión de miARNs	137
5.3.1. Expresión de miARNs del VEB	140
5.4. Eje miR-150-5p/ <i>E2F3</i> / <i>BIRC5</i> en la patogénesis del LPB.....	141
5.4.1. miR-150-5p se correlaciona inversamente con <i>E2F3</i> y <i>BIRC5</i>	142
5.4.2. Evaluación de miR-150-5p como supresor tumoral.....	145
5.4.3. Evaluación de la regulación negativa de miR-150-5p.....	147
5.4.4. Efecto de la sobreexpresión de miR-150-5p en las células <i>E2F3</i> ^{mut}	149
5.5. Evaluación del papel de E2F3 en la patogénesis del LPB.....	151
5.5.1. Programa transcripcional del ciclo celular regulado por E2F3	151
5.5.2. E2F3 en la progresión tumoral.....	153
5.5.3. Estudio del papel de E2F3 en el modelo de MCA de pollo	154
5.6. Evaluación de E2F3 y survivina como dianas terapéuticas.....	156
5.6.1. Evaluación del efecto antitumoral de HLM006474 y S12 <i>in vitro</i>	156
5.6.2. Evaluación del efecto antitumoral de HLM006474 y S12 <i>in vivo</i>	161
5.7. MYC y E2F3 en la diferenciación del LPB	165
5.8. Estudios de metilación del ADN.....	168
6. DISCUSIÓN.....	175
6.1. Cohorte de estudio	178
6.2. Perfil de expresión génica en el LPB.....	179
6.3. E2F en la patogénesis del LPB.....	181
6.4. Asociación entre el perfil de expresión de miARNs y la t-MYC.....	182
6.5. miR-150-5p como supresor tumoral.....	182
6.5.1. miR-150-5p en la regulación de la apoptosis y del ciclo celular	183
6.5.2. miR-150-5p como inhibidor de la proliferación	186
6.5.3. Regulación de la expresión de miR-150-5p	187
6.6. E2F3 como promotor de la linfomagénesis en el LPB	187
6.7. E2F3 y survivina como dianas terapéuticas	190
6.8. Modelos funcionales en el LPB	194
6.9. E2F3 y MYC en la diferenciación de los plasmablastos	195
6.10. Metilación del LPB.....	197
7. CONCLUSIONES	203
8. PERSPECTIVAS FUTURAS	207
9. BIBLIOGRAFÍA	211
10. ANEXO	235

RESUMEN Y ABSTRACT

RESUMEN

El linfoma plasmablastico (LPB) es un linfoma no-Hodgkin (LNH) poco frecuente y muy agresivo, asociado a un mal pronóstico, debido a la poca efectividad del tratamiento estándar en muchos casos. Aunque diversos estudios han descrito alteraciones genéticas en el LPB, el transcriptoma y el epigenoma permanecen prácticamente inexplorados. Por ello, los objetivos principales de esta tesis son la caracterización transcriptómica y epigenética del LPB, que permitirán conocer mejor la linfomagénesis, así como identificar nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento de este linfoma. Para abordar estos objetivos, se han realizado estudios de expresión génica, de expresión de miARNs y de metilación de ADN en muestras tumorales de pacientes con LPB y de un grupo control. A partir de los resultados de los análisis transcriptómicos se han realizado estudios *in vitro* e *in vivo* para profundizar en los mecanismos linfomagénicos de esta neoplasia. La secuenciación del ARN ha revelado un perfil de expresión caracterizado por alteraciones en el ciclo celular, especialmente asociado a dianas de los factores de transcripción E2F y MYC en el LPB. A su vez, muchos de estos genes son dianas de los miARNs diferencialmente expresados en el LPB. Cabe destacar, que la translocación de *MYC* (*t-MYC*) se asocia a perfiles epigenéticos diferentes en los pacientes con LPB, tanto de expresión de miARNs como de metilación del ADN. Asimismo, el virus de Epstein-Barr (VEB) se vincula a un marcado patrón de hipermetilación del ADN en el LPB. A partir de los estudios *in vitro*, se ha demostrado la relevancia del eje MYC/miR-150-5p/E2F3/BIRC5 en la patogénesis de este linfoma. Concretamente, se ha demostrado la función de miR-150-5p como supresor tumoral, mientras que E2F3 contribuye a la diferenciación de los plasmablastos y al desarrollo tumoral del LPB mediante la alteración de la progresión del ciclo celular. La inhibición de E2F3 y de survivina (*BIRC5*) exhibe un efecto anti-tumoral en el LPB. Como conclusión, en esta tesis se describe el papel supresor tumoral de miR-150-5p y oncogénico de E2F3. Además, se postulan E2F3 y survivina como potenciales dianas terapéuticas en el LPB. Además, la asociación entre la *t-MYC* y la presencia del VEB con modificaciones epigenéticas refuerza la implicación de estos eventos en la etiopatogenia del LPB.

ABSTRACT

Plasmablastic lymphoma (PBL) is a rare and highly aggressive non-Hodgkin lymphoma, associated with a poor prognosis due to the low effectiveness of standard treatments. Although several studies have described genetic alterations in PBL, the transcriptome and epigenome remain largely unexplored. Therefore, the transcriptomic and epigenetic characterization of PBL, enabling to increase the knowledge of lymphomagenesis and the identification of new therapeutic targets for this lymphoma, are the main objectives of this thesis. To address these goals, studies of gene expression, miRNA expression, and DNA methylation were conducted on tumor samples from PBL patients and a control group. Based on the results of the transcriptomic analyses, subsequent *in vitro* and *in vivo* studies were performed to delve into the lymphomagenic mechanisms associated with this neoplasm. RNA sequencing revealed an expression profile characterized by alterations in the cell cycle, particularly involving targets of the transcription factors E2F and MYC in PBL. Many of these genes are regulated by miRNAs differentially expressed in this lymphoma. Notably, different epigenetic profiles among PBLs were observed depending on *MYC*-translocation (*MYC*-t), including both miRNA expression and DNA methylation. Additionally, Epstein-Barr virus (EBV) was linked to a marked pattern of DNA hypermethylation in PBL. Through the analysis of miRNA-target gene interactions and *in vitro* studies, the importance of the MYC/miR-150-5p/E2F3/*BIRC5* axis in the pathogenesis of this lymphoma has been demonstrated. Specifically, miR-150-5p functions as a tumor suppressor, while E2F3 contributes to plasmablast differentiation and tumor development in PBL by altering cell cycle progression. Inhibition of E2F3 and survivin (*BIRC5*) exhibits an anti-tumor effect in PBL. In conclusion, this thesis highlights the oncogenic role of E2F3 and the tumor suppressor role of miR-150-5p in the lymphomagenesis of PBL. We postulate E2F3 and survivin as potential therapeutic target in this neoplasm. Furthermore, the association between *MYC*-t and the presence of VEB with the epigenetic modifications reinforces the role of these events in the etiopathogenesis of this neoplasm.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El linfoma plasmablástico

El linfoma plasmablástico (LPB) es un linfoma no-Hodgkin (LNH) de célula B de alto grado poco frecuente. Este linfoma se presenta habitualmente en hombres adultos con inmunodeficiencias, principalmente por la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Se caracteriza por tener un curso clínico muy agresivo y dado que la eficacia de los tratamientos actuales es limitada, los pacientes con LPB tienen un pronóstico realmente desfavorable.

1.1.1. Célula de origen

El LPB tiene como célula de origen el plasmablasto, una célula B activada que ha iniciado el proceso de diferenciación hacia la célula plasmática (CP)(1). En su diferenciación, la célula B inmadura migra de la médula ósea a los órganos linfoides secundarios (ganglios linfáticos y bazo) para finalizar el proceso de maduración. Estas células migran hacia los folículos linfáticos de los órganos linfoides secundarios donde interacciona con las células *T-helper*. Esta interacción conlleva la activación de la célula B lo que desencadena una expansión clonal que tiene lugar en la zona oscura del centro germinal (CG)(2,3). La generación de los clones ocurre gracias a dos procesos, recombinación de cambio de clase (CSR) y las hipermutaciones somáticas (SHM)(4). La CSR da lugar a una recombinación de los genes de las regiones V(D)J de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (Igs) generando multitud de diferentes receptores de células B (BCR) con el fin de asegurar el posterior reconocimiento del antígeno(5,6). Las SHM introducen mutaciones en las regiones variables de las cadenas de las Igs con tal de aumentar la afinidad del receptor por el antígeno. No obstante, durante este proceso, muchos de los BCR generados no son funcionales por lo que estas células entran en el proceso de muerte celular programada o apoptosis, quedando únicamente aquellas con mayor afinidad antigénica(3,4). Las células que han sufrido SHM que dan lugar a BCR funcionales, migran de la zona oscura a la zona clara del CG donde tiene lugar la presentación del antígeno por parte de las células foliculares dendríticas a las células B activadas. Aquellas células con afinidad por el antígeno salen del CG para finalizar

Introducción

su proceso de diferenciación a célula B de memoria o CP secretora de anticuerpos. En el proceso de diferenciación de célula B activada a CP, las células pasan por un estadio intermedio conocido como plasmablasto que es la célula de origen del LPB(4,7) (**Figura 1**). Aunque el plasmablasto es una célula B activada que ha iniciado el proceso de diferenciación hacia célula plasmática, hoy en día sigue siendo controvertido si dicha célula se localiza en el CG o ya lo ha abandonado.

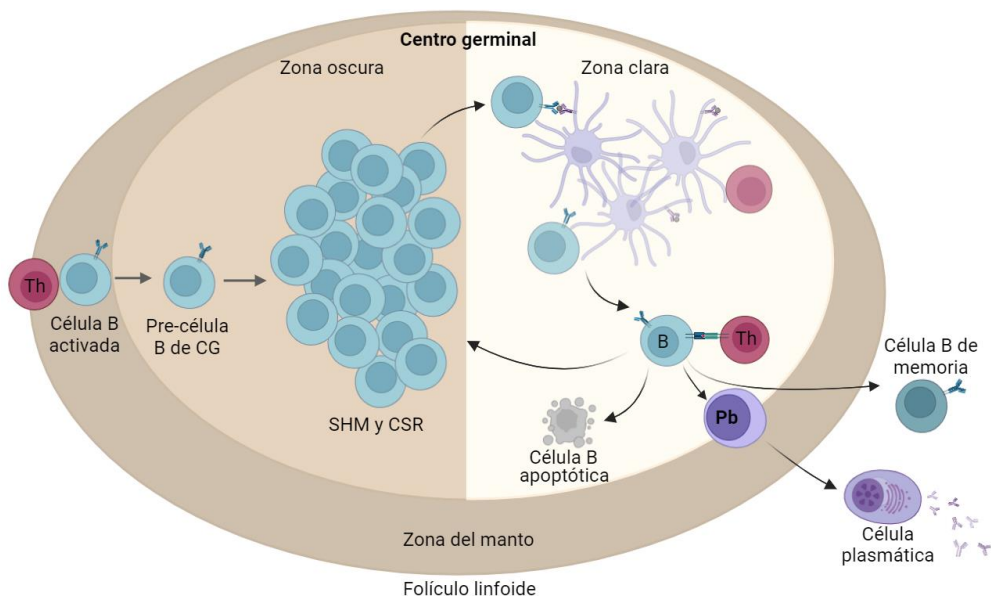


Figura 1. Proceso de diferenciación de una célula B en el centro germinal (CG). La célula B activada tras la interacción con la célula *T-helper* (Th) inicia un proceso de proliferación en la zona oscura del CG en la que se producen la recombinación de cambio de clase (CSR) y las hipermutaciones somáticas (SHM) generando multitud de receptores de célula B con diferentes afinidades antigénicas. En la zona clara, la célula B que reconoce el antígeno inicia el proceso de diferenciación a célula plasmática o célula B de memoria. En el proceso de diferenciación a célula plasmática, la célula B primero se diferencia a plasmablasto (Pb) con un origen dudoso entre el CG o fuera de este.

Al iniciar el proceso de diferenciación hacia CP, el plasmablasto pierde características de célula B para empezar a adquirir características de CP. Es por ello que las células del LPB se caracterizan por ser de gran tamaño, pudiendo variar desde un inmunoblasto, a una célula con una diferenciación plasmacítica, hasta una célula anaplásica(8–10). Casos de LPB con una citología monomórfica plasmablástica han sido descritos, sobre todo, en pacientes con infección por el VIH,

con localización del linfoma en la cavidad oral. Sin embargo, plasmablastos con diferenciación plasmacítica son más frecuentes en otras localizaciones extraganglionares(1).

Desde una perspectiva fenotípica, estas células pierden marcadores de célula B tales como CD20 y PAX5 o los expresan muy débilmente, mientras que adquieren marcadores de diferenciación plasmacítica como CD138, CD38, IRF4/MUM1, Blimp1 y XBP1. No obstante, el marcador de célula B CD79a se expresa en un porcentaje variable de pacientes, aproximadamente 40% de los casos de LPB(1,9,11). Además, es frecuente la detección de Ig citoplasmática y también se suele detectar CD56, marcador de superficie implicado en las interacciones célula-célula y célula-matriz durante el proceso de diferenciación y marcador de CP aberrante(1,12). Otros reguladores esenciales del CG como BCL2 y BCL6 son mayoritariamente negativos mientras que el factor de transcripción (FT) MYC se expresa en altos niveles(1). Además, estas células se caracterizan por ser altamente proliferativas, aproximadamente un 90% de las células expresan el marcador de proliferación Ki67(1,13).

1.1.2. Epidemiología y características clínicas

El LPB se presenta mayoritariamente en hombres (aproximadamente un 80% de los casos). Afecta principalmente a individuos de mediana edad que presentan inmunodeficiencia asociada al VIH (mediana de 42 años), aunque también puede desarrollarse en pacientes con otras inmunodeficiencias como, por ejemplo, tras un trasplante de órgano o en pacientes con una enfermedad autoinmune (mediana de 62 años). No obstante, también puede afectar a individuos inmunocompetentes (mediana de 55 años) en menor frecuencia(1,11,14–16). Aunque el LPB principalmente afecta a adultos, también se han descrito casos en niños con inmunodeficiencia a causa del VIH(17).

Este linfoma se engloba dentro de los linfomas asociados al VIH, representando entre el 2-12% de éstos, un porcentaje bajo en comparación a otros linfomas

Introducción

asociados al VIH(14,15,18). Además, existe una estrecha relación entre los linfomas asociados al VIH y la infección por el virus del Epstein-Barr (VEB)(19). Concretamente el LPB muestra un fuerte vínculo con el VEB, cuya infección de las células del linfoma afecta al 60-75% de los casos(1,11).

En referencia a la localización del LPB, éste fue descrito por primera vez por Delecluse HJ. et al. en 1997 como masas que aparecían en la cavidad oral de individuos con infección por el VIH(20). Posteriormente, se descubrió que también puede aparecer en otras localizaciones extraganglionares como el tracto gastrointestinal y en menor medida la piel, hueso y tejidos blandos, mientras que la afectación de los ganglios linfáticos no es muy frecuente (<10% de los casos)(13,21,22).

Los pacientes con LPB se caracterizan por tener un curso clínico agresivo (puntuación 3-5 según el índice pronóstico internacional (IPI) (Tabla 1). Al diagnóstico, presentan un estadio avanzado de la enfermedad (Ann Arbor III o IV)(1,23), es decir, la afectación tumoral se encuentra a ambos lados del diafragma o de manera diseminada, afectando por lo menos a un órgano fuera del sistema linfático, como la médula ósea, el hígado o el pulmón. El número de localizaciones extraganglionares, suele ser elevado y el estado funcional del paciente (ECOG, *Eastern Cooperative Oncology Group*) suele ser igual o superior a 2, indicativo de la limitación de la calidad de vida de los pacientes con este linfoma(23,24).

Factores pronósticos	Valor	Grupos IPI
Edad	>60	
Estadio Ann Arbor (afectación del linfoma)	III o IV	IPI bajo: 0-1
Localizaciones extraganglionares	≥2	IPI intermedio: 2-3
Estado funcional (ECOG)	≥2	IPI alto: 4-5
Niveles de la lactato deshidrogenasa (LDH)	Elevados	

Tabla 1. Factores pronósticos incluidos en el índice pronóstico internacional (IPI). El IPI incluye 5 factores pronósticos: edad, estadio Ann Arbor que determina la afectación del linfoma, localizaciones extraganglionares, el ECOG (*Eastern Cooperative Oncology Group*) que determina el estado funcional del paciente y los niveles de la lactato deshidrogenasa (LDH) sérica por encima del límite. A cada factor pronóstico se le asigna una puntuación y la suma de los 5 factores determina el valor IPI que se agrupa en: IPI bajo, intermedio o alto.

1.1.3. Diagnóstico diferencial

Dada la rareza del LPB, su heterogeneidad y las características morfológicas, inmunofenotípicas y clínicas que comparte con otros linfomas, el correcto diagnóstico del LPB resulta complicado en la práctica clínica. En la **tabla 2** se muestran las diferentes características a tener en cuenta para realizar el diagnóstico diferencial con las entidades similares.

Una variedad del mieloma múltiple (MM) es el **mieloma plasmablástico (MPB)**, una neoplasia de CP que se caracteriza por una infiltración de plasmablastos en la médula ósea superior al 10%(25,26). El LPB y el MPB se asemejan en características morfológicas e inmunofenotípicas. En estos casos, las características clínicas pueden resultar determinantes en el diagnóstico diferencial como es el caso de la infección por el VIH y el VEB. Mientras que el LPB se asocia a ambas infecciones virales, el MPB no suele asociarse al VIH y la infección de las células tumorales por el VEB se da en muy pocos casos (2%)(9,27).

El **linfoma primario de cavidades (LPC)** es un LNH de célula B poco común y muy agresivo que habitualmente se presenta en forma de derrames en cavidades como la pleura, el pericardio o el peritoneo, pero también puede presentarse en forma de masas. En estos casos el diagnóstico diferencial con el LPB puede resultar complicado. El LPC está estrechamente relacionado con la infección por el VIH y un 65% de los casos se encuentra presente el VEB, del mismo modo que en el LPB. Además, este linfoma presenta características morfológicas e inmunofenotípicas similares al LPB. En cambio, las células del LPC están infectadas por el herpesvirus humano 8 (HHV8) que está ausente en el LPB, hecho crucial para realizar el diagnóstico diferencial entre ambas entidades(28,29).

El LPB además comparte características con diversos tipos de linfoma difuso de célula B grande (LDCBG):

El **LDCBG HHV8+, NOS** (*not otherwise specified*) se desarrolla mayoritariamente en pacientes con enfermedad de Castleman multicéntrica asociada a la infección por

Introducción

el VIH y del HHV8, aunque también se han diagnosticado casos en pacientes inmunocompetentes con infección por el HHV8 en regiones sub-Sarinas. Pese a ser un linfoma de células B, muestra un inmunofenotipo con expresión de CD38, MUM1 y CD20 en algunos casos, y negatividad para CD138 y CD79. A diferencia del LPB, el LDCBG HHV8+, NOS no es frecuente en individuos con infección por el VEB(1,30). La presencia del VEB y la negatividad del HHV8 resultan realmente útiles para discriminar al LPB de esta entidad.

El **LDCBG inmunoblástico (LDCBG IB)** es un linfoma asociado al VIH que además, puede presentarse en pacientes con infección por el VEB. Dicho linfoma difiere del LPB por expresar marcadores de célula B y por la ausencia de CD138. Además, mientras que en el LPB son comunes localizaciones extraganglionares, el LDCBG IB muestra una afectación principalmente ganglionar(31).

El **LDCBG ALK+ (*anaplastic lymphoma kinase*)** es un linfoma con características plasmablasticas que expresa marcadores de CP, pero a diferencia del LPB, expresa la proteína ALK. La detección de las infecciones resulta crucial para el diagnóstico diferencial ya que no se relaciona con las infecciones del VIH o VEB. En cuanto a las alteraciones genéticas, se ha descrito que la translocación t(2;17)(p23;q23) es frecuente en los casos de LDCBG-ALK. Concretamente, una expresión negativa de ALK, la presencia de la translocación del gen *MYC* (t-*MYC*) y la presencia del VEB resultan útiles para el diagnóstico del LPB en comparación al LDCBG ALK+(1,32).

El **LDCBG VEB-positivo, NOS** se desarrolla estrictamente en pacientes con infección por el VEB. A diferencia del LPB, no se presenta en pacientes VIH-positivos(1). En cuanto a las características morfológicas, pueden presentar células similares a las células Reed-Sternberg del linfoma de Hodgkin, siendo útil para diferenciarlo del LPB. Aunque puede presentar expresión de CD30 igual que el LPB, el LDCBG VEB-positivo, NOS presenta características inmunofenotípicas de célula B que facilitan el diagnóstico diferencial(1).

	LPB	MPB	LPC	LDCBG HHV8+, NOS	LDCBG IB	LDCBG ALK+	LDCBG VEB+, NOS
Localización	Extraganglionar	Médula ósea, extraganglionar	Extraganglionar	Ganglionar	Ganglionar	Ganglionar	Extraganglionar
Morfología	PB	PB/PC	IB/PB/AP	PB/IB	IB	IB	IB/CB
Marcadores +	CD138, CD38, IRF4/MUM1, Blimp1, XBP1, CD30-/+	CD138, CD38, IRF4/MUM1, Blimp1, XBP1	IRF4/MUM1, CD30-/+, CD138+	CD20+/-, CD38+/-, IRF4/MUM1 IgM	CD20, CD19 PAX5	ALK CD38, CD138, IRF4/MUM1, Blimp1, XBP1, CD45	CD20, CD19, CD79A, CD30+/-
Marcadores -	CD20, PAX5	CD20, PAX5, BCL6	PAX-5, CD20, Ig	CD138, CD79	CD138	CD20, PAX5, CD30	CD10
Infección VEB	Sí (60-75%)	No	Sí (65%)	No	Sí, en algunos casos	No	Sí
Infección VIH	Sí (70%)	No	Sí	Sí	Sí	No	No
Infección HHV8	No	No	Sí	Sí	No	No	No
Alteraciones genéticas	t-MYC	Alteraciones mieloma	no t-MYC	Ig no mutadas, no t-MYC	t-MYC	t(2;17)(p23;q23)	

Tabla 2. Diagnóstico diferencial del linfoma plasmablastico. ALK: quinasa de linfoma anaplásico (por sus siglas en inglés), AP: anaplásico; CB: centroblastico; IB: inmunoblastico, HHV8: herpes virus humano 8; LDCBG: linfoma difuso de célula B grande, LPB: linfoma plasmablastico. LPC: linfoma primario de cavidades, MPB: mieloma plasmablastico, NOS: *not otherwise specified*, PB: plasmablastico, t-MYC: translocación de MYC, VEB: virus de Epstein-Barr. VIH: virus de la inmunodeficiencia humana. Adaptada de Castillo, Blood 2015(13).

1.1.4. Etiopatogenia

Hasta la fecha no se ha descrito de manera la etiopatogenia del LPB. Parece ser que las principales características consensuadas que se relacionan con la linfomagénesis del LPB son la *t-MYC* como principal alteración genética, y la asociación con las infecciones por el VIH y la infección de las células del linfoma por el VEB. Sin embargo, durante los últimos años se ha realizado un gran esfuerzo por identificar alteraciones genéticas asociadas a la enfermedad, lo que ha contribuido a ampliar los conocimientos sobre la etiopatogenia del LPB(33,34).

1.1.4.1. VIH

Aunque el LPB puede aparecer en pacientes inmunocompetentes o inmunodeprimidos por causas distintas a la infección del VIH, las personas con infección por el VIH siguen mostrando mayor predisposición a desarrollar dicho linfoma(11,33). No han sido investigados los mecanismos por los que el VIH puede contribuir a la linfomagénesis del LPB, sin embargo, la frecuente asociación de este linfoma con el VIH sugiere que el virus contribuye a la patogénesis de esta neoplasia. Los pacientes VIH-positivos presentan con mayor frecuencia alteraciones en *MYC*. Pese a la incidencia de casos de LPB en la población VIH-positiva, diversos estudios han descrito que el VIH no tiene influencia en la supervivencia global (SG) de los pacientes con LPB, incluso algunos estudios han descrito una mejor SG en pacientes VIH-positivos(13,15,22). Aunque los pacientes con LPB VIH-positivos reciben terapia antirretroviral, las cifras bajas de linfocitos CD4 que habitualmente tienen estos pacientes dan lugar a una respuesta inmune comprometida. Esto favorece una reacción inmune contra el tumor más debilitada en comparación con los pacientes inmunocompetentes. Un recuento bajo de linfocitos CD4 en estos casos de LPB, se asocia con un peor pronóstico(35). Además, en condiciones de inmunodeficiencia, aumenta la predisposición a sufrir otras infecciones que favorezcan el mal pronóstico de los pacientes, por ejemplo, la infección por el VEB. Otra hipótesis podría ser que el VIH y el VEB cooperan para facilitar la evasión del sistema inmune y la supervivencia tumoral mediante mecanismos desconocidos por el momento(19).

1.1.4.2. VEB

Se sospecha que el VEB desempeña un papel relevante en la patogénesis del LPB. La infección por el VEB es frecuente entre pacientes con LPB, alrededor del 60-75%(1), no obstante, esta frecuencia aumenta entre los pacientes con LPB infectados por el VIH, alcanzando el 75–100% de los casos(11,13,22). EL VEB puede infectar la célula huésped mediante diferentes programas de latencia (latencia 0, I, II o III) dependiendo de los ARN y proteínas que éste exprese. Se ha descrito que el programa de latencia del virus difiere dependiendo de cada linfoma asociado al VEB(19,36). En los casos de LPB predomina una latencia del virus tipo I, no obstante, también se ha identificado el patrón de latencia III en algunos casos(19). La latencia tipo I se caracteriza por la expresión de EBER (*Epstein-Barr-encoded RNA*), EBNA-1 (*Epstein-Barr nuclear antigen 1*), y raramente hay expresión de EBNA-2 y de LMP-1,2A,2B (*latent membrane protein 1, 2A, 2B*)(14,37–39). La contribución del VEB a la patogénesis del LPB no ha sido definida, aunque estudios en el LB han revelado que la proteína EBNA1 confiere ventajas de supervivencia tumoral a través de la inhibición de la apoptosis por la represión de la proteína pro-apoptótica Bim(40). Por otro lado, la secuencia repetida de glicinas-alaninas (GAR) de EBNA1 desencadena un estrés de la traducción en *cis*. Este hecho da lugar a la inducción de la vía PI3Kδ que activa la traducción del FT E2F1 que, a su vez, induce la traducción de c-Myc y ciclinas, asociándose a un aumento de la proliferación celular(41). Estos datos sugieren que el VEB contribuye a la linfomagénesis mediada por *MYC* en el LB. Dado que *MYC* también se relaciona con la patogénesis del LPB, como se describe en el siguiente apartado, cabría la posibilidad de que se diese este mecanismo mediado por el VEB en el LPB.

A pesar del estado de latencia del virus habitual en las células tumorales, se ha revelado que el LPB muestra expresión de genes que codifican proteínas relacionadas con el ciclo lítico tales como BZLF-1, BHRF-1, BMRF-1 y BALF4,5, lo que sugiere una reactivación ocasional del ciclo lítico del virus(42,43). Se ha hipotetizado que proteínas involucradas en las fases tempranas del ciclo lítico del VEB podrían desempeñar un papel relevante en el desarrollo de linfomas(44).

Introducción

Por otro lado, los microARNs (miARNs) producidos por el VEB son elementos importantes que contribuyen a la patogénesis mediada por el virus y son cruciales en la regulación del cambio del estado de latencia a la reactivación de la infección lítica en la célula huésped(45). El genoma del VEB produce 25 precursores de miARNs que contienen 44 miARNs maduros. Los miARNs se localizan en 2 secuencias llamadas BHRF1 (*BamH I fragment H rightward open reading frame 1*) y BART (*BamH I-A region rightward transcript*) que contiene BART2 y 2 agrupaciones de diversos miARN BART (**Figura 2**)(46). Los miARNs del VEB se han relacionado estrechamente con la linfomagénesis y con la regulación de la respuesta de la célula huésped en diversos cánceres(47,48). En el LB, los miARNs BART reprimen la transcripción de *CASP3* que codifica la caspasa-3, por lo que el VEB regula negativamente la apoptosis(48). miARNs como BART5-5p, BHRF1-2-5p, BART11 and BART17-3p regulan positivamente el regulador del punto de control inmunológico PD-L1 (*programmed death-ligand 1*) en diversos cánceres, incluyendo el LDCBG. Este mecanismo conduce a evadir el reconocimiento de las células tumorales por parte del sistema inmune del huésped(49–51). Aunque el papel de los miARNs ha sido evaluado en diversos linfomas, permanece inexplorado en la patogénesis del LPB.

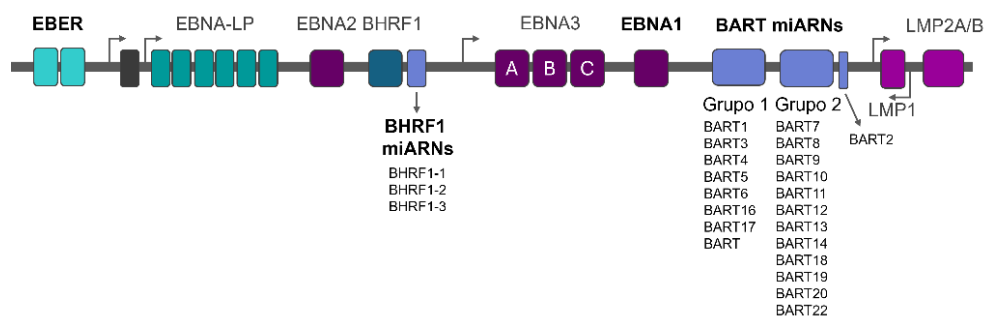


Figura 2. Elementos del genoma del virus Epstein-Barr. En negrita se muestran los elementos expresados en el tipo de latencia I comúnmente asociado al LPB, incluyendo EBER (*Epstein-Barr-encoded RNA*), EBNA1 y los miARNs BHRF1 (*BamH I fragment H rightward open reading frame 1*) y BART (*BamH I-A region rightward transcript*).

El VEB no solo altera el funcionamiento de las células tumorales, sino que también parece influir en la regulación del microambiente tumoral. Se ha atribuido al VEB la

presencia de un microambiente más permisivo en los linfomas asociados al VIH, favoreciendo el escape del reconocimiento del sistema inmune y en consecuencia, contribuyendo a la progresión del linfoma(19). Aunque tanto el LPB VEB-positivo como el LPB VEB-negativo muestran expresión de los reguladores del punto de control inmunológico PD-1 (*programmed death-1*) y su ligando PD-L1, lo que indica que el tumor activa mecanismos de evasión del sistema inmune. Los pacientes VEB-positivos muestran una mayor sobreexpresión de estos reguladores de la respuesta inmune respecto a los casos negativos(52). El microambiente tumoral no difiere en la cantidad de otras células inmunitarias como células dendríticas, monocitos y macrófagos M1 en presencia del VEB(52,53). En cambio, parece que los LPB VEB-positivos muestran mayor infiltración de células T-CD8, *natural killer* y macrófagos M2 pro-tumorogénicos, confiriendo ventajas de evasión del sistema inmune y supervivencia tumoral(53). Se ha descrito que el VEB es capaz de camuflarse frente a las células T-CD8, infraexpresando HLA I o reduciendo sus niveles de EBNA1, evitando ser atacado por parte de las células T-CD8(54). Este mecanismo podría explicar la ausencia de reconocimiento de las células tumorales por parte de las células T-CD8 presentes en el microambiente tumoral, aunque se requieren estudios que validen dicha hipótesis en el LPB.

1.1.4.3. Alteraciones genéticas

Debido a la poca frecuencia, al pronóstico desfavorable y a la necesidad de encontrar terapias más dirigidas contra el LPB, es esencial comprender la patogénesis de este linfoma. En este sentido, se han hecho grandes esfuerzos en la última década a fin de describir las alteraciones genéticas que originan la enfermedad. A través de estudios del perfil mutacional y de las alteraciones somáticas (SCNA), han identificado la vía de MYC, JAK-STAT (*Janus kinase- signal transducer and activator of transcription proteins*), Ras-Raf-MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) como las principales vías genéticamente alteradas en el LPB, aunque alteraciones en las vía de NOTCH y NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) han sido también descritas(55) (**Figura 3**). Todas ellas regulan

Introducción

procesos esenciales para el desarrollo tumoral como la proliferación, apoptosis y diferenciación celular.

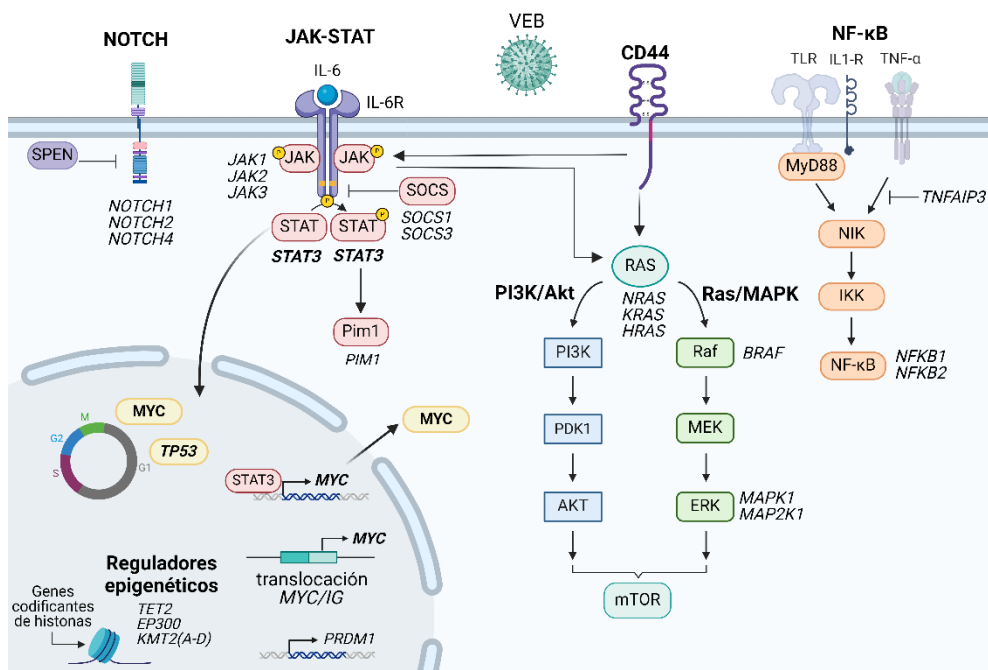


Figura 3. Alteraciones genéticas en el LPB. Se muestran las principales vías de señalización alteradas en el LPB, incluyendo la vía de NOTCH, JAK-STAT, RAS/MAPK/mTOR y NF-κB, así como los principales genes alterados, destacando *MYC*, *STAT3* y *TP53*. También se representa el virus del Epstein-Barr (VEB) por su relación con la etiopatogenia de este linfoma.

MYC

MYC se encuentra sobreexpresado en el LPB independientemente de las alteraciones genéticas que afectan a su secuencia. La t-*MYC* con el gen que codifica la cadena pesada de las Igs (*IgH*) es la principal alteración genética descrita en el LPB, presente en alrededor del 50% de los pacientes(13,16). La t-*MYC* da lugar a una activación transcripcional del gen y una sobreexpresión de su proteína, asociándose a mayor proliferación según estudios inmunohistoquímicos(43,56). *MYC* es un FT que actúa como oncogén en diversos cánceres, especialmente en linfomas(57,58). *MYC* controla diversos mecanismos oncogénicos cruciales, incluyendo la proliferación, apoptosis, ciclo celular y metabolismo. Además, es una

pieza fundamental en la diferenciación de las células B en el CG(59). En el CG, MYC regula la división de las células B en la zona oscura regulando la entrada de las células al ciclo celular(60). Una vez, la célula B es activada, MYC es reprimido por IRF4, Blimp1 y XBP1, que son FTs esenciales durante la etapa final de la diferenciación de las células B lo que permite la diferenciación hacia CP(61–63). Sin embargo, en el LPB la t-MYC conlleva la sobreexpresión tanto del gen como de la proteína codificada(10,56). Esta alteración genética es más frecuente en los LPB asociados al VIH (78% positivos vs 44% negativos) y al VEB (70% positivos vs 43% negativos)(16,64). Los pacientes con mayor expresión de c-Myc presentan características más agresivas con un mayor índice de proliferación(10,56). En diversos linfomas, la mayor tasa proliferativa en pacientes que presentan la t-MYC se ha asociado a un peor pronóstico, no obstante, en el LPB la relación entre dicha alteración genética y la supervivencia de los pacientes es controvertida. Algunos autores han encontrado una asociación de la t-MYC con SG inferiores en comparación a aquellos casos que no presentan dicha traslocación o en comparación a aquellos que presentan amplificación de MYC(35,65). En cambio, otros estudios no han detectado una asociación de la t-MYC con una probabilidad de SG más corta(56,66).

Otras alteraciones genéticas como la amplificación o mutaciones en MYC, también han sido descritas, aunque en menor proporción, 11 y 10% de los casos, respectivamente(10,43,56,67). Respecto a las mutaciones detectadas en el gen MYC, algunas de ellas son mutaciones silenciosas mientras que otras se localizan en el dominio TAD (*transactivation domain*), en alrededor del 50% de los casos(43,56). Dicho dominio es susceptible de la ubiquitinación, fenómeno que dará lugar a la degradación de la proteína. Se ha sugerido que mutaciones en este dominio podrían impedir la ubiquitinación de la proteína y de este modo evitar su degradación, favoreciendo la estabilidad proteica(68).

Es importante mencionar el papel que desempeña MYC en la regulación de múltiples vías de señalización oncogénicas tales como JAK-STAT, RAS-RAF, NOTCH and NF- κ B. Estas vías de señalización han sido identificadas como las principales vías

Introducción

de señalización genéticamente alteradas en el LPB (*descrito en el siguiente apartado*), por lo que las modificaciones genéticas en *MYC* pueden conllevar una inestabilidad genética, dando lugar a la desregulación de las vías de señalización mencionadas y, en consecuencia, al desarrollo del LPB. Futuros estudios que investiguen dichas vías de señalización pueden ayudar a esclarecer los mecanismos de la linfomagénesis mediada por *MYC* en el LPB.

JAK-STAT

La vía JAK-STAT está relacionada con la proliferación y supervivencia, así como con la regulación de procesos como la diferenciación celular y la respuesta inmune(69,70). Esta vía es inducida por IL-6, desencadenando la activación de las proteínas quinasa JAK, y a su vez, la fosforilación de estas proteínas permite la unión de las proteínas STAT. En el LPB se han identificado alteraciones genéticas en diversos miembros de esta vía, especialmente en pacientes VIH-positivos (60% positivos vs 35% negativos), lo que apunta a que esta vía desempeña un papel importante en la patogénesis del LPB(43,56,67). Concretamente, las mutaciones activadoras en *STAT3* se encuentran entre las más recurrentes en el LPB, afectando a una media del 27% (15-42%) de los pacientes. Estas mutaciones afectan principalmente a las regiones p.D661 (8-33%) o p.Y640 (10-24%) localizadas en el dominio SH2, involucrado en la dimerización de las proteínas, dando lugar a la sobreexpresión de *STAT3*(43,56,67,71). Cabe remarcar que estas mutaciones son más frecuentes en casos de pacientes infectados por el VIH (42% de los casos) y VEB-positivos(43,56,67,66). Además, es interesante señalar que *STAT3* regula transcripcionalmente *MYC* por lo que las mutaciones en *STAT3* se asocian a mayor expresión de *MYC*. Esta asociación sugiere que *STAT3* podría contribuir a la patogénesis mediada por *MYC* en el LPB(43). Se han descrito, además, mutaciones de inactivación o pérdida de función en los reguladores negativos de la vía como *SOCS1*, *SOCS3* o *PIAS3*. Otros genes afectados en menor medida son *JAK1*, *JAK2*, *JAK3*, *PIM1*, *OSMR*(43,56,67,66,71). Respecto a las SCNA, amplificaciones en la región 1q21.3 se han descrito en un 52% de los casos, cuya localización alberga el

gen anti-apoptótico *MCL1* y el gen que codifica el receptor de la IL-6, *IL6R*, activador de la vía JAK-STAT(43,56,67).

RAS-RAF-MAPK

La vía Ras-Raf-MAPK está implicada en la regulación de la apoptosis, proliferación, migración y diferenciación celular. Tras la activación de Ras, ésta activa Raf, que en forma dimérica, activa las proteínas quinasa MAPK incluyendo MEK y ERK, que lleva a la activación de diversos FTs(72). *NRAS* (9-33%), *KRAS* (9%) y *BRAF* (6%) son los principales genes mutados en esta vía, aunque mutaciones en *ERBB3*, *HRAS*, *MAPK1*, *MAPK2*, *MAP2K1* y *NTRK* han sido también descritas en menor frecuencia(43,56,67,66,71). Las mutaciones en los genes *RAS* afectan a los llamados residuos *hotspot* G12, G13 y Q61 mientras que las mutaciones en *BRAF* afectan al dominio quinasa. Todas estas mutaciones conllevan una ganancia de función y, en consecuencia, una expresión constitutiva de la vía(43,56,67). Además, los pacientes VIH-positivos presentan amplificaciones en *NRAS* y *KRAS* en un 24% de los casos(43). Asimismo, se ha descrito una tendencia a una peor SG en pacientes con mutaciones en *NRAS* tratados con CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona)(56).

NOTCH

La vía de señalización NOTCH se inicia mediante la proteólisis del receptor inducida por ligando. Tras la unión de ligandos al receptor NOTCH, éste se escinde proteolíticamente liberando el dominio intracelular que transportado al núcleo, controlará la transcripción genética y desempeñará un papel importante en las interacciones entre células(73). Mutaciones en la vía de NOTCH han sido ampliamente descritas en diversas enfermedades hematológicas(74). En el LPB, se han detectado mutaciones en *NOTCH1* (6%) y *NOTCH2* (2%) que codifican las glucoproteínas de transmembrana de tipo I y II, respectivamente. También se han encontrado mutaciones en reguladores de la cascada de señalización activada por los receptores NOTCH, como son *SPEN* (7%) y *DTX1* (3%)(43,56,71). *SPEN* y *DTX1*

Introducción

son represores de la vía de NOTCH que inhiben la transactivación de NOTCH1 y su transporte intracelular a través de endosomas(75,76). No obstante, la implicación de esta vía en el desarrollo del LPB requiere mayor exploración.

NF-kB

La vía NF-kB está constituida por FTs cruciales en la regulación del metabolismo y la inmunidad(77). Aunque la vía de NF-kB no se ha descrito como una de las principales vías de señalización desreguladas en el LPB, se han identificado mutaciones en genes como *CAR11*, *TNFAIP3*, *NFKB1*, *NFKB2*, *KFKBIE*, *TRAF3*, *MYD88* y *BTK*(66,67). Se requieren futuros estudios que validen la implicación de la vía NF-kB en la patogénesis del LPB.

TP53

TP53 ha sido extensamente descrito como uno de los principales genes supresores de tumores relacionado con múltiples mecanismos oncogénicos como apoptosis, proliferación, ciclo celular y reparación del ADN, entre otros(78). Alteraciones genéticas inactivadoras de *TP53* se encuentran en una media del 14% (7-33%) de los pacientes con LPB, residiendo principalmente en el dominio de unión al ADN(43,56,66,67,71). Cabe destacar que las mutaciones en *TP53* son más frecuentes en pacientes VIH- y VEB-negativos. Además, se han identificado otras alteraciones genéticas en *TP53* que incluyen la pérdida en el número de copias o deleciones(56,66,67). En el 60% de los casos las alteraciones genéticas de *TP53* conducen a la inactivación bialélica de este gen, lo que puede influir en la supervivencia de las células tumorales en el LPB. De hecho, alteraciones genéticas en *TP53* se han asociado con supervivencias inferiores frente a casos con ausencia de alteraciones en dicho gen(56,67).

PRDM1/Blimp1

PRDM1 codifica el FT Blimp1, un regulador esencial para la diferenciación terminal de la célula B a CP, reprimiendo genes que mantienen la identidad de célula

B como *MYC* y *PAX5*(79). En el LPB se han encontrado mutaciones de cambio de sentido en *PRDM1* (50%) con una tendencia superior en casos VIH-negativos y VEB-positivos(66,71). Estas mutaciones se localizan en dominios funcionales que incluyen el dominio de unión al ADN y el motivo PR entre otras(8). Deleciones en *PRDM1* han sido identificadas en diversos linfomas, indicando su papel como supresor tumoral. Curiosamente, se ha encontrado coexpresión de Blimp1 y Myc en el LPB, sin embargo, las mutaciones de cambio de sentido en *PRDM1* se han asociado a un incremento en los niveles de *MYC*. Esto sugiere que estas mutaciones no impiden la diferenciación a CP pero pueden contribuir a la linfomagénesis mediada por Myc(10). Además, *PRDM1* es activado por IRF4/MUM-1, otro regulador crucial de la diferenciación a CP que se encuentra amplificado (6p25.3) en un 29% de casos con LPB y mutado en un 4% de ellos(56).

CD44

Otras amplificaciones encontradas en el LPB incluyen la región 11p13 que alberga el gen CD44 en un 37% de los pacientes, una incidencia bastante elevada que ha sido descrita únicamente en 2 de los estudios genéticos realizados en el LPB(43,67). CD44 es un receptor de membrana necesario para el funcionamiento normal de las células B y además, confiere ventajas oncogénicas, promoviendo la proliferación, la supervivencia del tumor y la metástasis(80).

Reguladores epigenéticos

Las enzimas de la familia de TET (*ten-eleven translocation*) catalizan la eliminación del grupo metilo de las citosinas dando lugar a la desmetilación del ADN. Entre ellos, **TET2** está mutado en un 11% de los LPB, aproximadamente, lo que puede conllevar una desregulación de la metilación del ADN(43,56,67). Mutaciones que inactivan este gen se encuentran en un 10% de casos de LDCBG, dando lugar a un patrón de hipermetilación del ADN que ocasiona el silenciamiento de los genes afectados. Entre estos genes destacan *IL6* y *PRDM1*, por lo que las mutaciones de pérdida de función

Introducción

de *TET2* impiden el programa transcripcional para la salida de las células B del CG(81).

Otros reguladores importantes de la metilación son las *KMT2A-KMT2D* (*Lysine Methyltransferase 2A-D*) que catalizan la metilación de los residuos de lisina 4 de la histona 3 (H3K4), lo que da lugar a la activación transcripcional de los genes. Hasta la fecha, se han descrito mutaciones en *KMT2A* (8%), *KMT2C* y *KMT2D* (7%), siendo estas 2 últimas más comunes en los casos de LPB VEB-negativos. Concretamente, *KMT2D* es uno de los genes más alterados en el LDCBG en el subtipo de CG(82). Las mutaciones en *KMT2D* en el LPB, mostraron incluso, menor frecuencia que en el subtipo de LDCBG de célula B activada lo que sugiere que a medida que la célula B se va diferenciando disminuyen las alteraciones genéticas en dicho gen(67). Por otro lado, se han identificado amplificaciones recurrentes que afectan a *KMT2A* (11q23.3)(56,67), un gen ampliamente estudiado por sus frecuentes reordenamientos génicos, comunes en las leucemias agudas(83).

Las histonas son elementos fundamentales en el empaquetamiento del ADN. Están compuestas por 2 subunidades de 4 proteínas, H2A, H2B, H3 y H4 que constituyen el nucleosoma, sobre el cual se envuelve el ADN. En el LPB se han identificado mutaciones en un 7% de los casos en *HIST1H1D* y *HIST1H1E*, genes de la familia que codifican la proteína de unión de histonas H1(67). Más interesante ha sido la detección de las amplificaciones **1q21.3** y **6p22.2** las cuales albergan 12 y 36 genes, respectivamente. Estos genes codifican las subunidades de las histonas lo cual indica una gran inestabilidad genética en el LPB(43).

1.1.5. Pronóstico y estrategias terapéuticas

El LPB se caracteriza por tener un curso clínico muy agresivo y una mediana de SG corta, que en la mayoría de casos no supera un año después del diagnóstico(84,35,14), aunque el estudio del grupo LYSA (*lymphoma study association*) reveló una SG con una mediana de 32 meses(84,35,14,15). Estudios más recientes han detectado una medianas de supervivencia entre 3-5 años,

probablemente a consecuencia de la administración de estrategias terapéuticas más agresivas que han mejorado el pronóstico de los pacientes(85–88). La corta supervivencia media de estos pacientes se debe mayoritariamente a la progresión de la enfermedad a consecuencia de una alta tasa de recaída o a enfermedad refractaria a la quimioterapia, aunque en algunos casos también es debida a infecciones oportunistas asociadas al SIDA(89,35).

Los parámetros que influyen en el pronóstico de los pacientes con LPB no han sido hasta la fecha bien definidos y diversos factores han mostrado resultados controvertidos en el pronóstico de este linfoma. No obstante, parámetros como el estadio avanzado de la enfermedad, el estado general (ECOG) e IPI elevados se asocian a una probabilidad de SG inferior (15,23,37,56,85,86,90). Algunos estudios también han asociado la translocación o amplificación de *MYC* con peores supervivencias en pacientes con LPB VIH-positivos(11,35). Curiosamente, aunque los LPB con infección por el VEB son más agresivos, algunos estudios describen supervivencias más favorables que los casos VEB-negativos(11,37,52). Sin embargo, otros estudios no relacionan la infección del VEB con un mejor pronóstico lo que indica que el impacto del VEB en el pronóstico de los pacientes no ha sido consensuado por el momento(37,89,91).

El LPB carece de un tratamiento estándar con resultado satisfactorio. Hasta la fecha, la estrategia terapéutica estándar empleada para el tratamiento del LPB es la usada en pacientes con LDCBG, basada en la pauta CHOP. Puesto que este régimen terapéutico no resulta efectivo en muchos casos, algunos autores recomiendan aplicar estrategias terapéuticas más agresivas(22,85,92,93). No obstante, a día de hoy no se han realizado suficientes ensayos clínicos con una cohorte amplia de pacientes que permita afirmar mayores beneficios terapéuticos con estrategias terapéuticas agresivas en comparación a la estrategia CHOP(35,90). Entre los nuevos tratamientos propuestos en primera línea se encuentran EPOCH, CODOX-M/IVAC, Hiper-CVAD-MA (detalladas en la **tabla 3**). Más recientemente, se ha valorado la administración de Bortezomib en combinación con EPOCH como nueva esquema terapéutico para el tratamiento del LPB(94,85,93). Bortezomib es un inhibidor del

Introducción

proteasoma, complejo proteico encargado de la degradación de las proteínas. A diferencia del resto de tratamientos, el efecto de Bortezomib ha sido evaluado *in vitro* en líneas celulares de LPB. Matsuki et al. llevaron a cabo estudios en las primeras líneas celulares de LPB establecidas a partir de células tumorales de un ganglio linfático de una paciente con LPB (KY-1,2,3) en las que observaron una reducción de la proliferación dependiente de la dosis al tratarlas con Bortezomib(95).

Además del tratamiento quimioterápico, aquellos pacientes que presentan infección por el VIH son tratados de forma concomitante con terapia antirretroviral. Aunque en otros linfomas asociados al VIH el impacto de la terapia antirretroviral ha sido crucial para la mejora de la supervivencia de los pacientes, en el LPB no se han publicado estudios que esclarezcan las ventajas terapéuticas que ofrece dicha terapia(35,91,96,97).

Tratamiento	Fármacos	Referencias
<i>Primera línea</i>		
CHOP	Ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona	(15,21,22,35,37,90,91,98–100)
EPOCH/DA-EPOCH	Etopósido, prednisona, vincristina, ciclofosfamida y doxorubicina	(35,37,98–101)
DA-EPOCH-R*	Rituximab, dosis ajustada de etopósido, prednisona, vincristina, ciclofosfamida y doxorubicina	(102) NCT02481310
CODOX-M/IVAC	Ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina, metotrexato, alternando con ifosfamida, etopósido y citarabina	(22,98)
Hiper-CVAD-MA	Ciclofosfamida hiperfraccionada, vincristina, doxorubicina, dexametasona, alternando con metotrexato y citarabina	(22,35,37,98)
Bortezomib-EPOCH/ Bortezomib-DA-EPOCH	Bortezomib, etopósido, prednisona, vincristina, ciclofosfamida y doxorubicina	(94,85,93)

Tabla 3. Tratamientos en uso para el tratamiento del linfoma plasmablastico (LPB). Se muestran las abreviaciones de los tratamientos, los fármacos de cada uno de ellos y las referencias y el ensayo clínico en el que se han probado estas terapias, de izquierda a derecha, respectivamente. *Rituximab se emplea únicamente en los casos de LPB que expresen CD20.

1.1.5.1. Perspectivas terapéuticas futuras

En la actualidad, solamente 2 estudios han establecido líneas celulares de LPB(39,95) y otro estudio ha generado un modelo PDX (*patient-derived xenograft*) en un ratón inmunodeficiente NGS (CD20-, BCL6-, VEB-, MUM1+, MYC+) como único modelo *in vivo* generado en este linfoma(103). Dado los limitados modelos preclínicos de LPB, son pocos los estudios *in vitro* realizados relacionados con la búsqueda de posibles estrategias terapéuticas y son ausentes los respectivos estudios *in vivo*.

Mine et al. establecieron la línea celular PBL-1 a partir de células tumorales del líquido ascítico de un paciente diagnosticado de LPB VIH-positivo con infección por el VEB(39). Además, estas células presentan la t-MYC lo que proporciona un buen modelo para el estudio de la enfermedad(39). Estos investigadores identificaron una desregulación de las vías IL-6/Jak/STAT3 y PI3K/Akt/mTOR, por lo que ensayaron una librería de inhibidores dirigidos contra diversos miembros de ambas vías de señalización, que mostraron un efecto citotóxico en las células PBL-1. Los inhibidores de mTOR (*mammalian target of rapamycin*) rapamycin y everolimus producen una inhibición del metabolismo mitocondrial, efecto que también ha sido observado por los inhibidores de proteasoma (Bortezomib) e inhibidores de las deacetilasas de histonas (HDACs), incluyendo SAHA, SBHA, panobinostat y CI994 (**Tabla 4**). La inhibición del receptor de interleuquina-6 (IL-6) mediante tocilizumab induce apoptosis y una deficiencia de la actividad metabólica mitocondrial, así como de la síntesis de ADN en la línea celular PBL-1, cuya proliferación es dependiente de la presencia de IL-6(39). Frontzek et al. destacan MYC, IRF4 y STAT3 como potenciales dianas en un cribado de ARNsh (ARN-*short-hairpin*) contra múltiples genes en la línea celular PBL-1(56). Estos investigadores observaron citotoxicidad frente al oligonucleótido anti-sentido contra STAT3, AZD9150 y frente a la reducción de los niveles de IRF4 producido por lenalidomida (**Tabla 4**). Estos resultados apuntan a que IRF4 y STAT3 pueden ser dianas a tener en consideración como futuras estrategias terapéuticas(56). El efecto de lenalidomida en el tratamiento de pacientes con LPB

Introducción

ha sido publicado en muy pocos pacientes. Los resultados parecen mostrar resultados satisfactorios, incluyendo la reducción de la masa tumoral y la remisión de larga duración(104,105). Estos estudios sugieren que lenalidomida podría suponer una estrategia terapéutica prometedora en el tratamiento de este linfoma, aunque estudios más amplios son requeridos para confirmar los efectos beneficiosos de este fármaco en el tratamiento del LPB.

Otro tratamiento planteado ha sido el anti-CD38, daratumumab, cuyo efecto ha sido evaluado de manera preliminar en 4 pacientes con LPB en combinación con EPOCH u otras estrategias quimioterápicas mostrando efectividad en estos pacientes(106). En relación con daratumumab, actualmente hay 2 ensayos clínicos abiertos. El primero de ellos contempla el estudio del efecto de daratumumab en combinación con dosis ajustada de EPOCH en el LPB (NCT04139304), y el segundo, pretende evaluar la actividad y seguridad de daratumumab en combinación con Bortezomib y dexametasona en pacientes con LPB refractarios o en recaída (NCT04915248). Por otro lado, el aumento de expresión de PD-1 y PD-L1 en pacientes VEB-positivos apunta a que estos pacientes podrían ser tratados con bloqueadores de puntos de control inmunológico como podrían ser nivolumab o pembrolizumab. Aunque algún caso con LPB ha sido tratado con estos inhibidores, se requieren más estudios para evaluar el efecto beneficioso de los inhibidores del punto de control inmunológico en estos pacientes(107,108).

Tipo de inhibidores	Dianas	Inhibidor/fármaco
Moduladores epigenéticos	HDAC	CI994, panobinostat, SAHA, SBHA,
Inmunomoduladores	proteasoma	Bortezomib
	CRBN	Lenalidomida
Inhibidores IL-6/JAK/STAT	STAT3	AZD9150
	IL-6R	Tocilizumab
Inhibidores PI3K/Akt/mTOR	mTOR	Everolimus y Rapamicina
Anti-CDs	CD38	Daratumumab
Punto de control inmunológico	PD-1	Nivolumab
	PD-1	Pembrolizumab

Tabla 4. Estrategias terapéuticas alternativas. Inhibidores: AZD9150, Bortezomib, CI994, Everolimus, Lenalidomida, Panobinostat, Rapamicina, SAHA (ácido hidroxámico suberoilánilida), SBHA (ácido bis-hidroxámico); anticuerpos monoclonales: Daratumumab, Nivolumab, Pembrolizumab, Tocilizumab.

1.2. Expresión génica del linfoma plasmablastico

A pesar del esfuerzo llevado a cabo para entender la patogénesis del LPB, pocos son los estudios que han intentado describir el perfil transcripcional del LPB, por lo que hasta la fecha no ha sido descifrado(109–112).

Estudios comparativos de la expresión génica entre el LPB y otras enfermedades hematológicas cercanas han revelado que el LPB parece compartir cierta expresión génica con el LPC y el MM, en comparación con otras enfermedades de célula B como el LDCBG o a distintos estadios de diferenciación de célula B, lo que apuntaría a que el origen del LPB reside fuera del centro germinal(43,109). En consonancia con las manifestaciones fenotípicas, el LPB presenta un enriquecimiento de genes involucrados en la transformación a CP (*PRDM1*, *CD138*, *XBP1* y *IRF4*) así como la infraexpresión de marcadores de célula B (*CD19*, *CD20*, *CD40* y *PAX5*) y de marcadores de la regulación del CG (*BCL6*, *BCL7A*, *BCL11A* y *SPIB*)(43). En comparación con el LDCBG, el LPB muestra infraexpresión de dianas de NFKB1 y genes de la cascada de señalización activada por BCR, así como un enriquecimiento de dianas de MYC y de MYB(109). En comparación con otras enfermedades de célula B, el LPB VIH-positivo muestra enriquecimiento de vías de señalización relacionadas con remodelaciones de la cromatina, especialmente en genes que codifican las histonas, concordando con las amplificaciones descritas en las regiones 1q21.3 y 6p22.2 que albergan dichos genes(43). Asimismo, se ha observado una correlación entre el perfil mutacional y los niveles de expresión de genes como *STAT3*, *TP53*, *DHX33*, *NRAS* y *HIST1H4E*(43,66). Curiosamente, aunque el LPB presenta alteraciones genéticas que activan genes implicados en la vía IL6/JAK/STAT, no necesariamente se traduce en un enriquecimiento de la expresión de dichos genes(110). La desregulación de esta vía podría verse también alterada como consecuencia de la infección por el VEB. La proteína EBNA1, asociada al programa de latencia I presente en los pacientes con LPB, regula la expresión del receptor de la IL-6 dando lugar a la hiperactivación de la vía y la supervivencia de las células B infectadas(113).

Introducción

Dada la estrecha relación del VEB con el LPB, se ha explorado si el VEB puede modular el patrón de expresión génica(53,66,67). Los resultados apuntan a una infraexpresión de genes implicados en la vías de señalización reguladas por p53 y una tendencia a menor expresión de genes de la vía NF-kB en pacientes con ausencia del VEB mientras que los casos VEB-positivos exhiben una inducción metabólica con un aumento de expresión de genes mitocondriales(66). Además, la infección por el VEB altera la presentación y el procesamiento del antígeno mediado por el complejo mayor de histocompatibilidad de clase I, la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR y el ciclo celular (*CDK1*, *CDK2* y *HSP90B1*)(112). Se ha descrito que el VEB regula mecanismos de evasión del sistema inmune cooperando en la supervivencia tumoral en diversos linfomas asociados al VIH(19). Curiosamente, el VEB desencadena la infiltración leucocitaria y una activación de linfocitos T en el microambiente tumoral del LPB y a su vez, se asocia a un aumento de la expresión de genes implicados en la evasión del reconocimiento del sistema inmune (*VEGFA*, *LAG3*, *PDCD1*, *LGALS3*, *GDF15*, *MCL1*, *CD163* y *FOXP3*)(53,66). Aunque estos resultados apuntan a que el VEB contribuye al control del microambiente y puede proteger a las células tumorales del reconocimiento del sistema inmune, por el momento, la relación entre el VEB y el microambiente tumoral no ha sido estudiada en profundidad en el LPB.

1.3. Modificaciones epigenéticas

Las alteraciones epigenéticas se definen como aquellas que afectan a la expresión génica sin afectar propiamente a la secuencia del gen. Las alteraciones epigenéticas se pueden clasificar en 4 grupos, metilación del ADN, acetilación de las histonas, remodelación de la cromatina y modificaciones del ARN mediadas por ARN no codificantes (ARNnc). Durante las últimas décadas se ha descrito la relevancia de las modificaciones epigenéticas en el desarrollo del cáncer y el interés que estas tienen como estrategias terapéuticas(114,115). En este trabajo nos centramos en las modificaciones del ARN mediadas por microARNs (miARNs) y la metilación del ADN.

1.3.1. Modificaciones del ARN mediadas por microARNs

Los ARNnc son secuencias de ARN no traducidas a proteínas, que son capaces de unirse complementariamente a la secuencia de un gen, regulando su expresión. Se pueden clasificar en ARNnc largos (>200pb) o ARNnc pequeños. Dentro de los ARNnc pequeños encontramos los microARNs (miARNs), unas moléculas de ARN de entre 20-22pb localizadas habitualmente en intrones y ocasionalmente en exones, que se unen a la región no traducida 3' (3'UTR) de un gen. Esta unión produce el silenciamiento del gen y la degradación del ARN mensajero (ARNm), impidiendo así su traducción a proteína(116). Los miARNs están implicados en la regulación de múltiples procesos celulares cruciales durante el desarrollo, sin embargo, su desregulación se ha asociado a diversas enfermedad, incluyendo el cáncer(117).

1.3.1.1. Procesamiento de los miARNs

Las secuencias de los miARNs son transcritas por la polimerasa II de ARN (Pol II) dando lugar a un miARN primario (pri-miARN), es decir, un transcrito largo con estructura de horquilla. La proteína ARNasa III nuclear Drosha, corta la estructura principal de la horquilla, generando el precursor del miARN (pre-miARN; **Figura 4**).

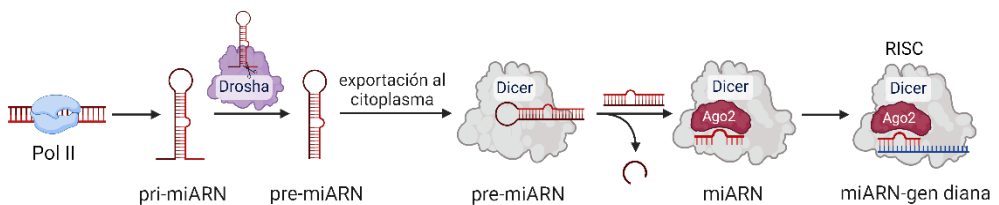


Figura 4. Procesamiento de los miARNs. En la figura se muestra el procesamiento de los miARNs pasando por todos los estadios de maduración de la secuencia del miARN hasta su unión a la proteína Argonaute 2 (Ago2) y al gen diana en el complejo de silenciamiento inducido por miARNs (RISC).

Éste es exportado al citoplasma donde la ARNasa III DICER corta el bucle del extremo de la horquilla, liberando un ARN de doble cadena que se une a las proteínas Argonaute (AGO) formando el complejo silenciador inducido por ARN (RISC) (**Figura 4**). Este complejo mantiene la cadena guía y elimina la cadena pasajera del dúplex

Introducción

de miARN, generando el miRNA maduro -5p o -3p dependiendo de cuál sea la cadena guía(118). Finalmente, este complejo se une a la secuencia 3'UTR del ARNm diana a través de la complementariedad entre sus bases.

1.3.1.2. Silenciamiento mediado por miARNs

El silenciamiento génico liderado por miARNs se puede producir a través de 2 procesos, la degradación del ARNm o la inhibición de la traducción impidiendo la actividad del factor eucariota de iniciación 4F (eIF4F).

La degradación del ARNm se lleva a cabo a través de un proceso de deadenilación en 2 fases que es desencadenado por las proteínas AGO del complejo RISC al que se ha unido el miARN (**Figura 5**). La primera deadenilación es catalizada por PAN2-PAN3 (*Poly(A)-binding protein-dependent poly(A) ribonuclease 2,3*) y la segunda por el complejo CCR4-NOT (*C-C Motif Chemokine Receptor 4*). El ARNm deadenilado se somete a un proceso de descapsulación mediante la proteína DCP2 (*Decapping MRNA 2*). El ARNm resultante es finalmente degradado de 5' a 3' por la exorribunucleasa 1 (XRN1)(116).

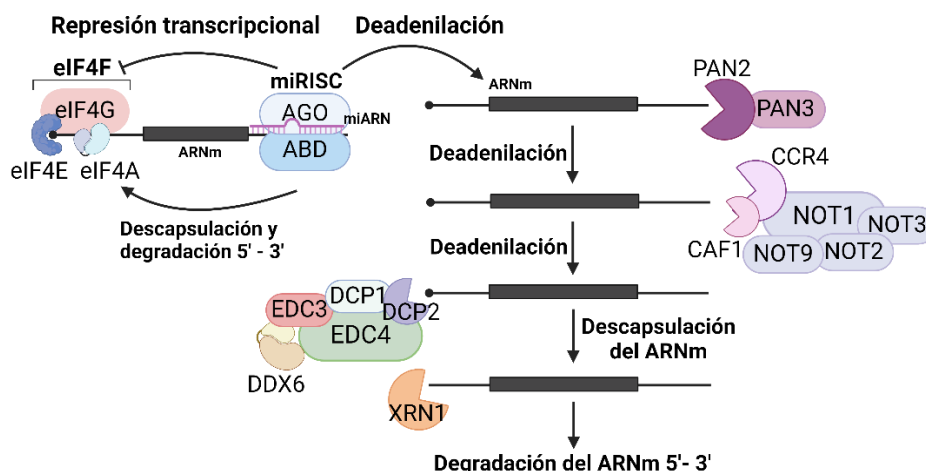


Figura 5. Silenciamiento génico mediado por miARNs. Figura adaptada de Stefanie Jonas et al., 2015. A la izquierda se muestra la represión de la traducción. Los estudios apuntan a que los miARNs inhiben el ensamblaje y la actividad de eIF4F (*eukaryotic initiation factor 4F*), elemento esencial para el inicio de la traducción. A la derecha se muestra la degradación del ARNm a partir de la deadenilación que se produce en dos fases, seguido de la descapsulación del ARNm para ser finalmente degradado.

Aunque no está bien establecido el mecanismo, se ha descrito que los miARNs pueden impedir la traducción mediada por eIF4F (**Figura 5**). Este complejo consta de la proteína de unión eIF4E, la proteína adaptadora eIF4G y la helicasa eIF4A que son cruciales para la iniciación de la traducción. Algunos estudios han descrito que los miARNs se unen a estas proteínas, impidiendo el correcto ensamblaje del complejo e impidiendo por tanto, su actividad(116).

1.3.1.3. miARNs en el LPB

El miRnoma del LPB permanece prácticamente inexplorado. Hasta la fecha, únicamente dos estudios han tratado de arrojar luz en la regulación epigenética de los miARNs en dicho linfoma. Kolhe R et al. identificaron una sobreexpresión de 10 miARNs y una infraexpresión de 6 miARNs en el LPB en comparación al LDCBG. Entre los miARNs sobreexpresados se encuentra miR-196a, un represor de *ANXA-1* que codifica la proteína anti-apoptótica annexina-1, por lo que este miARN podría inhibir la apoptosis y contribuir a la supervivencia de las células tumorales(119). Un segundo estudio ha comparado el perfil de expresión de miARNs del LPB con el del LB y el plasmacitoma extramedular (PCEM). El LPB parece mostrar heterogeneidad en base a la expresión de los miARNs, sin embargo, con perfiles de expresión cercanos al LB o el PCEM, asemejándose más este último. Entre ellos, destacan la expresión diferencial de miR-148a-5p, miR-1273f, miR-4488 y -miR-494-3p en el LPB en comparación al LB (42). A pesar de estos trabajos, se desconoce el papel que desempeñan estos miARNs en la regulación de la expresión génica en el LPB.

1.3.1.4. miR-150-5p

El precursor miR-150 se ha asociado con la hematopoyesis y la diferenciación de las células B. Este miARN se encuentra altamente expresado en células B maduras mientras que no se expresa en los precursores de célula B(120,121). La sobreexpresión de miR-150 de manera ectópica en células madre hematopoyéticas y en células progenitoras impide la diferenciación de células B inmaduras(121). miR-150 regula la diferenciación de las células B controlando la expresión de *MYB*(120).

Introducción

Sin embargo, en neoplasias hematológicas de célula B madura como el LDCBG y el LB la expresión de miR-150 disminuye considerablemente en comparación a otras neoplasias de CG más inmaduras(122). Durante la transformación del linfoma folicular los niveles de expresión de miR-150 descienden a consecuencia de la represión mediada por c-Myc, lo que conlleva a un aumento de *FOXP1*, un gen asociado a la supervivencia y agresividad de las células tumorales(123).

El papel que desempeña la forma madura miR150-5p en el desarrollo de diversos cánceres resulta controvertida. Algunos artículos describen que miR-150-5p actúa como un oncomiR regulando la proliferación, apoptosis, la progresión tumoral y la metástasis(124,125). En cambio, parece que más autores apuntan a que miR-150-5p tiene un papel supresor tumoral impidiendo la invasión tumoral y reduciendo las capacidades metastáticas de los tumores(126–129). De hecho, una expresión baja de miR-150-5p se ha asociado con supervivencias más cortas en diversos cánceres(123,130,131). Aunque no están claros los mecanismos por los que miR-150-5p regula el desarrollo del cáncer, algunos estudios apuntan a que actúa como represor de la vía Akt/mTOR. Por un lado, inhibe directamente la transcripción del factor de crecimiento vascular endotelial A (*VEGFA*) el cual es un activador de la vía de señalización Akt/mTOR(130). Por otro lado, miR-150-5p reprime *GF1R/IRS1*, activadores de la vía PI3K/AKT/mTOR(131).

Pese a los estudios mencionados, la implicación de miR-150-5p en la diferenciación tardía de las células B, incluyendo la diferenciación a CP no ha sido explorada, así como tampoco su implicación en la linfomagénesis del LPB.

1.3.2. Metilación del ADN

La metilación del ADN consiste en la incorporación de un grupo metilo (-CH₃) al quinto carbono del anillo de la pirimidina de una citosina, dando lugar a una 5-metilcitosina (5-mC, **Figura 6**). Este proceso es catalizado por las enzimas metiltransferasas (DNMT), siendo DNMT3A/B encargadas de la metilación *de novo*, y DNMT1 de mantener la metilación tras rondas de replicación celular(132). Por el

contrario, la desmetilación es llevada a cabo por las enzimas TET1-3 que eliminan el grupo metilo a través de la oxidación de la 5-mC, generando una 5-hidroximetilcitosina (5-hmC); a continuación, una 5-formilcitosina (5-fC) y, posteriormente, una 5-carboxicitosina (5'-caC). Por último, la enzima TGD (*thymine-DNA glycosylase*) devuelve la citosina a su estado desmetilado. Por otro lado, la desmetilación pasiva puede tener lugar tras mutaciones o alteraciones de pérdida de función de *DNMT3A/B*, generando la desmetilación progresiva del ADN tras rondas de replicación celular(132,133).

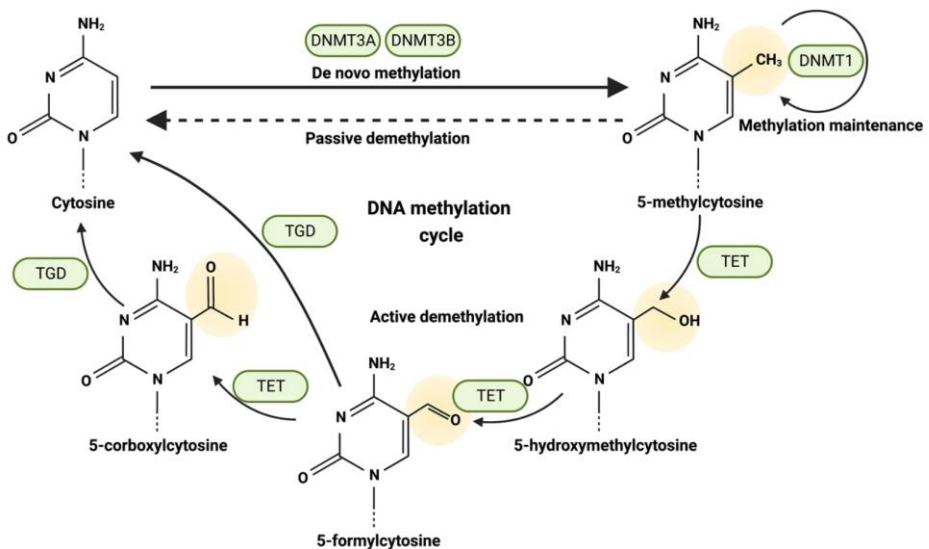


Figura 6. Esquema del ciclo de metilación del ADN. Imagen adquirida de Yang J et al. 2023(115) De manera activa las enzimas DNMT3A/B metilan la citosina convirtiéndola en 5-metilcitosina (5-mC). La desmetilación pasiva ocurre cuando la marca de metilación se va perdiendo tras procesos de replicación. Para evitarlo, DNMT1 mantiene la metilación del ADN. El proceso de desmetilación del ADN es llevado a cabo por las proteínas TET en 3 pasos: de 5-mC a 5-hmC, a 5-fC y a 5-caC. Por último, la 5-fC o la 5'-caC son finalmente desmetiladas a citosina través de la enzima TDG.

La metilación se produce en los dinucleótidos CG localizados en las regiones enriquecidas en GC de aproximadamente 200 bp, llamadas islas CpG que se encuentran en gran medida en las regiones promotoras de los genes(134). El grupo metilo incorporado en la cisteína conlleva, por un lado, un impedimento estérico, es decir, impide la unión de los FTs a la región promotora. Por otro lado conlleva la

Introducción

captación de las proteínas MBP (*methyl-CpG binding proteins*) que reprimen la transcripción(135).

Las marcas de metilación del ADN influyen en la regulación de la expresión génica dependiendo de la región del gen en la que se localicen. Se ha descrito que la hipermetilación en las regiones promotoras del gen (TSS1500, TSS200, 5'UTR y el primer exón) así como la hipometilación en el cuerpo y la región 3'UTR da lugar a la represión de la transcripción y a la consecuente infraexpresión del gen (**Figura 7**). El patrón opuesto de metilación de ambas regiones da lugar a un potenciamiento de la transcripción, aumentando la expresión génica.

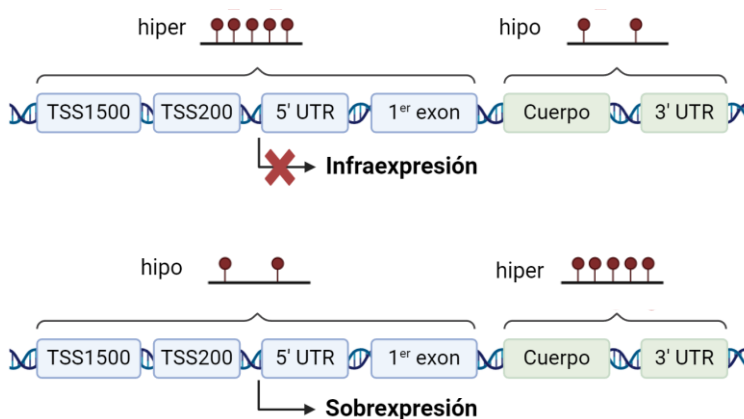


Figura 7. Regulación transcripcional en base a las marcas de metilación del ADN. Un gen es infraexpresado cuando la hipermetilación se produce en las regiones reguladoras del gen, como TSS1500, TSS200, 5'UTR y 1er exón, y a la hipometilación en el cuerpo y la región 3'UTR del gen. La hipometilación de las regiones reguladoras y la hipermetilación del cuerpo y la región 3'UTR da lugar a la sobreexpresión del gen.

1.3.2.1. DNMT

Las DNMTs catalizan la transferencia del grupo metilo de una S-adenil metionina al carbono 5 del residuo de citosina a través de una unión covalente(136). *DNMT3* es relevante para la diferenciación de las células madre hematopoyéticas y mutaciones en dicho gen se han asociado a la patogénesis de diversas enfermedades hematológicas. Especialmente, *DNMT3B* está altamente alterado en la leucemia linfoblástica aguda de células T (LLA-T)(115,137). En el linfoma de Hodgkin (LH) se

ha identificado una infraexpresión de *DNMT3B* y *DNMT1* así como una sobreexpresión de *DNMT3A* tras la infección por el VEB(138). En cambio, *DNMT1* y *DNMT3B* muestran una expresión incrementada en el LB que puede ser debida a la activación transcripcional por c-Myc(139,140). Por el momento, no se han identificado alteraciones genéticas en los genes *DNMT* en el LPB.

1.3.2.2. TET

Las enzimas TET catalizan la desmetilación del ADN a través de su dominio catalítico, el cual oxida el residuo metilado del ADN diana. El hecho de que TET no se una directamente al grupo metilo, permite que estas enzimas no solo se unan a 5-mC, sino también a 5-hmC o 5-fC, aunque muestran mayor afinidad por 5-mC(133). Concretamente, alteraciones en *TET2* han sido descritas en diversas enfermedades hematológicas, actuando como supresor tumoral en el LDCBG(141). Sin embargo las mutaciones en *TET1* y *TET3* no son comunes en neoplasias hematológicas, aunque se ha visto que compensan el déficit de *TET2*, actuando a su vez como supresores tumorales(142). *TET2* desempeña un papel relevante en el mantenimiento del CG por lo que una pérdida de dicho gen conlleva la infraexpresión de marcadores de CP como *IRF4* y *PRDM1*, impidiendo la diferenciación final de las células B(81). Sin embargo, se han descrito mutaciones *missense*, *nonsense* or *frameshift* que inactivan este gen en un 12% de casos de LPB lo que sugiere que *TET2* podría estar impidiendo la diferenciación final de plasmablasto a CP(56,67).

1.3.2.3. VEB en la regulación de la metilación del ADN

Se ha descrito que el VEB es capaz de regular el ADN de las células huésped en diversas enfermedades a través de diversas proteínas virales que regulan las proteínas DNMT y TET. LMP1, LMP2A y EBNA3C regulan positivamente DNMT1 mientras que LMP1, LMP2A regulan negativamente las proteínas TET, asociándose a un aumento en la metilación de genes supresores tumorales en diferentes neoplasias, incluyendo el LB(143–146). No obstante, estas proteínas virales no suelen expresarse en el LPB debido a que se asocian a latencias II/III del VEB, poco frecuentes entre los

Introducción

pacientes con LPB. Recientemente, se ha descrito que la proteína EBNA1, expresada en el programa de latencia tipo I, regula los niveles de *DNMT3A* a través del FT E2F1 en el carcinoma gástrico. EBNA1 puede promover la unión de E2F1 a *DNMT3A* lo que conlleva un aumento de la proliferación y la inducción de la progresión del ciclo celular(147). Hasta la fecha, no se han identificado alteraciones genéticas en los *DNMTs* en el LPB, en cambio, Witte et al. han identificado sobreexpresión de *DNMT3B* en pacientes con LPB asociados al VEB(66). Estos datos son sugestivos de que el VEB está implicado en el control de la metilación del LPB y podría contribuir al silenciamiento de genes supresores de tumores a través de modificaciones en el patrón metilacional. La metilación del ADN no solo es crucial para la regulación de los genes de la célula huésped, sino para la regulación del programa de latencia del VEB. Aunque se desconocen los mecanismos por los que se metila el genoma del VEB, se sabe que *DNMT3A* está implicado en el mantenimiento del programa de latencia del VEB(147). Además, la metilación del ADN del VEB juega un papel fundamental en la regulación de la salida de la fase de latencia para iniciar el ciclo lítico, así como para escapar del reconocimiento del sistema inmune del huésped(148).

Por el momento, no se han llevado a cabo estudios de las alteraciones epigenéticas en el ADN en el LPB, por lo que se desconoce su perfil de metilación del ADN.

1.4. Ciclo celular

El ciclo celular es el mecanismo celular por el cual tiene lugar la duplicación de una célula(149,150). El ciclo celular se divide en 4 fases en base al contenido y la organización del ADN, así como la condensación y segregación de los cromosomas. Durante la primera fase del ciclo, la fase G1, la célula se prepara para la duplicación del ADN, durante la segunda fase, la fase de síntesis o fase S, tiene lugar la replicación del ADN. A continuación, durante la fase G2 la célula se prepara para la división que tiene lugar en la fase de mitosis o fase M(151,152). Esta fase, a su vez se agrupa en 4 procesos: profase, metafase, anafase y telofase, en la que se sintetizan las

estructuras necesarias para distribuir el ADN y se produce la división nuclear y citoplasmática dando lugar a 2 células(153). No obstante, no todas las células se encuentran en el proceso de ciclo celular y pueden permanecer en una quinta fase, llamada fase sub-G0(154). Entre las células no proliferativas que permanecen en esta fase encontramos las células senescentes y las quiescentes, las cuales pueden volverse a incorporar al ciclo celular tras estímulos de activación del mismo(152,155).

La entrada o salida de las células al ciclo celular está regulada por señales externas que inducen o detienen la división celular, llamados mitógenos o antimitógenos, respectivamente(156,157). En la fase G1 las células pueden seguir distintos caminos, la progresión del ciclo celular o la entrada en quiescencia o senescencia. En ausencia de mitógenos el ciclo celular se arresta y las células pueden salir del ciclo celular entrando en la fase G0(157). Al final de la G1 se encuentra un punto decisivo para la regulación de la progresión del ciclo celular conocido como punto de restricción (*checkpoint*). Este punto de control está regulado principalmente por la familia de FTs E2F, encargados de activar el programa de transcripción requerido para el progreso de las células entre las fases G1-S(158–160). Una vez superado el punto de restricción, las células se ven comprometidas a seguir con el ciclo celular aún en ausencia de mitógenos(158,161). Sin embargo, Cornwell et al. recientemente han postulado que la mitosis y la salida de las células del ciclo celular son mutuamente excluyentes y compiten temporalmente por el destino celular en un proceso reversible. Tras superar el punto de restricción, las células en ciclo pueden salir del ciclo celular en ausencia de mitógenos, a no ser que lleguen primero a la fase de mitosis y empiecen a dividirse, cuestionando la teoría de la progresión del ciclo celular(162).

1.4.1. Principales reguladores del ciclo celular

1.4.1.1. Proteínas activadoras

El ciclo celular es controlado por múltiples proteínas, siendo los complejos compuestos por las quinasas CDK (*cyclin-dependent kinases*) y las ciclinas los

Introducción

principales reguladores de la progresión del mismo(163,164). Entre las CDK, las CDK1-6 están implicadas en la regulación del ciclo celular. Las ciclinas que regulan este proceso se agrupan en 4 familias: ciclina A (A1, A2), B (B1, B2, B3), D (D1, D2, D3) y E (E1, E2)(165,166). Mientras que la expresión de las CDK se mantiene constante durante todo el ciclo, la expresión de las ciclinas difiere dependiendo de la fase del ciclo celular, tanto a partir de la regulación de su transcripción como de su degradación (**Figura 8**). La inactivación o activación de los complejos CDK-ciclina depende de la fosforilación (mediada por Wee1 y Myt1) o desfosforilación (mediada por Cdc25)(152,163). La unión de CDK1/2 a sus ciclinas además es regulada por las subunidades reguladoras de las quinasas dependientes de ciclinas (Cks1 y Cks2)(152).

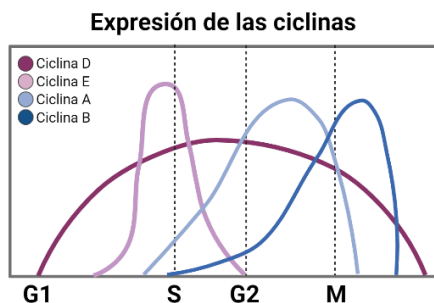


Figura 8. Expresión de las ciclinas según la fase del ciclo celular. Las ciclinas D se expresa durante las 4 fases del ciclo. Las ciclinas E se expresa a final de la fase G1 y empieza a degradarse tras la progresión a la fase S. Las ciclinas A aumentan su expresión a durante la fase S y empiezan a degradarse en la fase G2. Las ciclinas B se empiezan a expresar en la fase S y se degradan en la fase de mitosis.

1.4.1.2. Proteínas inactivadoras

Los inhibidores del ciclo celular son fundamentales para la correcta progresión del ciclo celular a través de la inhibición de los complejos CDK-ciclina de la fase en la que se encontraba la célula, permitiendo la progresión a la siguiente fase. Además, son cruciales para la detención del ciclo celular cuando se detecta algún error como es el caso del daño en el ADN. Hay dos familias principales de inhibidores, los inhibidores de la CDK4/6 (INK4) y las proteínas de interacción con CDK/proteínas inhibidoras de quinasas (Cip/Kip). En la familia INK4 encontramos p16^{INK4a} (*CDKN2A*), p15^{INK4b} (*CDKN2B*), p18^{INK4c} (*CDKN2C*), p19^{INK4d} (*CDKN2D*) que son inhibidores directos de CDK4/6(167–169). En la familia Cip/Kip se incluyen p21^{WAF1/Cip1} (*CDKN1A*),

p27^{Kip1} (*CDKN1B*) i p57^{Kip2} (*CDKN1C*) que inhiben la unión CDK1/2 a sus ciclinas, aunque también activan los complejos CDK4/6-ciclina D(170).

El proteasoma es una pieza clave en la degradación de proteínas y la regulación del ciclo celular. Las proteínas que serán sometidas a degradación son marcadas con ubiquitina a través de las enzimas ubiquitina ligasas E3. Dentro de esta familia se clasifican las CRL (*culling-RING ubiquitin ligase*) y las APC/C (*anaphase-promoting complex/cyclosome*)(171,172). Dentro de las CRL, se clasifican 8 complejos implicados en el control del ciclo celular, la replicación, la reparación del ADN y la remodelación de la cromatina, siendo el más conocido en el control del ciclo celular el complejo SCF (*Skp1-Cullin 1-F box*). Este complejo reconoce las proteínas CDK y ciclina ubiquitinas, controlando su expresión a lo largo de las distintas fases del ciclo celular(173). Por otro lado, APC/C es un complejo multiproteico que ubiquitina los complejos CDK-ciclina para su degradación. La fosforilación de algunas subunidades de APC/C necesaria para su actividad, a su vez es dependiendo de CDK-ciclina.

1.4.2. Fases del ciclo celular

Fase G1

Al inicio de la fase G1 la expresión de las ciclinas es baja a causa de su degradación por el proteasoma mediada por APC/C, por lo que la interacción CDK-ciclina es limitada. Tras la señal recibida por los mitógenos los niveles de ciclina D aumentan, mientras que los antimitógenos inducen la reducción de p15-16, que inhiben los complejos CDK4/6-ciclina D(152). Este complejo fosforila la proteína del retinoblastoma (Rb) inactivándola parcialmente, la cual reprime los FTs E2F. La fosforilación de Rb permite la liberación parcial de E2F, dando lugar a la activación del su programa transcripcional, entre cuyos genes se encuentra la ciclina E (*CCNE1*)(174). Los niveles de esta proteína aumentan al final de la fase G1, la cual se une a CDK2 formando un complejo que produce la hiperfosforilación de Rb. Este proceso causa la liberación completa de E2F y la activación completa del programa transcripcional necesario para la progresión de la fase G1-S (**Figura 9**)(152,175). El

Introducción

complejo CDK2-ciclina E es reprimido por p21 y p27 controlando su activación. A medida que aumenta la ciclina D, los complejos CDK4/6-ciclina D reprimirán p21 y p27, lo que disminuirá la represión que ejercen sobre CDK2-ciclina E. A su vez, este complejo es capaz de fosforilar p27 facilitando su degradación por el proteasoma al final de esta fase(175).

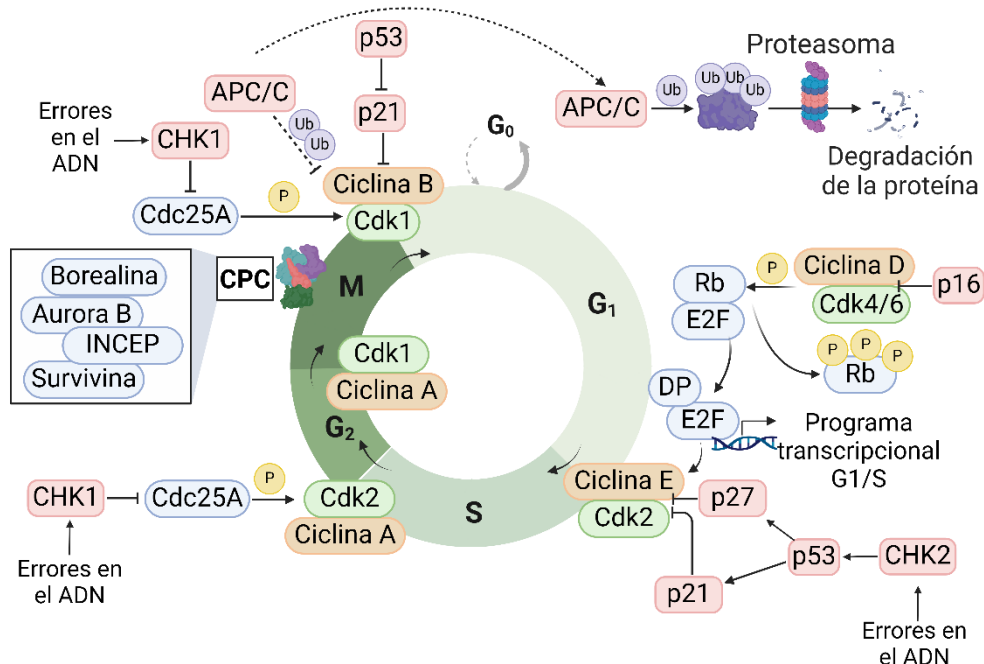


Figura 9. Ciclo celular. El esquema muestra las proteínas que controlan la progresión del ciclo celular según cada fase.

Fase S

Al producirse la transición a la fase S, el proteasoma activa la degradación de la ciclina E no unida a CDK2. Además, en esta fase aumenta la expresión de la ciclina A, la cual se une a CDK2 (**Figura 9**). En cambio, p21 y p27 son inhibidos en esta fase facilitando la actuación del complejo CDK2-ciclina A que induce la síntesis del ADN. Al finalizar este proceso, se activa CDK1 y se empiezan a aumentar los niveles de ciclina B, cuyo complejo será necesario en la siguiente fase(152).

Fase G2-M

Una vez replicado el ADN se activan los mecanismos para la transición S-G2 en el cual, a través del complejo CDK1-ciclina A, se induce la expresión de Plk1 que fosforila a FoxM1, el cual activa el programa transcripcional de genes implicados en la mitosis(176,177). En el proceso de mitosis, CDK1 se une a la ciclina B, la cual es reprimida por p21 (**Figura 9**). CDK1 asimismo puede estar unida en esta fase a la ciclina A. Estos complejos fosforilan proteínas necesarias para llevar a cabo la mitosis como Plk1, Aurora A y Aurora B, survivina(178). Tras la mitosis, la CDK1 es inhibida para favorecer la salida de las células de esta fase del ciclo celular.

1.4.3. E2F

E2F es una familia de FTs que son cruciales para el correcto funcionamiento del ciclo celular, especialmente, activando el programa transcripcional necesario para la transición G1-S y para la iniciación de la síntesis de ADN(179). Esta familia se compone de 8 miembros, E2F1-E2F3A que son activadores del ciclo celular y E2F4-E2F8 que actúan como represores de este. Cabe mencionar que la isoforma E2F3B puede actuar tanto de activador como de represor del ciclo celular(180,181). E2F7 y E2F8 son represores atípicos, capaces de unirse a los promotores de E2F inhibiendo la transcripción del resto de miembros de la familia(182,183).

Los E2F presentan una estructura bien conservada, prácticamente compartida entre todos los miembros (**Figura 10**). Es por ello que los E2F pueden unirse al mismo conjunto de genes, no obstante, también hay unión de algunos E2F a dianas selectivas(184). La transcripción de los genes diana está regulada por la unión de los E2F al ADN formando complejos proteicos con uno de los miembros de la familia TFDP (*transcription factor dimerization partner family*) que incluye TFDP1-3. Estos miembros carecen de dominio de transactivación por lo que por sí mismos no son capaces de regular la expresión génica, por ello dimerizan con los E2F(185-187).

Introducción

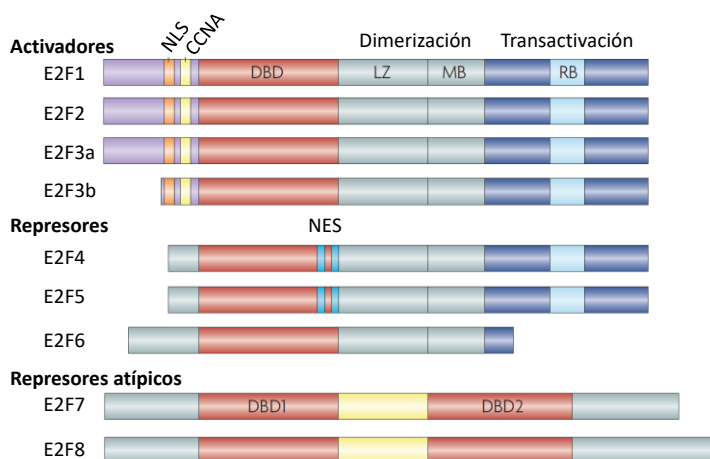


Figura 10. Estructura E2F. Imagen de Dan Xie and Qin Pei, 2019(188). Los E2F presentan diversos dominios que difieren entre los 8 miembros. Los dominios incluyen: secuencia de localización nuclear (NLS), dominio de regulación de ciclina A (CCNA), sitio de unión al ADN (*DNA binding*) en el que se encuentran 2 secuencias de exportación nuclear (NES). El dominio de dimerización está compuesto por *leucine zipper* (LZ) y *marked box* (MB). El dominio de transactivación contiene la secuencia que es reconocida por el retinoblastoma (RB). En el caso de E2F7 y E2F8 únicamente presentan 2 dominios de unión al ADN en tándem.

La expresión de estos miembros varía a lo largo de la progresión del ciclo celular (**Figura 11**). Esta expresión es regulada principalmente por las proteínas conocidas como *pocket proteins*, entre las que se incluyen los miembros de la familia del retinoblastoma (Rb): pRb, p107/RBL1 y p130/RBL2(188,189). Al inicio de la fase G1, estas proteínas se encuentran reprimidas por Rb. Ante señales mitogénicas en esta fase, se activan las proteínas CDK4/6 que fosforilan la proteína Rb. Esto provoca la liberación de E2F del Rb, activando de este modo a las proteínas E2F1-3. Estos FTs activan diversos genes entre los que se encuentran las ciclinas E y A que formarán complejos con CDK2. El complejo CDK2-ciclina E es necesario en la fase final de la G1 para inducir la progresión a la fase S, mientras que el complejo CDK2-ciclina A regulará la progresión del ciclo en la fase S. Estos complejos a su vez, regulan negativamente el Rb, permitiendo mayor producción de ciclinas E y A en un circuito de retroalimentación.

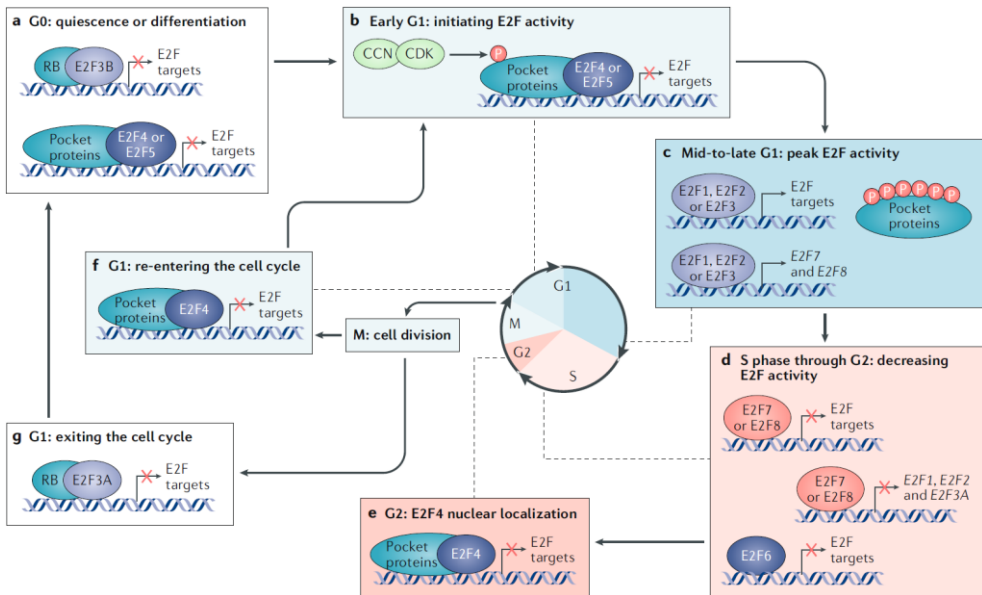


Figura 11. Expresión de los E2Fs a través de la progresión del ciclo celular. Imagen de Dan Xie and Qin Pei, 2019(188) en la que se muestra la inactivación o activación de los diferentes miembros de la familia a lo largo de la progresión del ciclo celular.

La expresión de los E2F a lo largo del ciclo varía a fin de controlar la homeostasis celular. Los activadores E2F1, E2F2 y E2F3A que tiene funciones solapantes, muestran el pico máximo durante la transición de las fases G1-S. La transcripción de estos E2F puede ser inducida directamente por Myc, a través de la regulación de los complejos CDK-ciclina, así como por la propia autorregulación de los E2F(190–192). Estos miembros son degradados al final de la fase S a través de CCNF (*F box protein cyclin F*), sustrato del complejo multiproteico de ubiquin-ligasas SCF. De esta manera se previene que las células vuelvan a iniciar la replicación del ADN(193). Alternativamente, E2F1 puede ser degradado por el proteasoma a través de la ubiquitinación mediada por APC/C(194). Los inactivadores E2F3B, E2F4, E2F5 y E2F6 se expresan a lo largo de todas las fases del ciclo celular, mientras que los represores atípicos E2F7 y E2F8 se expresan al final de la fase S y su degradación es mediada al final de la G2 por APC/C(189,195,196).

Entre algunas de las dianas de E2F se incluyen CDKs (*CDK1, CDK4*), ciclinas (*CCNB, CCNE*), inhibidores del ciclo (*RB1, CDKN1A, CDKN1B, CDKN2A, CDKN2B*,

Introducción

CDKN2C). Asimismo, regulan genes involucrados en los puntos de control, es decir, momentos del ciclo celular decisivos para su progresión entre las distintas fases (*TP53*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CHK1*). Otro proceso fundamental que regulan es la reparación del ADN (*RPA1*, *RAD51*, *MSH2*, *MLH1*) necesario para el correcto funcionamiento del ciclo celular. Además de la inducción de la transición G1/S (*CCNE1*, *CDC25A*, *MYB*, *E2F1-E2F3*), los E2F regulan genes que actúan en la fase S, necesarios para la síntesis y replicación del ADN (*CDC45L*, *CDC6*, *MCM2-7*, *RRM2*) y genes implicados en la transición S/G2 (*AURKB*, *BIRC5*, *CCNA2*, *CSK1*, *CKS2*, *MKI67*, *KIF4A*)(197).

En condiciones normales, los E2F controlan el correcto funcionamiento del ciclo celular manteniendo la estabilidad genómica. Bajo condiciones de estrés replicativo, daños en el ADN y una proliferación descontrolada se induce la apoptosis, asegurando que estas células dañadas sean destruidas(198–201). Durante la fase G1, E2F1 induce la apoptosis de manera dependiente o independiente de p53(202,203). A su vez, en la apoptosis inducida por Myc, ésta requiere de la actividad de diversos E2F, especialmente E2f1 para dar lugar a la acumulación de p53 tal y como se ha visto en fibroblastos de embrión de ratón(191). Se ha sugerido que E2f3 también podría estar relacionado con la inducción de la apoptosis mediada por E2f1 en condiciones de respuesta a daños en el ADN en el mismo modelo *in vivo*(198). Por otro lado, alteraciones en E2F pueden conllevar a una segregación cromosómica defectuosa y a la aparición de alteraciones genéticas aberrantes. Durante la transición G1/S el par de centriolos implicados en los movimientos de división celular, se separan, se duplican y se desplazan hacia los polos de la célula preparándose para la división celular durante la mitosis. Una pérdida de *E2F3* conlleva a una amplificación del centriolo lo que ocasiona defectos en la segregación cromosómica y a una mitosis aberrante, dando lugar a alteraciones genéticas como la aneuploidía(204). Asimismo, E2F3 activa la transcripción de *BIRC5* gen codificante de la survivina, un regulador de la segregación cromosómica y regulador negativo de la apoptosis inducida por caspasas. La ausencia de survivina impide a las células

entrar en apoptosis tras errores en la segregación cromosómica durante la división celular, asociándose a la formación de poliploidías(205).

1.4.3.1. E2F en cáncer

La desregulación en el complejo *CDK-pocket proteins* conlleva a una desregulación de la actividad de E2F y, en consecuencia, una alteración del funcionamiento y la progresión del ciclo celular que ha sido asociada al desarrollo de diversos cánceres(188,189). La inactivación de *RB*, así como la ganancia de función o activación sostenida de las CDKs conduce a la activación descontrolada de los *E2F*. El aumento de la actividad de E2F, da lugar al mal funcionamiento de 2 pilares fundamentales, por un lado, se genera estrés replicativo y, por otro, la vía de la apoptosis se ve comprometida. El estrés replicativo comporta errores en el ADN, alterando la segregación cromosómica durante la mitosis, originando diversas alteraciones genéticas como aneuploidías y poliploidías en diversos cánceres(206–208). Juntamente con estos hechos, la inhibición de la apoptosis conlleva la supervivencia de estas células dañadas, favoreciendo el desarrollo tumoral, su progresión y la resistencia a tratamientos. Además, los E2F también están involucrados en la regulación de procesos relacionados con el cáncer, tales como la angiogénesis y el metabolismo(188). Parece ser que los E2F son necesarios para asegurar la proliferación a través del control del ciclo celular en células madre del cáncer e inducen la autorrenovación de estas células a través de las vías NOTCH y WNT/*b-catenin* y participan en la transición epitelio-mesénquima potenciando la capacidad metastática de las células tumorales(209–212). Por todo ello, estos FTs despiertan especial interés como dianas a estudiar en el desarrollo y tratamiento del cáncer(188).

El papel que desempeñan los E2F en las células tumorales maduras, sin embargo, no ha sido bien definido. La acumulación de E2F3 conlleva a una proliferación aumentada cuando hay deficiencia de *RB*, en cambio, en un contexto de depleción de p53, las células son capaces de proliferar en ausencia de E2F1-E2F3, probablemente a través de mecanismos alternativos a la progresión del ciclo

Introducción

celular(213,214). En cambio la inhibición de E2F1 produce un arresto del ciclo celular y una reducción de la proliferación en las células progenitoras de la leucemia mieloide crónica(215). Cabe destacar la estrecha relación entre c-Myc y E2F1 en el control de la proliferación y apoptosis de células en ciclo. E2F1 es requerido por c-Myc para promover la proliferación de linfomas inducidos por este oncogén(216). Por otro lado, la necesidad de E2F1 para inducir apoptosis mediada por c-Myc parece diferir entre células sanas y tumorales. Mientras que en condiciones normales c-Myc requiere de E2F1 para promover la apoptosis, en un modelo de ratón de linfoma de célula B asociado a *Myc* la apoptosis resulta independiente de E2f1(191,216). Sin embargo, en ratones la resistencia a la apoptosis debida a una deficiencia en p53, es revertida cuando se inactiva *E2f1*, indicando la implicación de E2f1 en la regulación de la apoptosis(217).

En otros modelos de cáncer en ratones, la ganancia de copias de *E2f1* y *E2f3b* se asocia a la generación y desarrollo tumoral mientras que la pérdida de estos genes bloquea la tumorigénesis lo que indica que se requieren para la progresión del cáncer(180,218–220). Además, la amplificación de *E2F3* incrementa la expresión de sus genes diana lo que comporta el impedimento a salir del ciclo celular tras condiciones de daño en el ADN, favoreciendo la supervivencia de las células tumorales con inestabilidad genética(221). Por otro lado, alteraciones en los inhibidores atípicos del ciclo celular también han sido asociadas a la tumorigénesis. Un incremento de E2F7 promueve la metástasis e invasión a través de la activación de la angiogénesis mediada por VEGFR-2 en el carcinoma hepatocelular(222,223), mientras que la pérdida de *E2f7* y *E2f8* puede conducir al desarrollo tumoral en ratones(224,225).

Dado que los E2F son reguladores esenciales del ciclo celular se localizan principalmente en el núcleo, sin embargo, su exportación al citoplasma puede vincularse a la carcinogénesis. En este sentido, la desregulación del balance núcleo-citoplasma puede verse promovida por el VEB(226–228). El VEB promueve la exportación de E2F4 y E2F5 al citoplasma inducida por LMP1 remodelando las

distribuciones de los E2F en la célula, pudiendo evitar que las células salgan del ciclo celular o entren en quiescencia(227).

1.4.3.2. E2F en la diferenciación

Además de los mecanismos previamente mencionados, los E2F también están relacionados con la diferenciación celular. Diversos estudios han destacado el papel que desempeña E2F3 en la diferenciación neuronal(229–232). Por un lado, la represión de la isoforma E2F3a por Rb asegura la correcta diferenciación neuronal(229), mientras que la isoforma E2F3b parece esencial en la diferenciación miogénica independientemente de Rb(233). Por otro lado, parece ser que E2F3 junto con E2F1-2 tienen funciones duales en los progenitores y en las células diferenciadas en el intestino delgado(234). Mientras que actúan como activadores de la división de los progenitores de estas células, adquieren la función opuesta en las células diferenciadas(234). Una pérdida prolongada de E2F3 en tejidos adultos no parece influenciar en el desarrollo del tejido, probablemente por la compensación ejercida por los otros miembros de la familia con las mismas funciones como E2F1 y E2F2(235). En cuanto a los órganos linfoides secundarios se refiere, la inactivación de *E2f3* en ratones deficientes para *E2f1* y *E2f2* produce severas alteraciones en la médula ósea, reduciendo la presencia de linfocitos y células mieloides sugiriendo que la pérdida de E2F3 en combinación con E2F1 y E2F2 resulta letal en animales adultos, lo que apunta a que la combinación de estos 3 miembros es fundamental para una correcta diferenciación en diferentes tejidos(235,236).

1.4.4. BIRC5/Survivina

Como se ha mencionado, la survivina, es un regulador del punto de control G2/M del ciclo celular involucrado en la segregación cromosómica durante la mitosis, así como una proteína inhibidora de la apoptosis (IAP)(237). Se ha descrito que además, puede regular la muerte celular no apoptótica y promover la proliferación y supervivencia celular(238).

1.4.4.1. Survivina y ciclo celular

Durante la fase de mitosis, la survivina forma parte de un complejo llamado CPC (*chromosomal passenger complex*). Este complejo está compuesto por la survivina, la borealina/CDCA8, la quinasa Aurora B e INCENP. INCENP es la proteína estructural necesaria para la unión de las proteínas del complejo y para la localización de CPC en el centrómero de los cromosomas (**Figura 12B**)(239,240). La survivina es activada a través de su fosforilación mediada por diversos elementos como Aurora B, Cdk1, Plk1 y Ck2(241,242). Durante la profase, el CPC se encuentra en los brazos cromosómicos y se empieza a acumular en el centrómero (**Figura 12A**). Durante esta fase, la Aurora B fosforila la survivina en el residuo de serina 117 (Ser117) activándola, asegurando que la unión a los centrómeros se mantenga estable hasta la correcta orientación cromosómica(243,244). A su vez, la Aurora B fosforila el residuo de serina 10 (Ser10) de la histona H3 y facilita la fosforilación del residuo de treonina 3 (Thr3) de esta misma histona a través de Haspin, a cuyo residuo fosforilado se unirá la survivina (**Figura 12B**). Borealina/CDCA8 es también fosforilado por Cdk1 y por Aurora B y mantiene una estrecha relación con la survivina(242,245).

En la metafase, el CPC juega un papel importante en el mantenimiento del huso mitótico. Se encarga de asegurar que los cromosomas se unan correctamente a los microtúbulos de ambos polos del huso mitótico a través de los cinetocoros presentes en el centrómero y asegura el correcto alineamiento de los cromosomas en el huso mitótico. En este proceso, la survivina se une a los microtúbulos a través de su dominio α -hélice (**Figura 12C**). En la anafase, el CPC se libera del centrómero y permanece localizado en la mitad del huso mitótico garantizando la correcta segregación cromosómica y la estructura del huso mitótico central. Se produce la segregación cromosómica en la cual cada copia migra a uno de los polos de la célula. Finalmente, durante la telofase el CPC se localiza en la parte central, en el surco de escisión por el que se dividirá en 2 células, asegurando la correcta división celular o citocinesis(242,246). Alteraciones genéticas en alguna de las proteínas que componen el complejo CPC conduce a una incorrecta segregación cromosómica y división celular, generando inestabilidad genética(242).

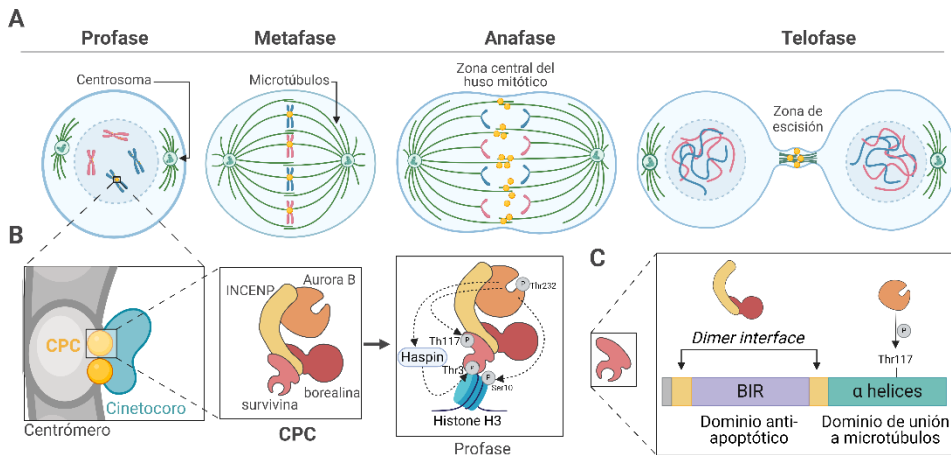


Figura 12. Composición de CPC y su localización en la mitosis. **A.** Se muestra la distribución del CPC a lo largo de las distintas fases de la mitosis (profase, metafase, anafase y telofase). **B.** En esta figura se representa el CPC unido al centrómero y cinetocoro durante la profase. En la segunda imagen se muestran los componentes del complejo y en la tercera, se especifican las fosforilaciones que permiten la unión del CPC a la histona H3. **C.** Se representan los dominios de la survivina.

La survivina se expresa a altos niveles durante la transición G2/M aunque se expresa en niveles más bajos durante la fase G1. La transcripción de *BIRC5* esta controla a través de las distintas fases del ciclo celular por E2F, de los cuales, E2F1-E2F3 activan su transcripción en la fase G1, mientras que E2F4-E2F5 la reprimen. Además, p130 y pRB se asocian a la inactivación de *BIRC5*, probablemente a través de la represión de E2F1-E2F3(247). A su vez, la survivina regula CDK4 que conlleva a la fosforilación de Rb, dando lugar a la liberación del Rb y permitiendo la activación de E2F y la consecuente transcripción de *BIRC5*(248,249). Aunque la survivina desempeña su principal función durante la fase G2/M, cabe destacar que puede ser crucial para la transición G1/S en ausencia de mitógenos en células B(250). Asimismo, se ha visto que el complejo AuroraB/survivina/mTOR controla la transición G1/S y la proliferación en células T, aunque el mecanismo no ha sido descrito por el momento(251).

1.4.4.2. Survivina y apoptosis

La survivina es la proteína más pequeña de la familia de proteínas IAP. Es capaz de inhibir la apoptosis independientemente de la unión a caspasas a través de su dominio BIR (*Baculovirus IAP repeat*; **Figura 12C**), encargado de su función antiapoptótica(252). La survivina es regulada por múltiples proteínas, incluyendo supresores tumorales como p53, FHIT (*fragile histidini triad*), APC (*adenomatous polyposis coli protein*) y PML4 (*Promyelocytic Leukemia Protein 4*) que reprimen *BIRC5*(253,254), mientras que oncogenes como el FT TCF4, STAT3, E2F, CDK1, mTOR, intermediarios de la vía PI3K–Akt y la chaperona HSP90 lo activan(255–259). Concretamente, p53 reprime *BIRC5* en una retroalimentación negativa. En condiciones normales p53 reprime *BIRC5* tras daño en el ADN, evitando la supervivencia de las células dañadas, mientras que a su vez, bajos niveles de survivina estabilizan p53(260,261). La survivina inhibe la apoptosis a través de la represión de las caspasas 3,7,9 y los efectores de éstas, Bax y Fas(262). Además, la survivina interacciona con XIAP, otra proteína antiapoptótica, estabilizándola frente a la degradación del proteasoma e impidiendo de este modo la muerte celular programada(263).

1.4.4.3. Survivina en cáncer

La survivina actúa como oncogén, expresándose de manera aberrante en los diversos cánceres. Esta proteína ha sido extensamente asociada con la agresividad tumoral, invasión, resistencia a fármacos y un pronóstico desfavorable en diversos cánceres. Es por ello, que ha sido propuesta como diana terapéutica contra múltiples neoplasias y se han desarrollado diversidad de inhibidores o fármacos contra esta proteína(238,264). Una expresión elevada de survivina se ha asociado con pronósticos desfavorables en diferentes tipos de cáncer incluyendo el LDCBG y puede ser usada como biomarcador de mal pronóstico en el LDCBG de célula B activada de pacientes tratados con R-CHOP(265–267). Sin embargo, en pacientes con mutaciones en *STAT3*, una expresión elevada de survivina se asocia a pronósticos más favorables(267). Múltiples inhibidores han sido probados *in vitro*

para evaluar el impacto de la reducción de la survivina en la progresión tumoral(264). Algunos de ellos como YM155(268–270) y Terameprocol(271,272) han sido además probados en diversos ensayos clínicos en combinación con pautas de quimioterapia o radioterapia mostrando resultados prometedores en diversos cánceres.

TGF- β promueve la represión de la transcripción de *BIRC5* a través de CDE/CHR (*cell cycle-dependent elements and cell cycle genes homology region*). Sin embargo, mutaciones en dichos elementos dan lugar a la activación del promotor que aumenta la expresión de la survivina asociándose a una progresión tumoral(273). Mutaciones en los miembros RB/E2F dan lugar a alteraciones de múltiples elementos reguladores del ciclo celular que rompen su homeostasis. Además, deleciones en genes como pRB, p16 o p21, así como amplificaciones en E2Fs, CDK4 conllevan la expresión descontrolada de la survivina(247).

Por el momento, el papel que podría desempeñar *BIRC5* en la patogénesis del LPB es desconocido, sin embargo, diversas vías de señalización alteradas en el LPB (*apartado 2*) regulan su expresión, por lo que podrían estar potenciando la transcripción de *BIRC5*. En este sentido, STAT3 activa directamente la expresión de la survivina(257,274). Se ha visto *in vitro* que el suplemento del medio con IL-6, el cual induce la vía JAK-STAT, induce la expresión de la survivina en el cáncer de mama(257). Como se ha mencionado previamente, la línea celular PBL-1 es dependiente de IL-6 para proliferar, por lo que la activación de la vía IL-6/JAK/STAT en el LPB podría potenciar la transcripción de *BIRC5* mediada por las mutaciones activadoras descritas en STAT3(39,56). Por otro lado, H-Ras y K-Ras inducen la expresión de la survivina a través de la activación de MAPK/ERK (*extracellular-signal-regulated kinase*)(275–277). Las mutaciones activadoras descritas en esta vía de señalización podrían a su vez, favorecer el enriquecimiento de la survivina en el LPB. Otra característica de la patogenia del LPB es la infección del VEB. En este sentido, la proteína EBNA1 del VEB contribuye a la prevención de la apoptosis a través del potenciamiento de la survivina uniéndose a su promotor a través de un complejo junto con Sp1. Esto sugiere que el VEB podría participar en la sobreexpresión de la survivina en linfomas asociados a su infección como podría ocurrir en el LPB(278).

2. HIPÓTESIS

Existen diversos estudios sobre las características clínicas, el tratamiento y el pronóstico del LPB. Sin embargo, la caracterización genética y molecular de esta enfermedad sigue siendo poco conocida. Aunque recientemente se han descrito alteraciones genéticas asociadas al LPB, todavía queda un largo recorrido para discernir las alteraciones en la expresión génica y las modificaciones epigenéticas que conducen al desarrollo de este linfoma.

Por ello, la **hipótesis** que se plantea en esta tesis es que la caracterización del transcriptoma y epigenoma ayudarán a esclarecer la patogénesis del LPB, identificando mecanismos celulares en el LPB con un funcionamiento aberrante.

3. OBJETIVOS

El **objetivo** principal de esta tesis es identificar procesos celulares alterados en el LPB y cómo las modificaciones epigenéticas contribuyen a la desregulación de perfil de expresión génica en dicho linfoma. Los objetivos específicos que se plantean son:

1. Evaluar la expresión génica y de miARNs del LPB, con el fin de identificar posibles interacciones miARNs-genes diana con potencial impacto en la patogénesis del LPB.
2. Describir el patrón de metilación del ADN y cómo estas alteraciones epigenéticas afectan al perfil de expresión génica en el LPB.
3. Identificar promotores de la linfomagénesis y determinar el potencial terapéutico de ciertos marcadores para el desarrollo de nuevos tratamientos en el LPB.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Esta tesis se estructura en 3 bloques principales metodológicamente, a partir de los cuales se han distribuido los materiales y métodos correspondientes. No obstante, algunas técnicas son comunes a más de un bloque:

Estudios en muestras humanas

- Estudios de expresión de miARNs: *microarrays* de miARNs
- Estudios de expresión génica: secuenciación de ARN
- Metilación de ADN
- FISH e inmunohistoquímica

Estudios *in vitro* en la línea celular PBL-1

- Estudios del papel de miR-150-5p como supresor tumoral en el LPB
- Evaluación de E2F3 como promotor del LPB
- Evaluación de E2F y la survivina como dianas terapéuticas en el LPB
- Analizar el papel de E2F3 y MYC en la diferenciación de los plasmablastos

Estudios *in vivo* en el modelo de membrana corioalantoidéa de pollo (MCA)

- Evaluación de E2F y la survivina como dianas terapéuticas en el LPB *in vivo*.

4.1. Metodología de estudios en muestras humanas

4.1.1. Muestras incluidas en los estudios transcriptómicos y epigenéticos

4.1.1.1. Selección de los casos

Gracias al consorcio internacional de linfoma plasmablastico creado por el Dr. José Tomás Navarro y el Dr. Georg Lenz, se recogieron muestras fijadas en formalina y embebidas en parafina (FFEP) de casos diagnosticados previamente de LPB, entre los años 2000-2016. Se incluyeron muestras de distintos hospitales de Alemania, liderado desde el Hospital Universitario de Münster, y diversos hospitales de España liderado desde el Hospital Universitario Germans Trias i Pujol (HUGTiP), uno de Suiza y uno Reino Unido.

Materiales y métodos

En primera instancia, diversos anatomopatólogos del consorcio llevaron a cabo una revisión centralizada histológica para confirmar el diagnóstico de cada caso. Para ello realizaron un estudio de inmunohistoquímica (IHC) con un panel de marcadores: ALK1, Blimp1, CD3, CD20, CD30, CD38 CD56, CD138, EBER, HHV8, Ki67, MUM1, PD-L1 tal y como se describe en Frontzek F. et al. (**Tabla 15**)(56). Por otro lado, se realizó un estudio de la translocación de *MYC* mediante FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) descrito en el *apartado 3*. Los casos fueron clasificados, de acuerdo a la clasificación de la Organización Mundial de la Salud de 2017(1), en LPB, plasmacitoma, LPB-PTLD (enfermedad linfoproliferativa postransplante), LPB transformado de leucemia linfática crónica (síndrome de Richter), plasmacitoma, LDCBG y LDCBG HHV8+.

Para los estudios de transcriptómica, se determinó el contenido tumoral a partir tinciones de hematoxilina-eosina (HE) de cortes de los bloques FFEP. De los 106 casos finalmente clasificados como LPB, los casos incluidos en el estudio presentaron un contenido tumoral superior al 70% (mediana de 85%) a excepción de 3 casos entre 50-60%. Como grupo control se incluyeron muestras de 14 ganglios reactivos, es decir, ganglios que muestran linfadenopatía no asociada a enfermedad neoplásica, de los cuales, 7 pacientes presentaban infección por el VIH y 7 ausencia de esta. En la **Figura 13** se muestra un esquema de los criterios de exclusión para los estudios transcriptómicos.

El estudio ha sido realizado de acuerdo con los principios éticos de la Declaración de Helsinki, la ley de investigación biomédica (Ley 14/2007) y la aprobación por los comités éticos del HUGTiP, el hospital universitario de Tübingen, Glasgow y Basel.

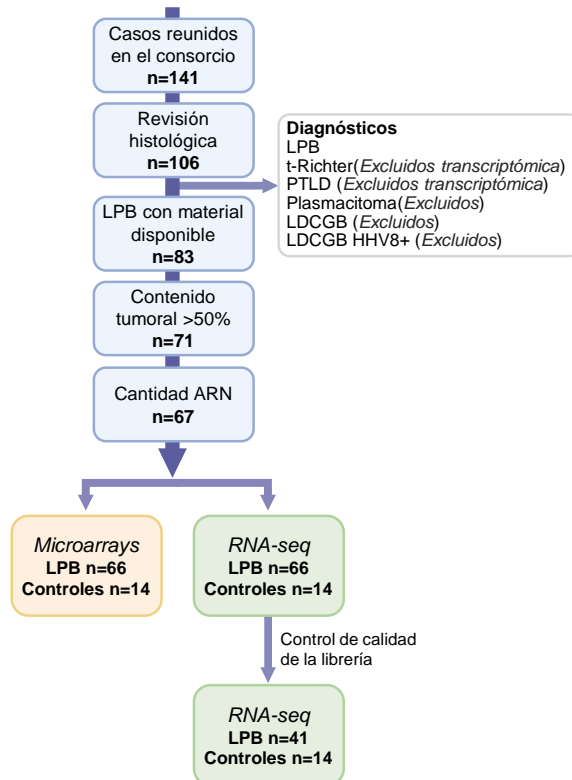


Figura 13. Selección de muestras. Esquema de los criterios de exclusión de las muestras del Consorcio de linfoma plasmablastico para la inclusión de las muestras en los estudios de expresión génica y de miARNs.

Puesto que el grupo colaborador liderado por el Dr.Georg Lenz en Alemania llevó a cabo estudios genómicos en la misma cohorte de pacientes, que incluyeron la secuenciación completa del exoma (WES) y el estudio de alteraciones en el número de copias somáticas (SCNA). El ADN de toda la cohorte fue extraído por dicho grupo tal y como se describe en Fabian F. *Nat Comm.* 2021(56). Tras realizar los estudios genómicos, nos enviaron las muestras de ADN disponibles, para llevar a cabo los estudios de metilación del ADN. Cabe mencionar que no todos los LPB incluidos en el estudio de metilación, se incluyeron también en los estudios de transcriptómica debido a las limitaciones en la cantidad o calidad del material genético. Finalmente se incluyeron en los estudios de metilación 38 LPB, 2 LPB-Richter y 2 LPB-PTLD. Además, se incluyeron muestras de ADN de 7 de los controles incluidos en los estudios de ARN y ADN de la línea celular PBL-1.

4.1.1.2. Datos clínicos de los pacientes

Se recogieron los siguientes datos de los pacientes: género, fecha de diagnóstico, tratamiento administrado, fecha de respuesta o fecha de *exitus* y SG. Los datos biológicos en el momento del diagnóstico que se recogieron incluyeron el estado serológico para la infección del VIH y LDH como marcador tumoral. Además, se recogieron el resto de los parámetros necesarios para calcular el IPI tales como edad, ECOG, estado Ann-Arbor y localización de las afectaciones extraganglionares. Se agruparon los pacientes en base a los 3 parámetros asociados a la etiopatogenia del LPB: infección por el VIH, presencia del VEB en las células tumorales y la alteración genética *t-MYC*.

4.1.2. Extracción de ARN y ADN de muestras FFEP y cuantificación

La extracción de ARN de los casos previamente recogidos se llevó a cabo a partir de 2 cortes de los bloques FFEP de 10µm usando el kit *Recover All Total Nucleic Acid Isolation* (Applied Biosystems-Ambion) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN de la cohorte de LPB reunida en el Consorcio de LPB fue extraído por el grupo del Dr. Georg Lenz tal y como se publicó en el artículo Fabian F. *Nat Comm.* 2021(56). El ADN de los casos control incluidos en el estudio de metilación de ADN fue extraído a partir de 2 cortes de los bloques FFEP de 10µm usando el kit *Recover All Total Nucleic Acid Isolation* (Applied Biosystems-Ambion) las instrucciones del fabricante.

Brevemente, tras la desparafinación de los cortes con xilol a 50°C se realizó una digestión con proteasa y se aisló el material genético. Éste fue digerido con ADNasa para la obtención del ARN o con ARNasa para la obtención del ADN. La concentración de ARN y ADN, así como su pureza fueron determinadas a partir de 1.5 µl de muestra mediante el espectrofotómetro *NanoDrop™ One/OneC* (Thermo Fisher Scientific). Para el análisis de la pureza se evaluaron los cocientes de las absorbancias 260/280nm y 260/230nm. El cociente 260/280nm permite evaluar la presencia de contaminación proteica, mientras que el cociente 260/230nm permite evaluar la presencia de otros contaminantes como sales y solventes orgánicos como

los fenoles. Los valores 260/280nm deben ser ~ 2 para el ARN y ~ 1.8 para el ADN y los valores 260/230nm deben ser $\sim 2-2.2$ para el ARN y ~ 2 para el ADN. En el caso del ARN, los valores de la ratio 260/280nm se mostraron en el rango entre 1.20-1.86. Las muestras con baja calidad o insuficiente cantidad de ARN se excluyeron de los estudios transcriptómicos (**Figura 13**).

4.1.3. Secuenciación de ARN

Para realizar la secuenciación de ARN se usaron un total de 2 μ g de ARN de las muestras FFEP de 66 LPB y 14 controles. Las muestras se enviaron al Centro Nacional de Análisis Genómico (CNAG), donde se realizó la secuenciación del ARN.

Control de calidad del ARN

Las muestras fueron cuantificadas de nuevo en el CNAG de manera más precisa usando el kit ARN Qubit™ de amplio rango. Dado que para llevar a cabo la secuenciación de ARN se requiere una alta integridad del mismo, y es habitual una baja integridad en muestras FFEP, en el CNAG se revisó la integridad de las muestras usando el *Agilent RNA 6000 Nano Kit* (Agilent Technologies) en el *Bioanalyzer Agilent 2100* (Agilent Technologies) que separa el ARN por electroforesis capilar. Según la ratio de las moléculas de ARN ribosómico (ARNr) 18S y 28S se genera un número de integridad del ARN (RIN, *RNA integrity number*) en un rango de 1-10, siendo 1 el perfil más degradado y 10 el más intacto. Aunque para estudios de secuenciación se recomienda una buena calidad del ARN (RIN>8), el ARN de muestras FFEP tiene una integridad inferior, con un RIN alrededor de 2-3. Se calculó además el DV200, valor que indica el porcentaje de fragmentos de ARN > 200 nt, evaluando de este modo la calidad del ARN de manera más precisa. Aquellas muestras con un DV200 < 30% son consideradas de baja calidad y la secuenciación se puede ver comprometida. De las 80 muestras enviadas a secuenciar, 46 presentaron un DV200 < 30%, no obstante, se decidió proceder con generación de las librerías de todas las muestras (**Figura 14**).

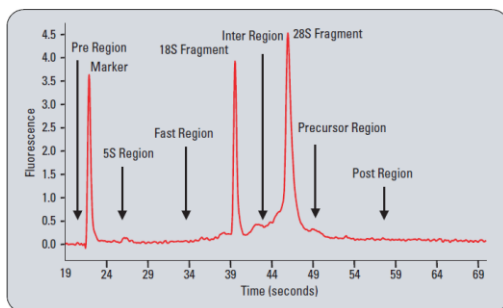


Figura 14. Integridad del ADN evaluada con *Bioanalyzer*.

Generación y control de calidad de la librería

El ARN ribosómico (ARNr) representa más del 80% del ARN total, por lo que se debe eliminar a fin de no reducir la profundidad de la secuenciación y no limitar la detección de ARN menos frecuentes. Para llevar a cabo este proceso existen dos metodologías, la eliminación del ARNr y la captura del ARNm a través de las colas poly-A. Se eligió la eliminación del ARNr por ser la más recomendable para muestras FFEP(279). En esta metodología, el ARNr hibrida con oligo-sondas biotiniladas complementarias que permiten la eliminación del ARNr a través de bolas magnéticas recubiertas de estreptavidina. Se usó el kit *Truseq stranded total RNA* (Illumina) para la eliminación del ARNr, síntesis del ADNc y PCR para la generación de las librerías de secuenciación, siguiendo las indicaciones del fabricante. Tras la generación de las librerías, se evaluó la molaridad y el tamaño de los fragmentos. Se excluyeron 25 librerías que mostraron una molaridad > 15nM. Las 55 librerías restantes (41 LPB, 14 controles) presentaron un tamaño >240 pb.

Secuenciación del ARN

Las muestras fueron secuenciadas de manera *Multiplex* en varios carriles de diferentes *flow cell* siguiendo el método *paired-end*, con un tamaño de lecturas de 2 x 150 pb con el secuenciador *NovaSeq 6000 S4* (Illumina). La profundidad de la secuenciación conseguida fue aproximadamente de 80 millones de lecturas *paired-end* por muestra.

Análisis de los datos

El análisis de los datos se llevó a cabo por el bioinformático del grupo. En primer lugar los datos crudos (*fastq*) fueron sometidos a un control de calidad de la secuenciación a través del programa *FastQC* (v.0.11.9; Andrews S. 2010)(280) que fue superado por todas las muestras. Se prosiguió con la eliminación de los adaptadores, que son secuencias unidas durante la generación de la librería a fin de identificar de manera individual las lecturas correspondientes a cada muestra. Los adaptadores fueron eliminados usando el *software Trimmomatic* (v.0.39). Las secuencias sin adaptadores se alinearon frente al transcriptoma de referencia (*gencode.v38.transcripts.fa*) mediante *Salmon* (v.1.4.0) usando la metodología *quasi-mapping*. Para comprobar el correcto alineamiento se realizó un control de calidad usando *Qualimap* (v.2.2.2d) que no fue superado por 1 muestra, quedando incluidos en los posteriores análisis 40 LPB y 14 controles. A continuación, se usó *Salmon* (v.1.4.0) para la cuantificación de las lecturas y se realizó un análisis PCA (*principal component analysis*) a fin de evaluar la dispersión entre las distintas muestras y los grupos. Además, se realizaron análisis de expresión diferencial entre grupos usando *RStudio* (R v.4.0.5) y el paquete *DESeq2* incluyendo las comparaciones: LPB vs control, LPB VIH-positivo vs -negativo, LPB VEB-positivo vs -negativo. Tras dicho análisis se aplicaron diversos filtros a fin de evitar considerar genes falso-positivos con expresión diferencial. Se tuvieron en cuenta únicamente los genes que codifican proteínas cuya mediana para el recuento de expresión por grupo (LPB o control) fuese mayor que 5. Se consideraron genes diferencialmente expresados (GDEs) aquellos con un $\log_2\text{Fold Change}$ ($\log_2\text{FC}$) $> |1|$; y p-valor ajustado (p-adj.) < 0.05 . A partir de estos genes se realizó un análisis de enriquecimiento (GSEA; *Gene Set Enrichment Analysis*) usando el paquete *ClusterProfiler* (v.3.18.1) y el programa GSEA (v.4.1.0) a partir de los conjuntos de genes *Hallmark* (MSigDB), GO (Gene Ontology) y KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*).

4.1.4. Expresión de miARNs

Inclusión de muestras y control de calidad

Para el estudio de expresión de miARNs se incluyeron 66 LPB y 14 controles. Dicho estudio se realizó en la plataforma de *microarrays* del IJC, para el que se requirieron 560 ng de ARN total de dichas muestras. Se llevó a cabo un control de calidad del ARN usando el *Agilent RNA 6000 Nano Kit* (Agilent Technologies) en el *Bioanalyzer Agilent 2100* (Agilent Technologies) (**Figura 14**).

Microarray de miARNs

El estudio de expresión de miARNs se realizó en la plataforma de microarrays del Instituto Josep Carreras (IJC). El array usado para determinar la expresión de los miARNs fue el *GeneChip™ miRNA 4.0 Array* de Affimetrix (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Este *array* incluye ~30K de sondas maduras de diferentes especies, de los cuales ~6.6K de sondas complementarias de miARNs maduros humanos, pre-miARNs, ARNsno y ARNsca. Aproximadamente, 560 ng del ARN total de cada muestra se procesaron según las guías de uso de *FlashTag™ Biotin HSR RNA Labeling*. Para los lavados, marcaje y escaneo de los arrays se usaron los reactivos *ThermoFisher® 450 fluidics station* y *GeneChip® Scanner 3000 7G* de acuerdo con las indicaciones del fabricante.

Análisis de los datos

EL análisis bioinformático se llevó a cabo con el programa R (v.4.0.2). Se realizó un control de calidad de los datos crudos usando el paquete *ArrayQualityMetrics*, que superaron todas las muestras. La normalización de las muestras se realizó mediante la metodología *Robust Multi-Array Average*. Se realizó un análisis de PCA a fin de evaluar la dispersión entre las distintas muestras y los grupos. Posteriormente, se realizaron 2 análisis de expresión diferencial usando el paquete *limma* analizando las sondas de manera independiente. Estos análisis incluyeron las

siguientes comparaciones: LPBs vs controles (*Homo Sapiens*) y LPB VEB-positivos vs VEB-negativos (*Homo Sapiens* y VEB)

Se consideraron miARNs diferencialmente expresados (mDE) de manera significativa aquellos con $\log_2FC > |1|$ y $p\text{-adj.} < 0.001$. Para el análisis de enriquecimiento de los miARNs se seleccionaron las dianas validadas de los miARNs diferencialmente expresados según las anotaciones de *Affymetrix* (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/902411>) usando el paquete de *ClusterProfiler* (v.4.1.0) y la base de datos de GO.

4.1.5. Evaluación de las interacciones miARNs-genes diana

A fin de profundizar en el papel de los miARNs como reguladores de la expresión génica se identificaron las posibles interacciones miARNs y los genes diana. Para acotar el número de mDEs incluidos en este análisis, se consideraron únicamente los miARNs con $\log_2FC > |3|$; $p\text{-adj.} < 0.001$ y los GDEs con $\log_2FC > |1|$, $p\text{-adj.} < 0.05$, dianas validadas de *Affymetrix*. Además, se añadió algún gen de interés validado que no aparecía en las anotaciones mencionadas.

4.1.6. Metilación del ADN

Puesto que hasta la fecha el epigenoma del LPB no ha sido descrito, decidimos estudiar la metilación del ADN en la plataforma de genómica del IJC incluyendo 41 LPB (37 LPB, 2 LPB-PTLD, 2 LPB-Richter), 7 controles y la línea celular de LPB, PBL-1(39).

Procesamiento de las muestras

Para dicho estudio se requirieron 300 ng de ADN de las muestras FFEP (*apartado 2.1*) y 600 ng de ADN de las muestras frescas congeladas y de la línea celular PBL-1 (*apartado 8.1*), a partir de los cuales se realizó la conversión bisulfito usando el *EZ-96 Methylation kit* (*Zymo Research Corp.*) según las especificaciones del fabricante.

Materiales y métodos

Posteriormente, el ADN fue lavado, desnaturalizado, ligado y eluido. El ADN resultante fue hibridado con el *850K Infinium MethylationEPIC BeadChip (Illumina Inc.)* siguiendo el protocolo de *HD Methylation assay*.

Análisis de los datos

El análisis bioinformático de los datos fue realizado por el bioinformático de la plataforma de genómica del IJC. El control de calidad de los datos de intensidad de señal sin procesar (archivos IDAT) se verificó utilizando el paquete de R *minfi (v1.40.0)*. Se realizaron diversos pasos de control de calidad y filtrado para minimizar errores y eliminar señales falso-positivas de la sonda. Fueron excluidas las sondas con los siguientes criterios: con un valor de detección de $p < 0.01$, localizadas en los cromosomas XY, superpuestas a los SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) dentro de los sitios CpG y sondas con reactividad cruzada.

Tras estos análisis, se excluyó 1 muestra control (muestras finales: 42 PBL, PBL-1 y 6 controles). Los valores beta de metilación del ADN se obtuvieron seguidamente de la normalización de la función *preprocessIllumina* utilizando el paquete *minfi* de R. El análisis genómico utilizando la referencia del genoma humano GRCh37-hg19 se realizó siguiendo el archivo de manifiesto de Illumina asociado con *MethylationEPIC v1.0 BeadChip*. Los perfiles de metilación del ADN se evaluaron con un análisis supervisado utilizando *minfi*. A continuación, se realizó un análisis diferencial de CpGs metiladas entre LPB y controles, en el cual, CpGs con un $p\text{-adj} < 0.05$ y una diferencia de media de metilación (valor β) de CpGs entre grupos $\Delta\beta > |0.33|$ se consideraron diferencialmente metiladas de manera significativa. Se utilizaron distancias euclidianas y el método *Ward.D* para el análisis de agrupamiento que se visualizó en un mapa de calor utilizando el paquete *ComplexHeatmap (v2.10.0)*.

Por último, se utilizó el programa GREAT para calcular la asociación entre el patrón de metilación y la expresión génica y el enriquecimiento de los GO-BP. Solo se consideraron para dicho análisis los GDEs sobreexpresados cuyo patrón de metilación concuerda con la expresión, es decir, genes hipometilados en las regiones

promotoras (TSS1500, TSS200, 1stExon, 5'UTR) e hipermetilados en las regiones del cuerpo (cuerpo, 3'UTR), comparando LPB vs controles. Los conjuntos de genes GO-BP se consideraron significativos cuando FDR <0.05.

4.1.7. Estudio de integración entre metilación de ADN y expresión génica

Con la finalidad de estudiar cómo la metilación de ADN influye en la desregulación de la expresión génica en el LPB, se realizó un estudio integrando los datos obtenidos previamente del estudio de metilación de ADN y de secuenciación de ARN. Para ello, se realizó una correlación entre metilación-expresión génica usando el test de correlación Spearman, incluyendo las CpG localizadas en genes diferencialmente expresados ($\log_2FC > |1|$; p-adj. < 0.05) y las CpGs diferencialmente metiladas ($\Delta\beta > |0.33|$; p-adj. < 0.05). Únicamente se correlacionaron los genes con el patrón de metilación de acuerdo con el esquema de la **Figura 7**. Se consideró una correlación significativa cuando $R > |0.3|$; p-adj. < 0.05).

4.1.8. FISH

La translocación de MYC mediante FISH se realizó en el departamento de anatomía patológica del HGTiP siguiendo los protocolos estándar (281). Las muestras de TMA (*Tissue Microarray*) de los diferentes pacientes se hibridaron con la sonda *Vysis LSI MYC dual color break-apart* y con la sonda de fusión MYC-IgH (Abbot Molecular). Al menos se analizaron 100 núcleos intactos por cada caso que se visualizaron en el microscopio epifluorescente (Leica Microsystems) y las se adquirieron las imágenes con el sistema de imagen ISIS (MetaSystems). En el caso de la sonda *break-apart*, la translocación de MYC se visualiza con la fluorescencia verde y roja por separado en al menos un 15% de las células analizadas. Para la sonda de fusión, la translocación de MYC se visualiza con la fusión de las fluorescencias verde y roja en al menos un 9% de las células analizadas.

4.1.9. Estudios inmunohistoquímicos

La evaluación de la expresión proteica de E2F3, survivina y c-Myc en los tumores de las muestras humanas incluidas en los estudios transcriptómicos se llevó a cabo mediante IHC. Se realizaron cortes de 4 μ M de las muestras FFEP disponibles, incluyendo 8 LPB y 9 controles. Los cortes se incubaron durante 30 minutos a 65°C y posteriormente se desparafinaron sumergiéndolas en diversas rondas en xilol y posteriormente se hidrataron en diversas rondas de etanoles graduales decrecientes, hasta ser finalmente sumergidas en agua destilada. El *antigen retrieval* se realizó a alta presión y temperatura durante 15 minutos en una solución compuesta por 2,94 gr citrato sódico, 0.05% Tween-20 (pH=6) en 1L de agua destilada. Seguidamente, se realizaron 2 lavados y se bloquearon las muestras con un 3% de peróxido de hidrógeno diluido en metanol a T_{amb.} Se lavaron las muestras con PBS y se incubaron con la solución de bloqueo (PBS, 4% BSA, 0.5% Tween-20, 5% de *anti-goat serum*) en una cámara húmeda durante al menos 1h a 37°C. A continuación, se incubaron con el anticuerpo primario anti-E2F3 y anti-survivina (**Tabla 15**) diluido en la solución de bloqueo O/N a 4°C. Al día siguiente se incubaron con el anticuerpo secundario (**Tabla 15**) diluido en solución de bloqueo durante 1 hora a 37°C. Tras 5 lavados de 5 minutos con PBS las muestras fueron incubadas con el *DAB peroxidase substrate* (Palex Medical S.A) durante un tiempo variable dependiendo del anticuerpo, hasta un tiempo máximo de 5 minutos. Finalmente, las muestras fueron teñidas con hematoxilina durante 3 minutos, lavadas, incubadas durante 30 segundos con ácido acético 1%, lavadas y deshidratadas mediante diversas rondas de etanoles a porcentaje crecientes y por último xilol. Las muestras deshidratadas se montaron con el cubreobjetos con la ayuda de medio de montaje, DPX. Las imágenes fueron adquiridas en el microscopio *Olympus BX53* (Olympus) y la expresión de las proteínas fue cuantificada usando *Image J* (v8.0).

4.2. Metodología de estudios *in vitro*

4.2.1. Líneas celulares

Para los estudios *in vitro* se usó la línea celular PBL-1 (S. Mine *Sci Rep.* 2017), la única línea celular disponible de LPB que fue adquirida directamente del laboratorio del Dr. Harutaka Katano, las líneas de LDCBG-ABC (TMD8, LY3, HBL1), de LDCBG-GCB (OCI-LY7, KARPAS-422 y la línea HEK-293T que fueron cedidas por el grupo del Dr. Gäel Roué o adquiridas de DMSZ. Por defecto, las células PBL-1 fueron cultivadas con medio completo (**Tabla 5**) y las células de LDCBG y HEK-293T con el medio no IL-6 (**Tabla 5**) e incubadas a 37°C y 5% de CO₂. Otros medios empleados dependiendo del experimento se recogen en la **Tabla 5**. Todos los medios que se recogen en la tabla están suplementados con 1% de L-glutamina (2mM), 1% de penicilina y estreptomicina (100 µg/mL) y 5ng/mL de IL-6 (PeproTech), si no se indica lo contrario:

Medio	Composición
Medio completo	<i>Advanced</i> RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS). Por defecto las células son cultivadas en dicho medio de cultivo si no se especifica lo contrario
Medio no IL-6	<i>Advanced</i> RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), sin IL-6.
Medio 20% FBS	<i>Advanced</i> RPMI 1640 suplementado con 20% de FBS.
Medio incompleto	<i>Advanced</i> RPMI 1640, sin FBS, sin IL-6

Tabla 5. Medios de cultivo usados en los diversos experimentos *in vitro*.

4.2.2. Generación PBL-1 *E2F3*^{mut} y PBL-1 *MYC*^{KO}

Con la finalidad de estudiar el papel oncogénico de *E2F3* y *MYC* en el desarrollo del LPB se decidió editar la línea celular PBL-1 *wild-type* (WT) mediante la herramienta de edición genética CRISPR-Cas9 para generar una línea *Knock-out* (KO) para *E2F3* (*E2F3*^{KO}) y para *MYC* (*MYC*^{KO}). Se electroporaron 0.5·10⁶ células PBL-1 con 36 pmoles de *Alt-R S.p. Cas9 Nuclease V3*, 22 pmoles de ARNg (ARN genómico) *Alt-R-CRISPR-Cas9* prediseñado y 22 pmoles de *ARNtrac CRISPR-Cas9 ATTO 550* de (*Integrated DNA Technologies*) usando el programa A-032 del

Materiales y métodos

Nucleofector II (Amaxa) e *Ingenio® electroporation kit (Mirus Bio)*. Los ARN genómicos prediseñados que se usaron para la generación de los KOs fueron:

Hs.Cas9.E2F3.1.AB: 5'-TTATGATATCACCAACGTTC-3'

Hs.Cas9.MYC.1.AB: 5'- GAAGGGTGTGACCGCAACGT-3'

4.2.2.1. Ensayo de dilución limitante

La obtención de clones de célula única con presencia de las alteraciones genéticas se consiguió mediante el ensayo LDA (*limiting dilution assay*). Para dicho ensayo se sembraron 0.3 células/pocillo electroporadas. En aquellos pocillos en los que había una única célula en proliferación, pasados los 30 días se realizó la extracción de proteína (*apartado 9.1*) y de ADN (*apartado 5.2*) para la validación de la generación de las líneas *E2F3^{KO}* y *MYC^{KO}*.

4.2.2.2. Extracción ADN de líneas celulares

Para la extracción de ADN se usó el *Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit* (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante para la extracción de ADN de líneas celulares. Brevemente, se lisaron las células y el material genético fue tratado con ARNasa para la obtención del ADN y las proteínas fueron eliminadas mediante precipitación. El ADN se cuantificó usando *NanoDrop[™] One/OneC* (Thermo Fisher Scientific) y se conservó a -20°C hasta su uso.

4.2.2.3. PCR de preamplificación

A partir del ADN total, se preamplificó la región de interés en la que se incluía la secuencias dianas del CRISPR de *E2F3* y *MYC* usando el kit *TaqMan PreAmp Master Mix* tal y como indica la **Tabla 6** usando los cebadores de la **Tabla 14**. La reacción tuvo lugar incubando las muestras en el termociclador *Applied Biosystems[™] 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems[™])* como se especifica en la **Tabla 7**.

Reactivo	μL
TaqMan Preamp Master Mix (2X)	10
Cebador directo (10 μM)	1
Cebador inverso (10 μM)	1
ADNc (apartado 4.12) 100ng	X
Agua libre de nucleasas	10 - X
Total	20

Tabla 6. Composición de la mezcla de preamplificación de la secuencia de interés.

Ciclos	Tiempo	Temperatura
1	5 min	95 °C
1	2 min	72 °C
35	30 seg	95 °C
	30 seg	*55-58 °C
	30 seg	72 °C
1	10 min	72°C

Tabla 7. Condiciones de la reacción de preamplificación de la secuencia de interés. *55°C para la preamplificación de MYC y 58°C para la preamplificación de E2F3.

4.2.2.4. Electroforesis en gel de agarosa

Para comprobar la preamplificación de la región de interés, se separaron 10 μL de ADN preamplificado (8 μL de ADN + 2 μL de Orange G 5X [Merck]) por peso molecular en un gel de agarosa al 2% (0.8g agarosa, 40 mL de tampón TBE [Tris-borato 90mM, EDTA 2mM, pH=8] y 0.1% de SYBRTM Safe (Invitrogen) aplicando un voltaje constante de 150V. Como marcador de peso molecular se usó *GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder* (ThermoFisher Scientific). Las bandas fueron visualizadas mediante una fuente de luz ultravioleta a través del *Molecular Imager® Gel Doc™ XR System* (Bio-Rad).

4.2.2.5. Secuenciación mediante la técnica Sanger

Para comprobar que el silenciamiento de *E2F3* y *MYC* mediante la tecnología CRISPR/Cas9 había funcionado correctamente, se secuenció el ADN de aquellos clones cuya expresión proteica (*apartado 9*) de *E2F3* y *c-Myc* estaba disminuida respecto a la línea PBL-1 WT. El ADN extraído de las líneas PBL-1 WT y de los posibles clones KO para *E2F3* y *MYC* (*apartado 5.2*) fue secuenciado mediante la metodología Sanger en Eurofins Genomics, a partir de 5 μL del ADN preamplificado (*apartado 5.3*) y 5 μL de los cebadores *E2F3-F seq*, *E2F3-R seq* (*E2F3*) y *MYC-F seq*, *MYC-R seq* (*MYC*) de la **Tabla 14** [10 μM]. Las secuencias obtenidas de los posibles

Materiales y métodos

clones KO se compararon con las secuencias de referencia de ambos genes usando la herramienta *BLAST* (NCBI). Tal y como se detallará posteriormente en el apartado 5.3 de resultados, no fue posible generar una línea $E2F3^{KO}$ y se seleccionó un clon *knockdown* para *E2F3* con mutaciones en el dominio de unión al ADN ($E2F3^{mut}$), nomenclatura que se usará en el resto de los apartados del trabajo.

4.2.3. Sobreexpresión o infraexpresión de miARNs

Con la finalidad de evaluar el posible papel supresor tumoral de miR-150-5p en el LPB se incrementó su expresión en la línea PBL-1. Para ello, se nucleofectaron $2 \cdot 10^6$ células con *miRVana* hsa-miR-150-5p mimic (nº cat: 4464084, ID: MC10070), *miRVana mimic* miR-1 control positivo (nº cat: 4392431) o con el miARN control negativo (nº cat: 14464058) a una concentración final de 100mM (Thermo Fisher Scientific) usando *Ingenio® Electroporation Kit* (Mirus) y el programa A-032 del *Nucleofector IIb* (Amaxa). Las células se incubaron durante 6 horas con 2 mL de medio 20% FBS en placas de 6 pocillos y tras este tiempo, se cambió el medio a 6 mL de medio completo. La comprobación de que la nucleofección se produjo correctamente, se realizó cuantificando la expresión de gen *TWF1/PTK9* (*Protein Tyrosine Kinase 9*) silenciado por el control positivo miR-1 (apartado 8.2). El efecto producido por la sobreexpresión fue evaluado a las 24, 48 o 72 horas dependiendo del experimento y el proceso celular estudiado como se indica en la **Figura 15**.

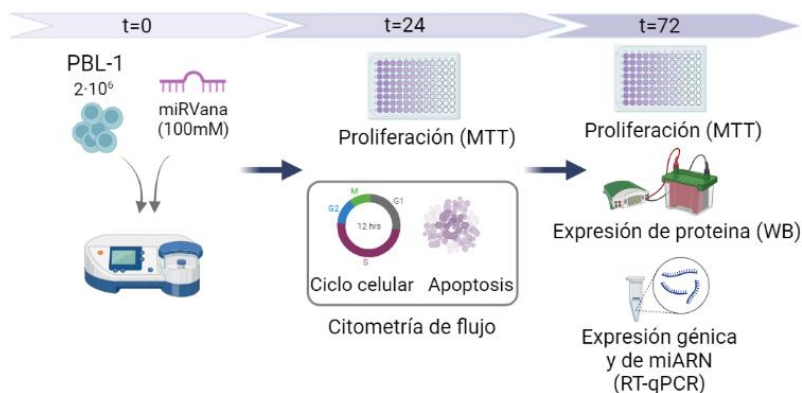


Figura 15. Metodología evaluación de la sobreexpresión de miR-150-5p.

4.2.4. Inhibición de E2F y survivina

Debido a que la survivina (*BIRC5*) y *E2F3* están sobreexpresados en el LPB y según los resultados de esta tesis, contribuyen a la linfomagénesis de dicha enfermedad, podrían ser nuevas dianas terapéuticas en el LPB a través de su represión mediante inhibidores. Puesto que no encontramos inhibidores específicos de E2F3 y, además, el resto de miembros de la familia E2F también se encuentran sobreexpresados en el LPB, escogimos HLM006474 (H; *Merck*) como inhibidor de E2F para realizar estos ensayos. Como inhibidor de la survivina se eligió el inhibidor S12 (S; *Merck*). Los inhibidores fueron resuspendidos en DMSO, cuyo reactivo se usó como control negativo.

4.2.4.1. Determinación de la IC₅₀

A fin de identificar la concentración adecuada de cada inhibidor para tratar las células PBL-1, se determinó la IC₅₀, es decir, la concentración necesaria de un compuesto que provoca la muerte del 50% de las células. Para establecer la IC₅₀ de los compuestos se analizó la viabilidad celular mediante el *CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega)*, basado en la cuantificación del ATP. Se sembraron en una placa de 96 pocillos $2 \cdot 10^4$ células en un volumen de 100 μ L por pocillo o 100 μ L de medio completo como blanco. Las células fueron tratadas durante 72 horas a diferentes concentraciones en un rango entre 1-100 μ M para los dos inhibidores o 1% de DMSO como control. Tras este tiempo, se midió la luminiscencia en el espectrofotómetro *Synergy H1 microplate reader (Biotek)*.

La luminiscencia de cada condición se normalizó restando la luminiscencia del blanco. El porcentaje relativo de inhibición se calculó respecto al DMSO, siendo éste 100% de proliferación. Se usó el programa *GraphPad Prism (v9.0)* para la creación de la curva con las diferentes concentraciones de los inhibidores y la identificación de la IC₅₀ de cada uno.

4.2.5. Estudios de expresión

4.2.5.1. Extracción de ARN de líneas celulares

La extracción de ARN de las muestras obtenidas en cultivos celulares se realizó con *TRIzol™ Reagent* (Invitrogen), una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina. Tras precipitar las células de cada condición se resuspendieron con 300-500 μL de TRIzol con la ayuda de una jeringuilla de 1 mL y una aguja 0.8 x 55 mm durante 5 minutos a T_{amb} . A continuación, se mezcló con 200 μL de cloroformo durante 5 minutos a T_{amb} . Tras una centrifugación, la fase acuosa se mezcló con 500 μL de isopropanol, O/N a -20°C . Tras 2 lavados con etanol 75% el ARN obtenido se dejó secar y se resuspendió con H_2O libre de ARNasa y ADNasa. Se cuantificó (*apartado 2.1*) y se almacenó a -80°C hasta su uso.

4.2.5.2. RT-qPCR

La expresión de miARNs y genes tanto para la validación de los estudios de transcriptómica, como de los diversos ensayos *in vitro* se realizó mediante RT-qPCR. Se usaron dos metodologías distintas, para la expresión génica se usó la metodología con *BRYT Green* mientras que para la expresión de miARNs se usaron sondas *TaqMan*.

4.2.5.2.1. Expresión génica

Retrotranscripción con *High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit*

Para la obtención del ADN complementario (ADNc) se realizó una retrotranscripción o transcripción inversa usando el kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) (**Tabla 8**). La reacción tiene lugar incubando las muestras en el termociclador *Applied Biosystems™ 2720 Thermal Cycler* (Applied Biosystem) 10 minutos a 25°C , 2 horas a 37°C y 5 minutos a 85°C . El ADNc obtenido se diluyó en agua libre de nucleasas a una dilución 1:5 y se conservó a -20°C hasta su uso.

Reactivo	Volumen (μL)
Tampón RT 10X	2
Mezcla dNTP 25X (100mM)	0.8
Cebadores aleatorios RT 10X	2
MultiScribe RT	1
Agua libre de nucleasas	4.2
ARN [200ng/ μL]	10
TOTAL	20

Tabla 8. Composición de la mezcla para la reacción de retrotranscripción.

qPCR

La cuantificación de la expresión génica se llevó a cabo usando el kit *GoTaqPCR Master Mix* (Promega) y los cebadores indicados en la **Tabla 14** en la reacción especificada en la **Tabla 9**. Como controles endógenos se incluyeron los genes *ACTB* (actina beta) y *GAPDH* (Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa). Con el fin de unificar las temperaturas de la reacción de RT-qPCR de todos los genes, los cebadores fueron diseñados con una temperatura de *melting* de entre 59-60°C a través de la página web *Primer3* (v 4.1.0).

Reactivo	Volumen (μL)
<i>GoTaq qPCR Master mix</i> (2X)	5
Cebador directo (20X)	0.5
Cebador inverso (20X)	0.5
Agua libre de nucleasas	3
ADNc (apartado 4.13.1.1)	1
Total	10

Tabla 9. Composición de la mezcla para la reacción RT-qPCR (BRYT Green).

Se incluyeron triplicados de cada muestra para cada una de las sondas como control negativo libre de contaminación la mezcla de reacción sin ADNc. La reacción de RT-qPCR tiene lugar en el dispositivo *QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR System* incubando las muestras 2 min, 95°C, 40 ciclos (15 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C). Los resultados son analizados con el programa *QuantStudio Real Time PCR Software* (v1.6.1) y se cuantifican de forma relativa (RQ) respecto a la muestra calibradora o control de la siguiente manera:

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct gen de interés} - \text{Ct gen control endógeno}$$

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct muestra de interés} - \Delta\text{Ct muestra control}$$

$$\text{RQ} = 2^{(-\Delta\Delta\text{Ct})}$$

4.2.5.2.2. Expresión miARNs

Retrotranscripción con *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit*

Para la obtención del ADNc para el estudio de expresión de miARNs se usó el kit *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) y los *TaqMan assay*: hsa-miR-150-5p (ID:000473), RNU44 (ID: 001094), RNU48 (ID001006); Applied Biosystems) que contienen cebadores 5X RT y cegadores 20X TM, tal y como se detalla en la **Tabla 10**. La reacción tuvo lugar incubando las muestras en el termociclador *Applied Biosystems™ 2720 Thermal Cycler* (Applied Biosystems) 30 minutos a 16°C, 30 minutos a 42°C y 5 minutos a 85°C. El ADNc obtenido se conservó a -20°C hasta su uso.

Reactivo	Volumen μL
<i>Mezcla de cebadors RT (0.05X)</i>	6
<i>dNTPs con dTTP (100mM)</i>	0.3
<i>MultiScribe Transcriptasa inversa (50U/UI)</i>	3
<i>10x Tampón RT</i>	1.5
<i>Inhibidor de ARNasa (20U/μL)</i>	0.19
<i>ARN [70ng/μL]</i>	3
<i>Agua libre de nucleasas</i>	1.01
<i>ARN [70ng/ μL]</i>	3
Total	15

Tabla 10. Composición para la reacción de retrotranscripción (con *TaqMan*).

Preamplificación

Debido a que los miARNs se encuentran en menor cantidad comparado con otros elementos genéticos, se realiza un paso intermedio para amplificar el ADNc de dichos miARNs previo a la RT-qPCR usando el kit *TaqMan PreAmp Master Mix* (**Tabla 11**). La reacción tiene lugar incubando las muestras 10 minutos a 95°C, 2 minutos a 55°C, 2 minutos a 72°C, 14 de ciclos (15 segundos a 95°C, 4 minuto a 60°C) y 10 minutos a 99.9°C, en el termociclador *Applied Biosystems™ 2720 Thermal Cycler* (Applied Biosystems). Tras la reacción de preamplificación, el ADNc es diluido con agua libre de nucleasas a una dilución 1:10 y se guarda a -20°C hasta su uso.

Reactivo	Volumen μL
<i>TaqMan Preamp Master Mix (2X)</i>	5
Mezcla cebadores TM (0.2X)	1.5
Agua libre de nucleasas	2.5
ADNc (apartado 4.13.2.1)	1
Total	10

Tabla 11. Composición de la mezcla de preamplificación del ADNc.

qPCR miARN

A partir del ADNc preamplificado (*apartado 8.2.2.2*), la RT-qPCR se lleva a cabo usando los cebadores TM especificados en la **Tabla 14** y el kit *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems) preparando la mezcla de reacción detallada en la **Tabla 12**.

Reactivo	Volumen μL
<i>TaqMan Universal PCR Master Mix (2X)</i>	5
<i>TaMan assay (sonda TM) 20X</i>	0.5
Agua libre de nucleasas	2.5
ADNc preamplificado (<i>apartado 8.2.2.2</i>)	2
Total	10

Tabla 12. Composición de la mezcla para la reacción RT-qPCR (*TaqMan*).

Se incluyeron triplicados de cada muestra para cada una de las sondas y como control negativo libre de contaminación, la mezcla de reacción con agua en lugar del ADNc preamplificado. La reacción de RT-qPCR tiene lugar en el dispositivo *QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR System* incubando las muestras 2 min, 50°C, 15 seg, 95°C, 40 ciclos (15 segundos a 95°C, 1 minuta a 60°C).

Los resultados de ambas RT-qPCR fueron analizados con el programa *QuantStudio Real Time PCR Software (v1.6.1)* y la RQ se calcula tal y como se indica en la fórmula indicada al final del *apartado 8.2.1.2*, respecto a los controles endógenos RNU44 y RNU48.

4.2.6. Expresión de proteína

4.2.6.1. Extracción de proteína

Para la extracción de proteínas, al menos $2 \cdot 10^6$ células se incubaron con 30 μL o 100 μL de la mezcla de tampón de lisis durante 30 minutos, dependiendo del tamaño del precipitado. Tras una centrifugación, el sobrenadante que contiene las proteínas se conservó a -20°C hasta su uso. La mezcla de tampón de lisis contiene: 485 μL de tampón de lisis (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH8, 1% Triton x-100), 5 μL de *cocktail 2* de inhibidor de fosfatasa (Merck), 5 μL de *cocktail 3* de inhibidor de fosfatasa (Merck), 5 μL de *cocktail* de inhibidor de proteasa (Merck).

4.2.6.2. Cuantificación de proteína

La cuantificación de proteína se llevó a cabo a través del *Pierce™ BCA Protein Assay Kits (ThermoFisher Scientific)*. La albúmina de suero bovino (BSA) a una concentración de 2 mg/mL se diluyó con la mezcla de tampón de lisis para preparar las 7 concentraciones de BSA para realizar la curva patrón:

2000 – 1500 – 750 – 500 – 250 – 125 – 25 ($\mu\text{g/ml}$)

En una placa de 96 pocillos se añadieron por duplicado 5 μL de las 7 diluciones de albúmina o 5 μL de mezcla de tampón de lisis sin muestra para el blanco. Por triplicado, se añadieron las muestras a cuantificar a una dilución 1:5 en mezcla de tampón de lisis. A continuación, se incubaron a 37°C durante 20 minutos con 95 μL de la solución BCA (1:50, reactivos B:A). Por último, se determinó la absorbancia a 562 nm en el espectrofotómetro *Multiskan™ Sky (Thermo Scientific)* usando el *software Skanlt*.

4.2.6.3. Western Blot

Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS

El estudio de la expresión proteica se llevó a cabo mediante la técnica Western Blot a partir de geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS), presente en

el tampón de carga y en el gel de electroforesis. El SDS es un detergente aniónico que contribuye a la desnaturalización de las proteínas y a la separación de las proteínas según su peso molecular.

Para la formación de los geles se usó el sistema *Mini-PROTEAN 3 Cell* (Bio-Rad) y el peine de 15 pocillos de 1.5mm. El gel se constituye en dos partes, un gel separador de un 12% de acrilamida y un gel concentrador de un 5% de acrilamida (**Tabla 13**).

Reactivo	Gel separador (12%)	Gel concentrador (5%)
Acilamida/Bis 30%(mL)	4.2	0.75
Tampón concentrador (mL) *	2.625	-
Tampón separador (mL) *	-	1.125
TEMED (μ L)	10	3
APS 10% (μ L)	100	45
H ₂ O _{Mq} (mL)	3.675	2.58

Tabla 13. Proporciones de los reactivos para la preparación de dos geles.

* - Tampón concentrador: 2 mL SDS (10%) + 48 mL Tris-HCl 1.5M pH= 8.8.

- Tampón separador: 2 mL SDS (10%) + 48 mL Tris-HCl 0.5M pH= 6.8.

Los geles se introdujeron en la cubeta de electroforesis que se llenó con el tampón de electroforesis (Glicina 192 mM, SDS 0.1% (p/v) y Tris-HCL 25 mM (pH 8.3). Posteriormente, se mezclaron 30 μ g de proteína con y 1.5 μ L de *NuPAGE™ Sample Reducing Agent 10X* (Invitrogen) y 3.75 μ L de *NuPAGE™ LDS Sample Buffer 4X* (Invitrogen), ajustando el volumen con tampón de lisis hasta un volumen de 15 μ L. Las muestras se calentaron durante 5 minutos a 95°C para la desnaturalización de las proteínas y a continuación, se dejaron 5 minutos en hielo. Cada muestra fue cargada en un carril del gel, a excepción de los carriles de los extremos donde se cargaron 5 μ L del marcador de peso molecular *BlueStar Plus Prestained Protein Marker* (Nippon Genetics). Para la electroforesis se aplicó un voltaje constante de 90 V durante los primeros 15 minutos o hasta que el frente de banda de electroforesis sobrepasase el gel concentrador. Después se aumentó el voltaje a 120 V hasta la desaparición del frente de banda de electroforesis.

Transferencia y bloqueo

El gel se transfirió a una membrana de polifluoruro de vinilo (PVDF) de 0.45 μm (*Millipore*®, Merk) previamente activada sumergiéndola 5 segundos con metanol. Todos los elementos necesarios para el montaje de la transferencia se sumergieron también previamente en el tampón de transferencia (Tris-HCl 48 mM, glicina 39 mM, SDS 0.04% (p/v) y metanol 20% (v/v)). La transferencia se montó en el siguiente orden en el casete del *sandwich* sobre el polo negativo del mismo:

esponja → papel Whatman → gel → membrana → papel Whatman → esponja

El casete se introdujo en el soporte de transferencia y en la cubeta que contiene tampón de transferencia frío. Para la transferencia se aplicó una corriente eléctrica de 230 mA durante 1h 30 minutos a 4°C. Para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo, la membrana se bloqueó durante 1 hora en agitación a T_{amb} con la solución de bloqueo (leche en polvo al 5% (p/v) en TBS-Tween (TBS-T) (NaCl 150 mM, Tween-20 0.1% (v/v), Tris-HCl 20 mM (pH= 7.6)).

Inmunodetección y revelado

Tras el bloqueo, la membrana se incubó con el anticuerpo primario específico contra la proteína que se quiere detectar. El anticuerpo (**Tabla 15**) se diluyó en la solución de bloqueo y se incubó la membrana en agitación a 4°C y O/N. Al día siguiente, tras 3 lavados de 5 minutos con TBS-T en agitación a T_{amb} , la membrana se incubó con el anticuerpo secundario (**Tabla 15**) contra las IgGs de las especies en las que se han generado los anticuerpos primarios a una dilución 1:1000 en la solución de bloqueo y se incubó durante 1 hora a T_{amb} . Transcurrido este tiempo, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con TBS-T en agitación a T_{amb} . Finalmente, se realizó el revelado de la membrana cubriéndola con el volumen necesario de la mezcla 1:1 de los reactivos del kit de sustrato para inmunotransferencia (WB) de ECL Pierce™ (Thermo Fisher Scientific). Las imágenes se adquirieron con el detector de quimioluminiscencia *Fusion FX* (Vilber). La cuantificación de las bandas tuvo lugar mediante el análisis de densitometría realizado con el programa *Image J* (v8.0).

4.2.7. Citometría de flujo

4.2.7.1. Apoptosis

El impacto de los ensayos *in vitro* en la apoptosis fue evaluado a las 24 horas de haberse iniciado el ensayo. Para ello, aproximadamente $2 \cdot 10^5$ células de cada condición se tiñeron durante 15 minutos en oscuridad, con 1 μ L del marcador de apoptosis anexina V (*Pacific Blue*, excitación/emisión: 410/455 nm) y 2 μ L del intercalante del ADN TO-PRO-3 (Alexa Fluor™ 647, excitación/emisión: 642/661nm) en 100 μ L de tampón de unión a anexina V. Tras realizar un lavado, se resuspendieron las células con 100 μ L de PBS. Un total de 10.000 eventos de células fueron adquiridas en el *BD FACSCanto II Cell Analyzer* (Becton, Dickinson) y visualizadas para su adquisición en el programa *BD FACSDiva™* (BD Biosciences).

Todos los experimentos fueron realizados en triplicados biológicos si no se especifica lo contrario. Posteriormente los resultados fueron procesados en el programa *FlowJo 10* (v.10.8.1), siguiendo las posteriores selecciones de poblaciones (X vs Y):

1. FSC-A vs SSC-A: eliminación de células pegadas a los ejes.
2. FSC-A vs FSC-H: eliminación de dobletes y tripletes.
3. Anexina V vs TO-PRO-3: siendo las células viables (anexina V_{neg}/TO-PRO-3_{neg}), apoptóticas tempranas (anexina V_{pos}/TO-PRO-3_{neg}), apoptóticas tardías (anexina V_{pos}/TO-PRO-3_{pos}) y necróticas (anexina V_{neg}/TO-PRO-3_{pos}).

El porcentaje de células viables se normaliza respecto al grupo control (100%) y el porcentaje o proporción relativas de células apoptóticas (apoptóticas tempranas + apoptóticas tardías) se calcula respecto al grupo control de cada ensayo.

4.2.7.2. Ciclo celular

Los ensayos de ciclo celular se llevaron a cabo a las 24 y 72h de haber iniciado el ensayo dependiendo del experimento. Para el ciclo celular se usó el intercalante del ADN TO-PRO-3 (Alexa Fluor™ 647, excitación/emisión: 642/661nm) permeabilizando

Materiales y métodos

la membrana, permitiendo la accesibilidad al ADN de las células vivas. Para ello, aproximadamente $3\cdot 5\cdot 10^5$ células de cada condición se fijaron con 1 mL de etanol al 70% durante 1h a -20°C . Tras realizar un lavado, las células se permeabilizaron durante 30 minutos a T_{amb} y en oscuridad con 100 μL de la solución de permeabilización (88 μL de PBS-5%FBS, 0.5% de triton x-100, 10 μL de ARNasa [100 $\mu\text{g}/\text{mL}$], 2 μL de TO-PRO-3). Tras realizar otro lavado, se resuspendieron las células con 100 μL de PBS. Finalmente, un total de 10.000 eventos de células únicas fueron adquiridos en el *BD FACSCanto II Cell Analyzer* (Becton, Dickinson) y visualizados para su adquisición en el programa *BD FACSDiva™* (*BD Biosciences*).

Todos los experimentos se realizaron en triplicados biológicos si no se especifica lo contrario. Posteriormente los resultados se procesaron en el programa *FlowJo 10* (v.10.8.1), siguiendo las posteriores selecciones de poblaciones (X vs Y):

1. FSC-A vs SSC-A: eliminando las células pegadas a los ejes.
2. APC-A vs APC-H: trazando un rectángulo podemos seleccionar las células únicas, eliminando los dobletes y tripletes.
3. TO-PRO-3 vs recuento (histograma): el primer pico con menor fluorescencia corresponde a las células en la fase G1 (dotación cromosómica diploide), mientras que el pico de mayor fluorescencia corresponde a la fase G2-M (dotación cromosómica tetraploide) y las células comprendidas entre ambos picos corresponden a las células en fase S.

4.2.7.3. Expresión de c-Myc

c-Myc está sobreexpresada en la línea celular a consecuencia de la t-MYC por lo que se pensó que probablemente, no se observarían diferencias en los niveles de c-Myc en las células *knockdown* para *E2F3*. Para evaluarlo, se escogió la técnica de citometría de flujo permitir una cuantificación más precisa y objetiva que la técnica de Western blot.

Para dicho experimento, aproximadamente $3\cdot 5\cdot 10^5$ células fueron permeabilizadas con 1 mL de etanol 70% durante 1 hora a -20°C . Tras realizar un

lavado, se tiñeron las células con el anticuerpo 1° contra c-Myc (**Tabla 15**) en 100 μL de la solución de permeabilización (90 μL de PBS-5%FBS, 0.5% de triton x-100, 10 μL de ARNasa [100 $\mu\text{g}/\text{mL}$]) durante 1 hora a T_{amb} y en oscuridad. Tras realizar un lavado, se tiñeron las células en 100 μL de la solución de permeabilización con el anticuerpo 2° *Goat anti-Rabbit IgG (H+L), Alexa Fluor™ 488* (**Tabla 15**), durante 30 minutos a T_{amb} y en oscuridad. Tras realizar 2 lavados, se resuspendieron las células con 100 μL de PBS. Finalmente, un total de 10.000 eventos de células únicas fueron adquiridos en el *BD FACSCanto II Cell Analyzer* (Becton, Dickinson) y visualizados para su adquisición en el programa *BD FACSDiva™* (*BD Biosciences*).

4.2.7.4. Estudio de diferenciación celular

Se estudió la asociación de E2F3 y MYC en la diferenciación de las células de LPB evaluando la expresión de marcadores de célula plasmática y célula B en las células PBL-1 WT, *E2F3^{KO}* y *MYC^{KO}*. Aproximadamente, $2 \cdot 10^5$ células fueron teñidas en 50 μL con los siguientes marcadores de célula plasmática: CD38 (*Pacific blue* 450), CD138 (APC) y CD56 (APC 750) y con los marcadores de célula B: CD19 (ECD), CD20 (PerCP-Cy7), CD79B (PerCP-Cy 5.5). Un total de 10.000 eventos de células únicas fueron adquiridas en el citómetro *LSRFortessa SORP* (BD Biosciences) y visualizados para su adquisición en el programa *BD FACSDiva™* (BD Biosciences). Posteriormente los resultados se procesaron en el programa *FlowJo 10* (v.10.8.1), mediante el que se cuantificó el número de células positivas para cada marcador.

4.2.8. Ensayos de proliferación celular

Para los experimentos de alteración de la expresión de miARNs, de inhibición de E2F y la survivina y de silenciamiento de *E2F3* se evaluó el impacto en la proliferación mediante el ensayo colorimétrico de MTT. Este ensayo se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio, una sal de tetrazolio amarilla que al ser catalizada por la enzima mitocondrial succinato-

Materiales y métodos

deshidrogenasa, da lugar al formazán, un compuesto púrpura e insoluble en agua que permite valorar el número de células metabólicamente activas.

Ensayos de sobreexpresión o infraexpresión de los miARNs

Tras la nucleofección de los *miRVana* y siembra en las placas de 6 pocillos, se cogieron 100 μL de cada condición y se sembraron por triplicado en placas de 96 pocillos y se incubaron durante 24, 48 y 72 horas.

Inhibidores de E2F y survivina

Se sembraron $2 \cdot 10^5$ células/mL células 24h antes de la adición de los inhibidores en placas de 96 pocillos. Al día siguiente, las células fueron tratadas con HLM006474 a las concentraciones de 3.5, 7 y 14 μM y con S12 a las concentraciones de 12.5, 25 y 50 μM de manera individual o en combinación y se incubaron durante 72 horas. Como grupo control las células fueron tratadas con DMSO con el mismo volumen máximo administrado de cada fármaco o de la suma de ambos.

E2F3 knockdown

Se sembraron las células PBL-1 WT y *E2F3^{mut}* por triplicado en placas de 96 pocillos a una concentración de $2 \cdot 10^5$ células/mL y se incubaron durante 72 horas.

En los tres ensayos, se realizaron triplicados técnicos y triplicados biológicos y se incluyeron como blanco 100 μL de medio sin células. Transcurrido el tiempo de incubación de cada experimento, se añadió el MTT a una concentración de 0.25 mg/ml y se incubó durante 3 horas a 37°C y 5% de CO_2 . Tras centrifugar la placa y eliminar cuidadosamente el sobrenadante, se resuspendieron los cristales de formazán en 100 μL de HCl (1%)-isopropanol (1:24) y se incubó durante 30 minutos a T_{amb} . Finalmente, se midió la absorbancia a 570 nm en el espectrofotómetro *Multiskan™ Sky* (Thermo Scientific) usando el *software SkanIt*.

Para el cálculo de las variaciones producidas en la proliferación, se restó la absorbancia del blanco respecto a todos los pocillos y se calculó el promedio del

grupo control (CN miARN, DMSO o *E2F3^{WT}*) considerado el 100% de proliferación, sobre el cual se calculó el porcentaje de proliferación relativa de los grupos de estudio.

4.2.9. Ensayos de migración e invasión

Los ensayos de migración e invasión se realizaron para estudiar la implicación de *E2F3* en la promoción de la linfomagénesis comparando las células PBL-1 WT y *E2F3^{mut}*. Se usaron pocillos *transwell* con insertos que contienen una membrana de poliéster permeable. La parte inferior del pocillo fue tratada con 300 μ L de *poli-L-lisina* durante 2 horas a T_{amb} para facilitar la adhesión de las células. Para los estudios de invasión únicamente, se añadieron 100 μ L de matrigel (Corning) 1:20 con medio incompleto, en la parte superior del *transwell* y se incubaron a 37°C y 5% CO₂ durante 30 minutos para asegurar la formación de la capa sólida de matrigel. A continuación, se sembraron las células 0.2·10⁶ PBL-1 WT y *E2F3^{mut}* en la parte superior del *transwell* en 300 o 200 μ L medio incompleto para los ensayos de migración o invasión, respectivamente (**Tabla 5**). En la parte inferior del *transwell* se añadieron 500 μ L de medio completo (**Tabla 5**), favoreciendo que las células se desplacen hacia la parte inferior. Las células se incubaron durante 24 horas a 37°C y 5% CO₂. Posteriormente, las células que se desplazaron hacia la parte con medio completo, se fijaron con 500 μ L de metanol durante 20 minutos a T_{amb} y se tiñeron con 500 μ L de *Giemsa* durante 15 minutos. El recuento de las células que migraron o invadieron la parte inferior del *transwell* se contaron mediante *Image J* (v8.0) a partir de fotos realizadas en el microscopio *DM IL LED* (Leica).

4.2.10. Unión miR-150-5p/*BIRC5*

4.2.10.1. Diseño de plásmidos

A fin de demostrar que el miR-150-5p regula la expresión de *BIRC5* a través de la unión a su región 3'UTR, se llevó a cabo el ensayo de luciferasa en la línea celular HEK-293T. Se usaron 2 plásmidos que fueron diseñados y adquiridos de

Materiales y métodos

VectorBuilder, uno de ellos incluye el gen que codifica la renilla (*hRluc*) y el otro contiene el gen que codifica la luciferasa (*luc*) seguido de la región 3'UTR de *BIRC5* (**Figura 16**). Este plásmido además incluye mCherry para facilitar la visualización de las células que han incorporado el plásmido y el gen de resistencia a ampicilina para la selección de las colonias bacterianas.

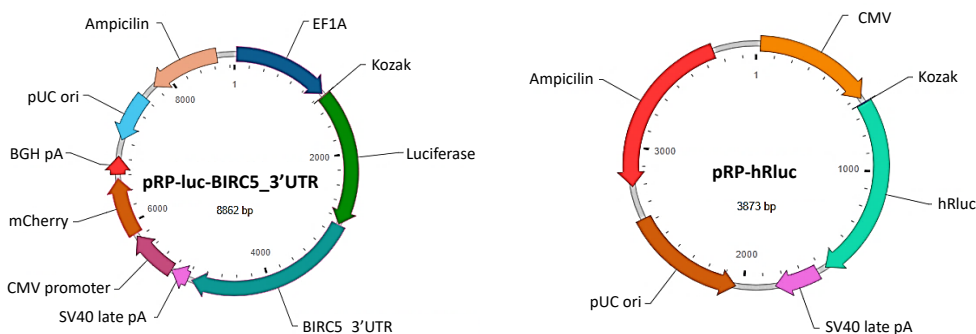


Figura 16. Plásmidos para el ensayo de luciferasa. Información de los componentes de los plásmidos diseñados para el ensayo de la luciferasa: pRP-luciferasa-BIRC5_3'UTR (izquierda), pRP-hRluc (derecha).

4.2.10.2. Extracción de ADN plasmídico Maxiprep

Se recibieron 2 *stock* de glicerol de bacterias conteniendo cada plásmido. Para la purificación de los plásmidos, se cultivó 1 μ L de cada *stock* bacteriano en placas de LB que contenían 100 μ g/mL de ampicilina. Tras la formación de colonias bacterianas, se seleccionó una colonia que se incubó en 3 mL de medio LB con 100 μ g/mL de ampicilina (LB + ampicilina) en agitación durante 6 horas a 37°C. A continuación, los 3 mL con las bacterias fueron incubados en agitación a 180 rpm, O/N a 37°C en un cultivo más grande de 200 mL de medio LB + ampicilina. Finalmente, a partir de este cultivo bacteriano se realizó la purificación del ADN plasmídico a través del protocolo de *Maxiprep* usando el *NucleoBond Xtra Maxi kit* (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los ADN plasmídicos purificados fueron cuantificados mediante el *NanoDrop™ One/OneC* (Thermo Fisher Scientific) y conservado a -20°C.

4.2.10.3. Ensayo de luciferasa

Para dicho ensayo, $2 \cdot 10^6$ células HEK-293T fueron nucleofectadas con 5 μg de pRP-Luc-BIRC5_3'UTR, 1 μg de pRP-hRluc y miR-150-5p mimic o CN miARN a una concentración final de 50 μM . Las células fueron nucleofectadas usando *Ingenio*® *Electroporation Kit* (Mirus) y el programa Q-001 del *Nucleofector IIb* (Amaxa). Un total de $2 \cdot 10^5$ células HEK-293T nucleofectadas en 100 μL se sembraron en placas de 96 pocillos opacas y tras 24h se realizó el ensayo de la luciferasa usando el *Dual-Glo*® *Luciferase Assay System* (Promega). Brevemente, se añadieron 100 μL del reactivo Dual-Glo® Reagent y tras una incubación de 10 minutos se midió la luminiscencia de la luciferasa a 25°C en el espectrofotómetro *Synergy H1 microplate reader* (Biotek). A continuación, se añadieron 100 μL de *Dual-Glo*® *Stop & Glo*® y tras 10 minutos se midió la luminiscencia de la renilla a 25°C. La luminiscencia de la luciferasa fue normalizada respecto a la luminiscencia de la renilla y se calculó la ratio de la expresión de la luciferasa de las células nucleofectadas con miR-150-5p *mimic* respecto a las nucleofectadas con el CN miARN.

4.3. Metodología de estudios *in vivo*

4.3.1. Ensayo de membrana corioalantoidea de pollo

Por un lado, la evaluación de la formación tumoral de las células PBL-1 WT y *E2F3^{mut}* y, por otro lado, la validación del efecto de los inhibidores contra E2F y contra survivina se realizó usando el modelo *in vivo* de la membrana corioalantoidea (MCA) de embrión de pollo. Huevos blancos fertilizados de pollo obtenidos de la granja Santa Isabel, S.L. (España) fueron incubados a 37.5°C y 55% de humedad durante 9 días (**Figura 17**). A día 9 del desarrollo embrionario, se realizó un agujero de aproximadamente 2 centímetros en la parte superior del huevo (en posición horizontal), justo encima de la cámara de aire. En la posición de la MCA debajo del agujero, se depositaron $3 \cdot 10^6$ células PBL-1 WT o *E2F3^{mut}* en un volumen de 50 μ L (1:1, medio completo: matrigel). Los huevos fueron incubados a 37.5°C y 55% de humedad para facilitar el desarrollo del tumor. El día 12 se observó la formación de una masa tumoral en la localización donde se habían depositado las células. El día 12 y 14 del desarrollo, es decir, 3 y 5 días después de la inoculación de las células, se añadieron 50 μ L de medio completo sobre el tumor a los grupos no tratados para ambos modelos MCA. Para los grupos tratados se administraron 50 μ L de los inhibidores a una concentración de 7 μ M de HLM006474, 25 μ M de S12 de manera individual o en combinación (n=7-14 huevos/grupo). A día 16, los embriones fueron sacrificados y pesados. Los huevos fueron pesados los días 9, 12, 14 y 16 del desarrollo embrionario. Los tumores fueron extraídos, pesados y se midieron sus tamaños. Los tumores se repartieron por grupos para la detección de células CD138 (*apartado 14.1*) y para los estudios histológicos (*apartado 14.2*). Además, se extrajeron diversos órganos del embrión para realizar estudios de migración (*apartado 14.3*).

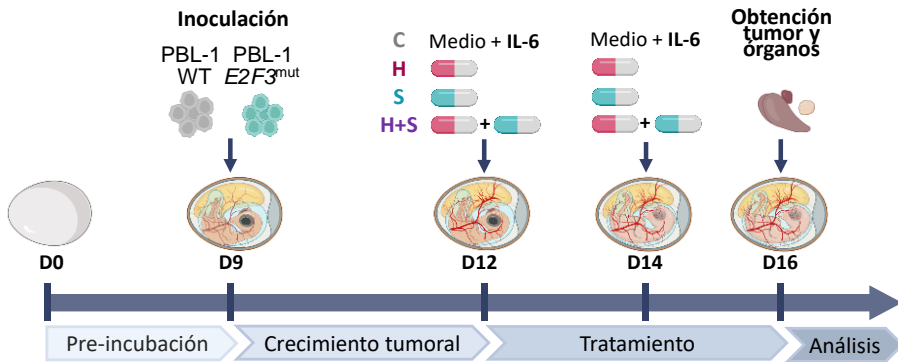


Figura 17. Metodología *in vivo* en el modelo de membrana corioalantoidea de pollo.

4.3.2. Detección de células CD138

La evaluación de las células PBL-1 WT y $E2F3^{mut}$ presentes en la masa tumoral se realizó por citometría de flujo a través del marcaje con el anticuerpo anti-CD138. En primer lugar, el tumor extraído fue diseccionado para facilitar la posterior disgregación que se realizó mediante la incubación durante 45 minutos a 37°C con 500 μ L de mezcla de disgregación (PBS, 5 mg/mL de colagenasa y 2000 U/mL de ADNasa). A continuación, las células disgregadas se filtraron, se centrifugaron y se incubaron con 100 μ L de PBS con 5% de FBS, CD138-FITC y TO-PRO-3 durante 15 minutos a T_{amb} . Las células fueron adquiridas en el citómetro *BD FACSCanto II Cell Analyzer* (Becton, Dickinson) y analizadas usando el programa *Flow Jo 10* (v10.8.1). Se analizó el porcentaje de células PBL-1 WT y $E2F3^{mut}$ viables en los tumores (TO-PRO-3^{neg}/CD138^{pos}) y se comparó el porcentaje de células tumorales en los tumores $E2F3^{mut}$ respecto a los WT, y en los tumores tratados con H, S o H+S respecto a los tumores control, no tratados.

4.3.3. Estudios histológicos

Para los estudios histológicos, los tumores obtenidos del modelo MCA se sumergieron en 4% de paraformaldehído (PFA) durante 2 horas a temperatura ambiente y posteriormente en etanol 70%. Los tumores fueron deshidratados en rondas de etanol gradual antes de ser embebidos en parafina, usando el procesador

Materiales y métodos

de tejido STP120 (Epredia™). Una vez obtenidas las muestras FFEP se realizaron cortes de 4µm usando el Micrótomo HM 340E (Epredia™) y se montaron en portaobjetos de adhesión *SuperFrost Plus* 75×25 mm (VWR).

4.3.3.1. Tinciones hematoxilina-eosina

A partir de cortes de 4 µM de las muestras FFEP se realizaron tinciones de HE para evaluar las células de LPB presentes en los tumores formados en las MCA. Para ello, las muestras fueron incubadas durante 30 minutos a 65°C y posteriormente desparafinadas sumergiéndolas en xilol en diversas rondas e hidratadas en diversas rondas de etanoles graduales decrecientes y finalmente agua destilada. A continuación, fueron teñidas con hematoxilina durante 3 minutos, lavadas sumergidas durante 30 segundos en ácido acético 1%, lavadas y teñidas durante 45 segundos con eosina. Posteriormente, se deshidrataron mediante diversas rondas de etanoles de porcentaje creciente y finalmente mediante xilol. Finalmente se montaron las muestras con el cubreobjetos con la ayuda de medio de montaje, DPX.

4.3.3.2. Inmunohistoquímica

A partir de cortes de 4 µM de las muestras FFEP de los tumores MCA se realizaron IHC de MUM-1 y Ki67 (**Tabla 15**) tal y como se describe en el *apartado 3*. Las imágenes de las IHC fueron adquiridas en el microscopio Olympus BX53 (Olympus) y la expresión de las proteínas fue cuantificada usando *Image J* (v8.0).

4.3.4. Estudio de migración de células del tumor de la MCA a órganos

Se estudió si las células tumorales tenían capacidad de migrar e invadir otros órganos. Para ello se extrajo el ADN del corazón, pulmones, hígado, bazo, riñones y medula ósea de los embriones. La migración se estudió a través de la RT-qPCR, analizando la secuencia Alu que es una secuencia de aproximadamente 300 pb repetida a lo largo del genoma humano que no se encuentra en el genoma del pollo.

4.3.4.1. Extracción y conservación de los órganos y tejidos

A día 16 del desarrollo embrionario, los órganos mencionados anteriormente fueron extraídos y conservados en hielo seco y posteriormente almacenados a -80°C hasta el momento de la extracción de ADN. Para la obtención de la médula ósea se extrajeron los 2 fémures de los embriones y con una jeringuilla y una aguja de 0.8 x 50 mm se pasó 1 mL de PBS 2 veces por dentro del primer hueso para sacar la médula ósea y a continuación, se pasó dicho volumen por el segundo hueso del mismo modo. Los huesos se descartaron, el volumen se centrifugó y la médula ósea precipitada se conservó a -80°C hasta el momento de la extracción de ADN.

4.3.4.2. Extracción de ADN de muestras de tejidos

Para la extracción del ADN los órganos se dividieron en pequeños (médula ósea y bazo) y grandes (cerebro, corazón, pulmón, riñón e hígado). Se usó el *Wizard^R Genomic DNA Purification Kit* (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante para la extracción de ADN de tejidos.

En primer lugar, los órganos fueron disgregados en el propio tubo con la ayuda de una punta de pipeta de 100 μL , golpeando el tejido hasta conseguir la eliminación de conglomerados (*este paso no aplica a la médula ósea*). A continuación, se lisaron las células de todos los órganos, y el material genético fue tratado con ARNasa para la obtención del ADN y las proteínas fueron eliminadas mediante precipitación. El ADN de órganos pequeños fue resuspendido en 30 μL de solución de rehidratación de ADN mientras que el ADN de órganos grandes fue resuspendido en 100 μL de la misma solución. Finalmente, el ADN se cuantificó usando *NanoDropTM One/OneC* (Thermo Fisher Scientific) y se conservó a -20°C hasta su uso.

4.3.4.3. Cuantificación secuencia ALU

La cuantificación de la secuencia Alu y del gen de la β -galactosidasa de pollo como control endógeno se realizó mediante RT-qPCR (*apartado 7.2.1.2*) usando los cebadores Alu y β -galactosidasa (*GLB1*) de la **Tabla 14**.

Materiales y métodos

Gen	Descripción	Secuencia (5' → 3')
ACTB	Cebador directo	GACGACATGGAGAAAATCTG
	Cebador inverso	ATGATCTGGGTCATCTTCTC
ALU	Cebador directo	ACGCCTGTAATCCCAGGACTT
	Cebador inverso	TCGCCCAGGCTGGCTGGGTGC
AURKB	Cebador directo	ATTGGAGTGCTTTGCTATG
	Cebador inverso	TTTAGGTCCACCTTGACG
BIRC5	Cebador directo	GGACCACCGCATCTCTACAT
	Cebador inverso	AGTCTGGCTCGTTCTCAGTG
CCNE1	Cebador directo	ACAGATGGAGCTTGTTCAGGA
	Cebador inverso	ACATTCAGCCAGGACACAATAGT
CCNA2	Cebador directo	GGACCTTCACCAGACCTACC
	Cebador inverso	GTGTCTCTGGTGGGTTGAGG
E2F3	Cebador directo	CAAGGGCAAAGGAAGAGCTG
	Cebador inverso	GTGAGCAGACCAAGAGACGT
E2F3 seq	Cebador directo	CGATGGGTATTGGATTTGA
	Cebador inverso	TCCTCGGTTAACAGTTTGAG
EZH2	Cebador directo	CTCAAGAGGTTCAGACGAGCT
	Cebador inverso	GCTGTATCCTTCGCTGTTTCC
GAPDH	Cebador directo	ACAGTTGCCATGTAGACC
	Cebador inverso	TTGAGCACAGGGTACTTTA
GLB1	Cebador directo	TGCATTGCTGAGAGAG
	Cebador inverso	TCCTCAACTGGCCATC
KIF2C	Cebador directo	TGATTGCCACGATCTCACCA
	Cebador inverso	ATCAACTGCTCTCCACTGGG
MYC	Cebador directo	TGAGGAGGAACAAGAAGAT
	Cebador inverso	ATCCAGACTCTGACCTTTTG
MYC seq	Cebador directo	AGCGAGGATATCTGGAAGA
	Cebador inverso	AAACTCTGGTTCACCATGTC
RRM2	Cebador directo	AGACTTATGCTGGAAGTGGGT
	Cebador inverso	ACTCGCCTACTCTTTCTCAAAG
TWF1/PTK9	Cebador directo	CAAGGATTCAGCTCGTTACCATT
	Cebador inverso	TCCGCTCTCTTATACTGCATGT

Tabla 14. Lista de cebadores. Se especifican los cebadores empleados para las reacciones de RT-qPCR y secuenciación de *E2F3* y *MYC*.

Proteína	Referencia	Proveedor	Dilución	Técnica
ALK1 (ALK01)	790-2918	Roche	Prediluido	IHC
Anexina V	640918	Palex Medical	1:100	FACS
Aurora B	ab70238	Abcam	1:1000	WB
p-Aurora B(fosfoS227)	ab210706	Abcam	1:1000	WB
Blimp1 (E-R16655)	ab198287	Abcam	1:100	IHC*
CD3 (2GV6)	790-4341	Roche	Prediluido	IHC*
CD19-ECD	1707770	Beckman	1:10	FACS
CD20 (L26)	760-2531	Roche	Prediluido	IHC*
CD20-PC7	IM3629	Beckman	1:10	FACS
CD30 (Ber-H2)	790-4858	Roche	1:25	IHC*
CD38 (SP149)	760-4785	Roche	Prediluido	IHC*
CD38-PB	B92396	Beckman	1:10	FACS
CD56 (MRQ-42)	156R-96	Cell marke	1:400	IHC
CD56-APC750	B46024	Beckman	1:10	FACS
CD79B-PC5	B21445	Beckman	1:20	FACS
CD138 (B-A38)	138M-16	Cell marke	1:300	IHC*
CD138-FITC	11-1389-42	eBioscence	1:50	FACS
CD138-APC	B49219	Beckman	1:50	FACS
Ciclina A2 (BF683)	4656T	Cell Signaling	1:500	WB
Ciclina E1 (HE12)	sc-247	Santa Cruz	1:1000	WB
c-Myc (D8AC12)	5605S	Cell Signaling	1:1000	WB
			1:100	IHC
			1:500	FACS
E2F3	ab152126	Abcam	1:500	WB
	PA5-114490	Invitrogen	1:50	IHC
EZH2 (D2C9)	5246S	Cell Signaling	1:1000	WB
GAPDH (0411)	sc-47724	Santa Cruz	1:1000	WB
HVV-8 (13B10)	760-4260	Roche	Prediluido	IHC*
Ki67 (SP6)	AB16667	Abcam	1:100	IHC
Ki67 (30-9)	790-4286	Roche	Prediluido	IHC*
KIF2C (2488C3a)	sc-81305	Santa Cruz	1:500	WB
MUM-1 (MRQ-43)	760-4529	Roche	Prediluted	IHC
Survivina	NB500-201	Nobus	1:500	WB
			1:100	IHC
PD-L1 (ZR3)	Z2002RL	ZETA Corp	1:300	IHC*
RRM2 (2A9A7)	67006-1-Ig	Proteintech	1:750	WB
TO-PRO-3 Alexa Fluor™ 647	15721399	Invitrogen	1:50	FACS
Tubulina (1D4AD)	66240-1-Ig	Proteintech	1:10.000	WB
Anti-mouse IgG	7076S	Cell Signaling	1:1000	WB
Anti-rabbit IgG	7074S	Cell Signaling	1:1000	WB
peroxidase-AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L)	711-035-152	Jackson Imm.Research	1:100	IHC
Goat anti-Rabbit IgG (H+L), Alexa Fluor™ 488	A-11034	Invitrogen	1:800	FACS

Tabla 15. Lista de anticuerpos. Se especifican los anticuerpos usados para citometría de flujo (FACS, azul), para Western blot (WB; amarillo) y para IHC en verde. * anticuerpos usados por los anatomopatólogos para el diagnóstico de los pacientes.

4.4. Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos de los resultados obtenidos se efectuaron con el programa *GraphPad Prim (v9)*. Los tests aplicados aparecen detallados en los pies de figura respectivos de cada resultado. Para la estadística relacionada con las muestras de los pacientes y controles, así como para los ensayos *in vitro* o *in vivo* con más de 3 muestras por grupo, se usaron test no paramétricos. Para comparaciones entre 2 grupos se usó el t-test. Para comparaciones múltiples (más de 2) se usó el test Kruskal-Wallis y en el caso de que este fuese significativo se aplicó el test de comparaciones múltiples de Dunn. Para los análisis de correlación se usó el test de Spearman y para las evaluar las diferencias entre grupos según los parámetros clínicos se usó el test exacto de Fisher.

Para los estudios *in vitro* o *in vivo* donde el número de muestras era pequeño ($n=3$) se usaron test paramétricos. Para comparaciones entre 2 grupos se usó el t-test. Para comparaciones múltiples se usó el test ANOVA y en el caso de que este fuese significativo se aplicó el test de Tukey.

5. RESULTADOS

5.1. Datos clínicos pacientes

Con la finalidad de estudiar posibles asociaciones entre la clínica y los resultados de los estudios transcriptómicos, se recogieron diversos parámetros clínicos y biológicos, incluidos en la **Tabla 16**. Además, debido a la asociación de la infección por el VIH, la infección de las células tumorales por el VEB y la *t-MYC* con el LPB, a lo largo del trabajo se agruparán los pacientes en base a estos 3 parámetros.

	Pacientes totales n=66	VIH-neg n=26(63%)	VIH-pos n=15(36%)	VEB-neg n= 23(42%)	VEB-pos n= 32(58%)	<i>t-MYC</i> -neg n= 23(52%)	<i>t-MYC</i> -pos n=21(48%)
Hombre (%)	72	69	82	53	80	67	74
Mediana de edad (rango)	62 (17-89)	70 (36-89)	43 (32-66)	64 (18-81)	56 (17-86)	71 (34-86)	52 (20-81)
Edad ≥60 (%)	52	77	8	58	43	70	35
Ann Arbor ≥ III (%)	64	52	83	50	53	50	62
ECOG ≥2 (%)	34	26	42	50	22	9	42
Localizaciones EG ≥2, (%)	30	26	43	25	29	40	33
LDH elevada (%)	45	37	58	29	50	21	46
IPI							
Bajo (0-1), (%)	34	45	17	57	37	45	38
Intermedio (2-3), (%)	44	35	58	14	53	55	38
Alto (4-5), (%)	22	20	25	29	10	0	24
Síntomas B (%)	39	29	58	13	42	17	46

Tabla 16. Características clínicas de los pacientes con LPB. En la tabla se agrupan los 66 pacientes con LPB según la infección por el VIH, VEB y la translocación de *MYC* (*t-MYC*), así como los porcentajes de los parámetros clínicos recogidos. ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*; EG: extraganglionar; IPI: Índice Pronóstico Internacional; LDH: lactato deshidrogenasa.

No se pudo recoger la información clínica de todos los pacientes. De aquellos con disponibilidad de datos clínicos, fueron más frecuentes los VIH-negativos (63%) y los VEB-positivos (58%; **Tabla 16**). Además, no hubo pacientes VEB-negativos entre los casos VIH-positivos, lo que indica una estrecha relación entre ambas infecciones (**Tabla 17**). Los casos VIH-positivos se asociaron a una frecuencia aumentada de la presencia de *t-MYC*. En cambio, considerando toda la cohorte, aproximadamente la mitad de los pacientes presentaron dicha alteración. Asimismo, se analizó la relación entre las infecciones por el VIH, por el VEB, y la *t-MYC* con los parámetros clínicos, cuyo análisis reveló que los pacientes infectados por el VIH y con presencia del VEB

Resultados

en las células del linfoma tenían un pronóstico de la enfermedad desfavorable (IPI intermedio/alto; **Tabla 17**). Los casos VIH-positivos se asociaron a estadios avanzados de la enfermedad, LDH más elevada, aparición de síntomas B y mayor afectación extraganglionar en comparación a los VIH-negativos. Además, alrededor del 60% de los casos presentaron la t-MYC. Curiosamente, los VEB-positivos presentaron un estado general (ECOG) más óptimo que los casos VEB-negativos. En cambio, los casos t-MYC-positivos presentaron un ECOG más elevado, aunque menor afectación extraganglionar en comparación que los casos sin dicha translocación. Tanto los linfomas con presencia del VEB y con la t-MYC se asociaron a mayor sintomatología B que los respectivos casos negativos, probablemente debido a que estos casos son más frecuentes entre los pacientes infectados por el VIH (**Tabla 17**).

		VIH-neg (%)	VIH-pos (%)	p	VEB-neg (%)	VEB-pos (%)	p	t-MYC-neg (%)	t-MYC-pos (%)	p
VIH	-				100	45	****	86	41	****
	+				0	55		14	59	
VEB	-	52	0	****				39	43	ns
	+	48	100					61	57	
tMYC	-	63	17	****	50	54	ns			
	+	37	83		50	46				
Género	mujer	31	18	*	37	20	*	33	26	ns
	hombre	69	82		63	80		67	74	
Edad	<60	23	92	****	42	57	*	30	65	****
	≥60	77	8		58	43		70	35	
IPI	bajo	45	17	****	57	37	**	45	38	ns
	int/alto	55	83		43	63		55	62	
Estadio Ann Arbor	< III	48	17	****	50	37	ns	50	38	ns
	≥ III	52	83		50	63				
ECOG	<2	74	58	*	50	78	****	91	58	****
	≥2	26	42		50	22		9	42	
LDH	normal	63	42	**	71	50	**	60	54	ns
	alta	37	58		29	50		40	46	
Localización EG	<2	74	57	*	75	71	ns	21	67	****
	≥2	26	43		25	29				
Síntomas B	No	71	42	*	88	58	****	83	54	****
	Sí	29	58		13	42		17	46	

Tabla 17. Asociación de las infecciones por el VIH y VEB y la t-MYC con las características clínicas de los pacientes con LPB. Se muestran los porcentajes de pacientes para los parámetros clínicos en base a la presencia de VIH, VEB y t-MYC. Significancia estadística *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001; test exacto de Fisher. ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*; EG: extraganglionar; IPI: índice pronóstico internacional; LDH: lactato deshidrogenasa.

También se recogieron las fechas de diagnóstico y *exitus* a fin de calcular la SG de los pacientes en base a distintos de los parámetros clínicos. No se observaron diferencias en la supervivencia de los pacientes en ninguno de los grupos, aunque se identificó una tendencia a una SG más prolongada en los pacientes VEB-negativos ($p=0.069$). Por otro lado, el IPI discriminó entre los pacientes de riesgo alto y riesgo intermedio, presentando SG más cortas aquellos con IPIs altos (**Figura 18**).

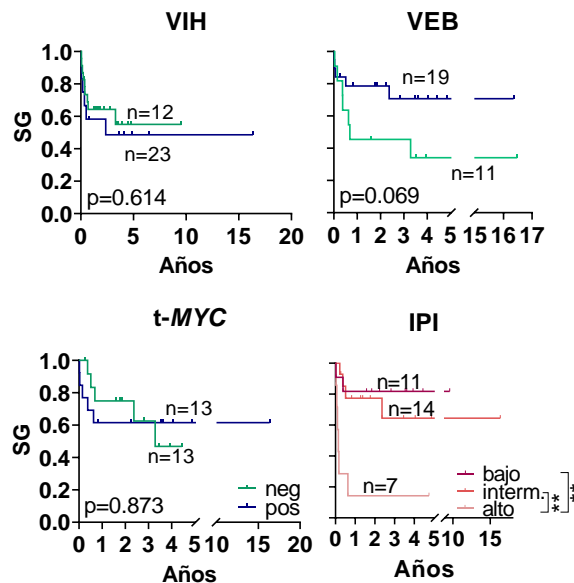


Figura 18. Supervivencias globales (SG). Curvas de Kaplan-Meier según la infección por el VIH, la presencia del VEB en el linfoma, la t-MYC y el IPI. Se muestran los años (X) y la proporción de SG (Y). Significancia estadística $**p < 0.01$; test Log-Rank (Mantel-Cox). IPI: índice pronóstico internacional.

Tras la revisión histológica realizada para la reclasificación diagnóstica de los pacientes, se estudió mediante análisis de IHC, si la t-MYC conllevaba un aumento de la expresión de la proteína codificada. Efectivamente, los pacientes con t-MYC-positiva mostraron mayor expresión de c-Myc que los casos que no presentaron dicha alteración genética (**Figura 19**).

Resultados

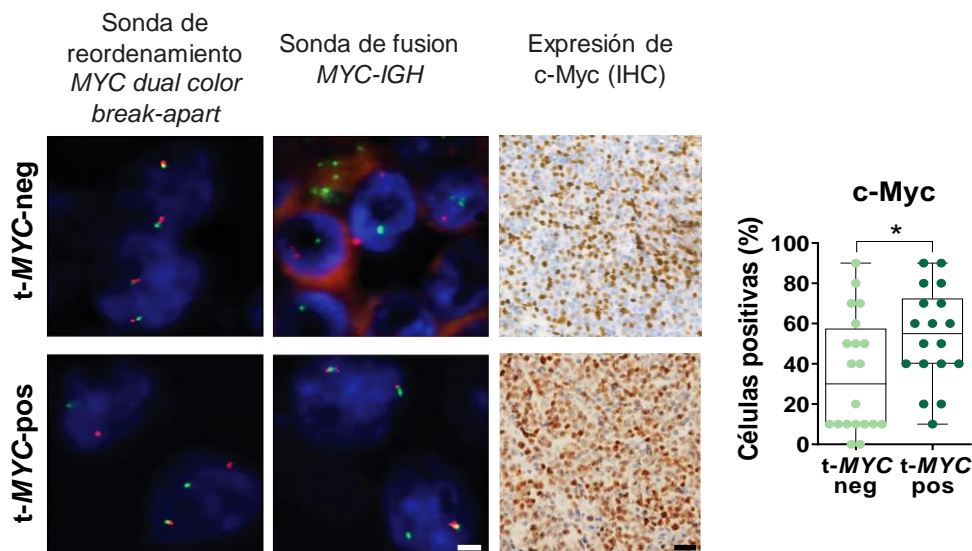


Figura 19. Expresión de c-Myc en pacientes con o sin t-MYC. A la izquierda, imágenes de la t-MYC analizadas por sondas *break-apart* y por sondas de fusión mediante FISH; a la derecha, imágenes de la tinción por IHC de c-Myc. Se muestran imágenes representativas de casos t-MYC-negativa (superior) y t-MYC-positiva (inferior). Escala de la barra: 10 μ m (FISH), 50 μ m (IHC). El diagrama de cajas y bigotes indica el porcentaje de células que expresan c-Myc en los casos t-MYC-negativa (verde claro) y t-MYC-positiva (verde oscuro). Significancia estadística; *p < 0.05; test de Mann-Whitney.

5.2. Estudio de expresión génica

Con el fin de evaluar la expresión génica en el LPB se llevó a cabo la secuenciación del ARN de 40 casos de LPB y 14 controles. El análisis de PCA (*principal component analysis*) reveló que los LPBs se agrupaban claramente separados de los controles, lo que indica que el LPB presenta un perfil transcriptómico diferenciado comparado con el grupo control (varianza= 30%; **Figura 20A**). El grupo de LPB mostró una dispersión no observada en el grupo control, reflejando que este linfoma es heterogéneo en cuanto a su perfil transcripcional (varianza= 9%; **Figura 20A**). El análisis de expresión diferencial reveló 2956 genes diferencialmente expresados (GDEs), incluyendo 1337 sobreexpresados y 1619 infraexpresados en el LPB respecto a los controles ($\log_2FC > |1|$, p-valor ajustado [p-adj.] < 0.05; **Figura 20B**).

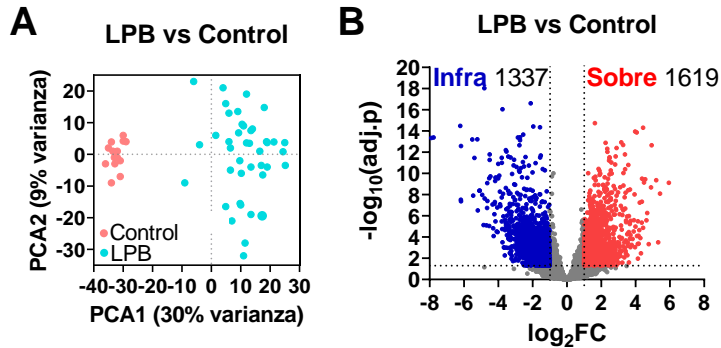


Figura 20. Diferencias en el perfil de expresión entre los LPBs y los controles. **A.** Figura del análisis de componente principal (PCA) que muestra la varianza entre los LPB (azul) y los controles (rosa) en ambos ejes. **B.** Gráfico Volcano mostrando los GDEs ($\log_2FC > |1|$, $p\text{-adj.} < 0.05$). Genes sobreexpresados (1649; rojo), infraexpresados (1337; azul) y no diferencialmente expresados (gris) en los LPB respecto a los controles.

A continuación, se realizó un análisis de enriquecimiento de los GDEs con el objetivo de identificar procesos celulares alterados en el LPB usando las bases de datos de los procesos biológicos de *Gene Ontology* (GO_BP), MSigDB (*hallmark*) y *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG). Se identificó un mayor requerimiento energético en el LPB, con una sobreexpresión de genes implicados en la fosforilación oxidativa (*CYC1*, *NDUFA7*, *COX7B*, *ATP5F1D*, *NDUFS6*, *UQCRC1*, *UQCRH*), comunes entre las 3 bases de datos. Mediante el análisis GO-BP también se detectó un potenciamiento de la respiración celular, la generación de energía mitocondrial a través de la cadena de transporte de electrones y metabolismo del ATP entre otros (**Figuras 21A-C**).

Además, los análisis según las bases de datos de GO-BP y *hallmark* revelaron un enriquecimiento del ciclo celular en la fase de mitosis (*MYBL2*, *PLK1*, *CENPF*, *KIF4A*, *BIRC5*, *NEK2*, *BUB1*, *ESPL1*, *MAD2L1*) así como de dianas de los reguladores del ciclo celular MYC y E2F (*PRDX4*, *NME1*, *POLD2*, *NOLC1*) [**Figuras 21A-B**]. El análisis de GO-BP también mostró una sobreexpresión de genes relacionados con la biogénesis y metabolismo del ADN y el ARN (**Figura 21A**).

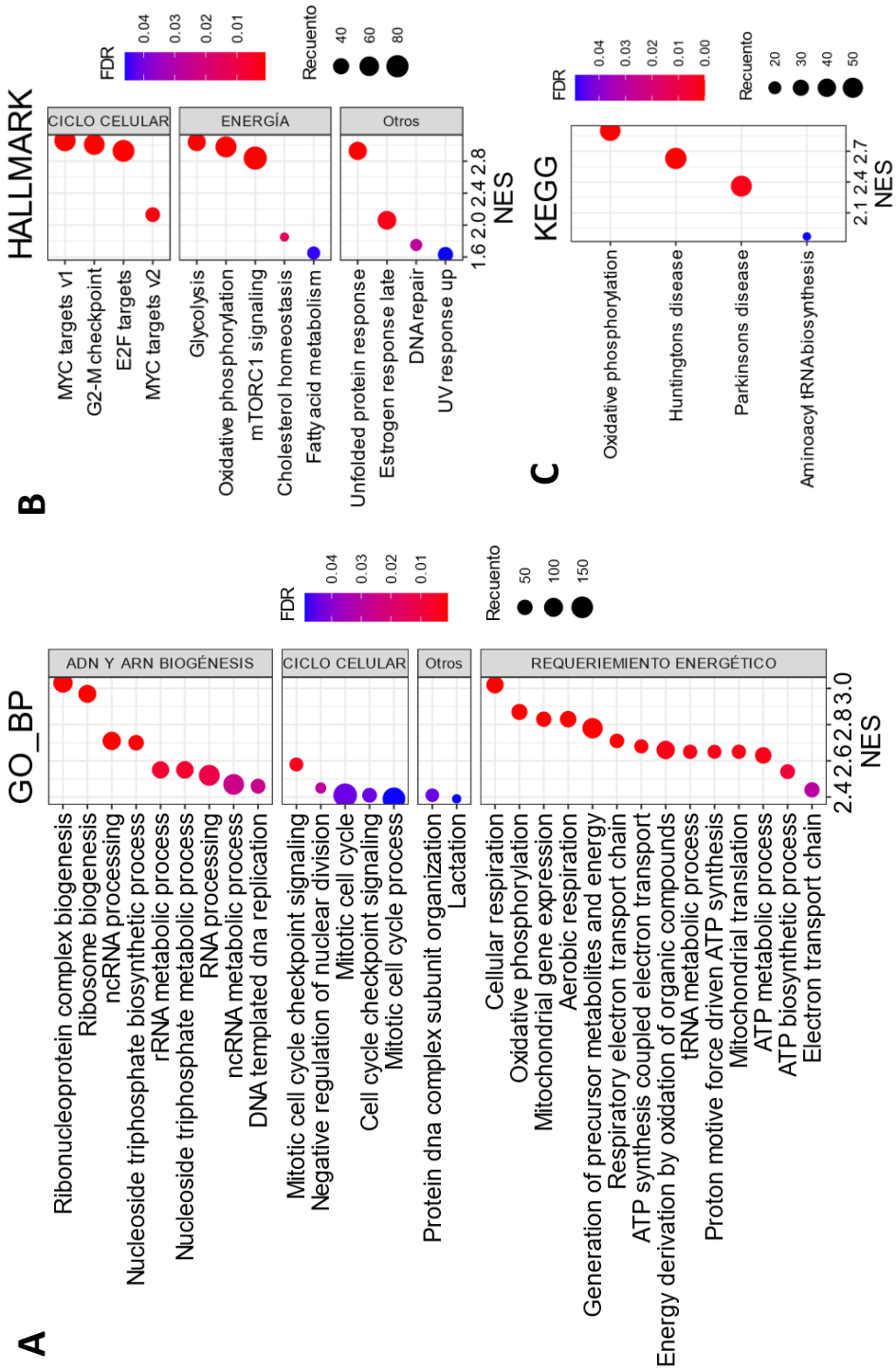
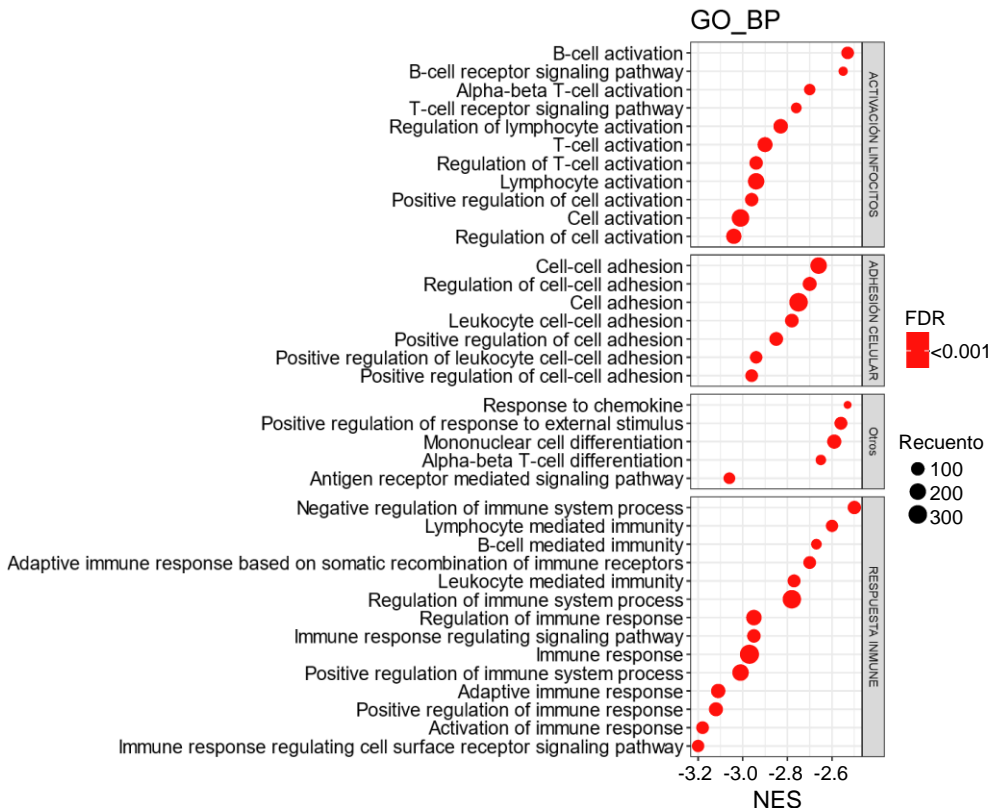


Figura 21. Análisis de enriquecimiento en los LPB respecto a los controles. Pie de figura en la página siguiente.

Figura 21. Análisis de enriquecimiento en los LPBs respecto a los controles. Los gráficos exhiben los conjuntos de datos de los procesos biológicos de las bases de datos GO (GO_BP; **A**), MSigDB (*Hallmark*; **B**) y KEGG (**C**) positivamente enriquecidos en los LPBs respecto a los controles, considerando los GDEs ($\log_2FC > |1|$, $p\text{-adj.} < 0.05$). El color y el tamaño de los puntos ilustran el FDR (*false discovery rate*) y el recuento de genes, respectivamente. NES (*normalized enrichment score*; eje X).

5.2.1. Evasión del sistema inmune en el LPB

Por el contrario, el LPB exhibe una fuerte pérdida de genes implicados en la respuesta inmune (*CCL21*, *C7*, *CNR2*, *MS4A1*, *BACH2*, *CLU*, *CD22*, *CXCL13*, *TLR10*, *BLK*), incluyendo la respuesta inmune mediada por células B (**Figura 22**). Además, el LPB mostró una deficiencia de activación linfocitaria, incluyendo la activación de células T, así como una deficiencia de genes implicados en la adhesión celular, especialmente la adhesión leucocitaria (*CCL21*, *TNFRSF13C*, *CCR7*, *IL7R*, *SLAMF1*, *CD83*, *FOXP3*, *ICOS*).



Resultados

Figura 22. Vías enriquecidas en los controles respecto a los LPBs. El gráfico exhibe los conjuntos de datos de los procesos biológicos de la base de datos GO (GO_BP) negativamente enriquecidos en los LPB respecto a los controles, considerando los GDEs ($\log_2FC > |1|$, $p\text{-adj.} < 0.05$). El color y el tamaño de los puntos ilustran el FDR (*false discovery rate*) < 0.001 y el recuento de genes, respectivamente. En el eje X se muestra el NES (*normalized enrichment score*) > 2.5 .

Estos resultados indican que el LPB alberga una deficiencia en el punto de control inmunológico, favoreciendo la evasión del sistema inmunitario. Puesto que la infección por el VIH en la mayoría de los casos se asocia a un contexto de inmunodeficiencia, y debido a que el VEB favorece un microambiente más permisivo en linfomas asociados al VIH(282), se analizó si estos virus son los causantes de la deficiencia de respuesta inmune en el LPB. Para ello, se compararon las vías GO-BP enriquecidas en los controles respecto a los LPB totales, a los linfomas con presencia del VEB o a los linfomas con ausencia de éste. Por otro lado, se realizaron las mismas comparaciones considerando la infección por el VIH. Todos los LPBs, independientemente de la presencia o ausencia de ambas infecciones virales exhibieron una infraexpresión de genes involucrados en múltiples vías relacionadas con la respuesta inmune (**Figuras 23A-B**). Asimismo, los casos VEB y VIH-negativos mostraron infraexpresión de genes implicados en múltiples vías que no fueron compartidas con los respectivos casos positivos o con el total de los pacientes. Especialmente, estos genes se vinculan con la proliferación, migración y diferenciación leucocitaria. En conjunto, estos datos demuestran que el propio tumor alberga un perfil transcriptómico que reprime la respuesta inmunitaria, impidiendo la activación de células del sistema inmune que puedan reconocer y destruir el tumor. A pesar de ello, los mecanismos de evasión del sistema inmune observados en los casos VIH-positivos y VEB-positivos apuntan a que estos virus pueden facilitar el desarrollo del LPB facilitando un microambiente permisivo.

Enriquecimiento en C (GO_BP)

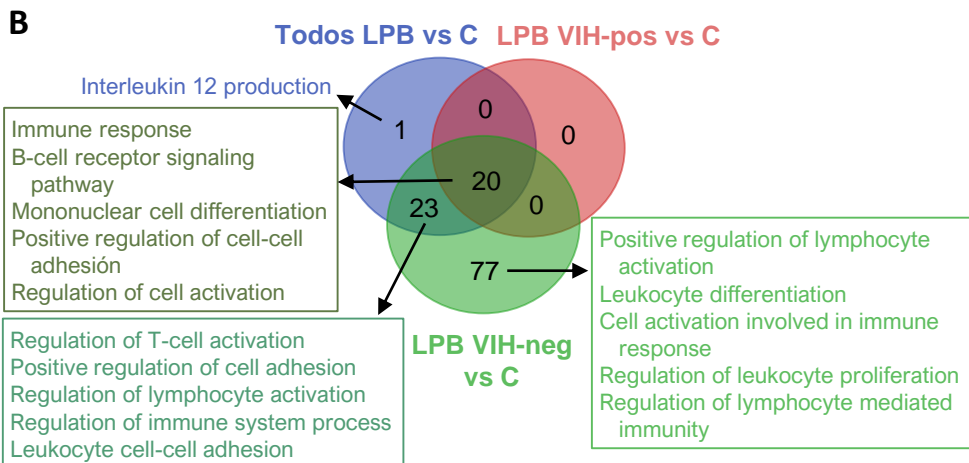
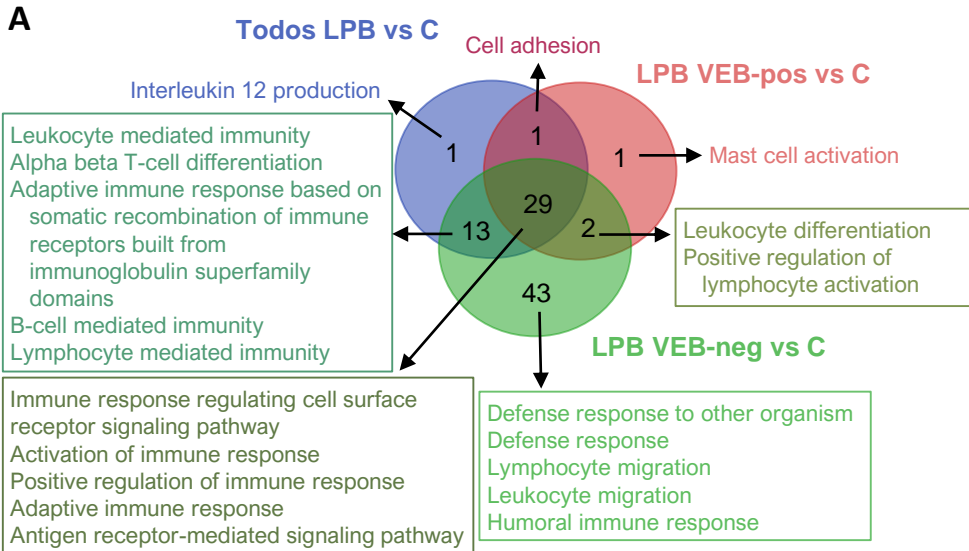


Figura 23. GO-BP enriquecidos en los controles. GSEA en base a la infección del VEB (A) y VIH (B). Las imágenes muestran el diagrama de Venn de los procesos biológicos del GO (GO_BP) superpuestos entre 3 comparaciones: todos los LPBs vs controles (azul), LPBs VIH-positivo y VEB-positivo vs controles (rosa) y LPBs VIH-negativo y VEB-negativo vs controles (verde). En los recuadros se indican las vías más significativamente enriquecidas.

5.2.2. Progresión del ciclo celular en el LPB mediada por E2F

Tras la sobreexpresión detectada de dianas de E2F y el enriquecimiento de los reguladores del punto de control de la transición G2/M, se evaluó la expresión de E2F. Se observó una sobreexpresión de todos los miembros de la familia E2F en los LPBs respecto a los controles, a excepción de E2F5 (Figura 24A). Para confirmar que la desregulación de estos FT desempeña cambios transcripcionales en el LPB, se realizó un análisis de GSEA usando la base de datos de dianas de FTs (TFT, *transcription factor targets*). Con este análisis se confirmó un potenciamiento de los E2Fs, especialmente E2F1 y E2F4, en los LPBs respecto a los controles (Figura 24B). Este análisis también confirmó la relevancia de MYC y del complejo MYC/MAX en la regulación transcripcional del LPB (Figura 24B).

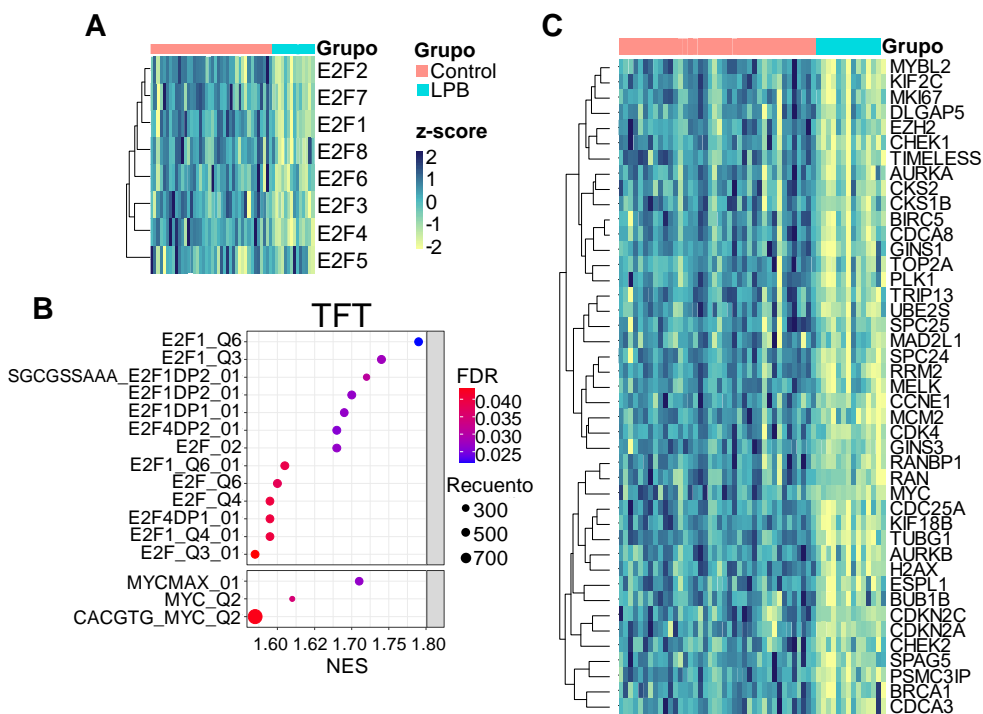


Figura 24. Expresión de E2F y sus genes diana involucrados en el ciclo celular. Pie de figura en la siguiente página.

Figura 24. Expresión de E2F y sus genes diana involucrados en el ciclo celular. **A.** Mapa de color de la expresión de los 8 miembros de la familia E2F en el LPB comparado con el grupo control. **B.** El gráfico exhibe los conjuntos de datos de la base de datos de dianas de FTs (TFT) relacionadas con los E2F y con MYC, considerando todos los genes codificantes con una media de recuento por grupo >5. El color y el tamaño de los puntos ilustran el FDR (*false discovery rate*) y el recuento de genes, respectivamente. En el eje X se muestra el NES (*normalized enrichment score*). **C.** Mapa de color de las dianas de E2F vinculadas al ciclo celular, sobreexpresadas en el LPB. En las figuras A y C, se muestran los casos en las columnas (LPB: azul; control: rosa). El color muestra el \log_2 del recuento normalizado (Z-score) con una agrupación jerarquizada por genes (filas).

Posteriormente se analizaron las dianas de E2F involucradas en la progresión del ciclo celular en el LPB. Los E2Fs regulan múltiples dianas del ciclo celular implicadas en los puntos de control de la transición entre las distintas fases. Entre otros, se identificaron reguladores de la transición G1/S (*CDC25A*, *KIF14*, *MYC*, *RRM2*, *TERT*) y de la transición G2/M (*MYC*, *CDKN2A*, *CDKN2C*, *TUBG1*, *SPC24*, *KIF18B*, *RRM2*, *TRIP13*, *CCNE1*, *MYBL2*; **Figura 24C**).

Centrándose en el punto de control de la transición G2/M, se identificaron 20 dianas de E2F cuya expresión estaba elevada en el LPB: *CDC25A*, *BIRC5*, *UBE2S*, *MKI67*, *PLK1*, *KIF2C*, *EZH2*, *ESPL1*, *TOP2A*, *CDKN2C*, *CKS1B*, *CHEK1*, *H2AX*, *AURKB*, *CKS2*, *AURKA*, *MCM2*, *MYC*, *MAD2L1*, *MYBL2* (**Figura 25A**).

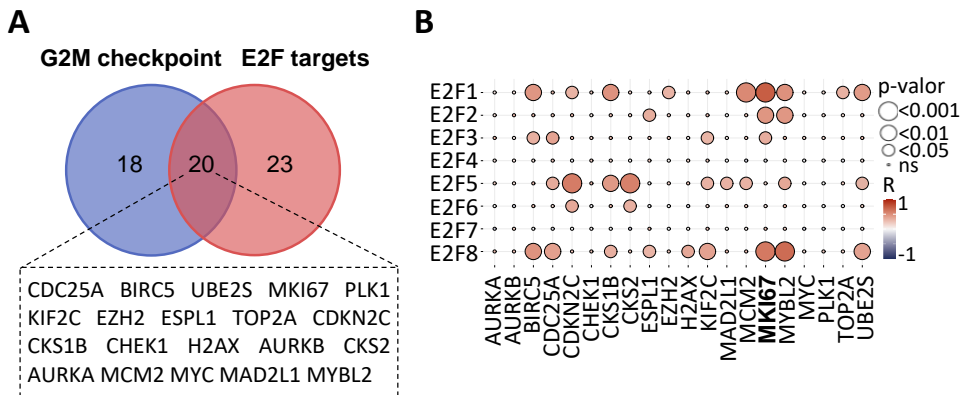


Figura 25. Dianas de E2F y reguladores del punto de control G2/M. **A.** Diagrama de Venn de los GDEs superpuestos entre las dianas de E2F (rosa) y el punto de control G2/M (azul) según el conjunto de genes *hallmark*. **B.** Correlación de Spearman entre la expresión de los E2Fs y los 20 genes identificados en la figura A. El tamaño del círculo y el color representan el p-valor y el valor R de la correlación, respectivamente.

Resultados

Al evaluar la correlación entre la expresión de los 8 miembros de la familia E2F y de estos 20 genes, se destacaron correlaciones positivas de algunos E2F con genes promotores de la proliferación como *MKI67* (*E2F1-3,8*) y *MYBL2* (*E2F1,2,5,8*). Otros genes como *BIRC5*, *CDC25A*, *CDKN2C*, *CKS1B*, *KIF2C*, *MYBL2* y *UBE2S* se asociaron positivamente al aumento de expresión de al menos 3 miembros de la familia E2F (**Figura 25B**).

Dado que el VEB parece jugar un papel relevante en la patogénesis de los linfomas asociados al VIH, se llevó a cabo un análisis GSEA comparando los casos de LPB VEB-positivos y negativos. Este análisis desveló que el VEB induce un perfil transcripcional pro-inflamatorio (respuesta a IFN- α , IFN- γ) y potencia la activación de la vía NF-kB. Cabe destacar que el VEB también potenció la expresión de las dianas de E2F en comparación a los linfomas no infectados por este virus (**Figura 26A**).

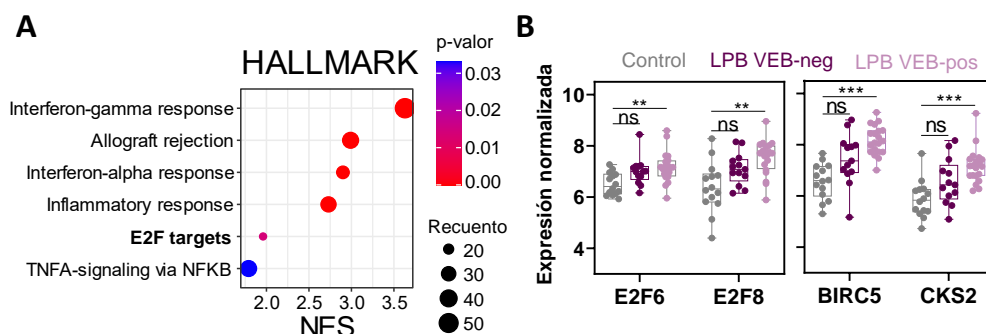


Figura 26. Enrichimiento de dianas de E2F en los LPB VEB-positivos. **A.** Análisis de enrichment (GSEA) usando el conjunto de genes *hallmark* en los LPBs VEB-positivos vs LPBs VEB-negativos. El color y el tamaño de los puntos ilustran el p-valor y el recuento de genes, respectivamente. En el eje X se muestra el NES (*normalized enrichment score*). **B.** Expresión normalizada de *E2F6* y *E2F8* (izquierda) y las dianas de E2F *BIRC5* y *CKS2* en los controles (gris), LPB VEB-negativos (granate) y LPB VEB-positivos (rosa). Significación estadística; **p < 0.01, ***p < 0.001; test de comparaciones múltiples de Dunn.

Concretamente, se identificó que el VEB conduce a una sobreexpresión de *E2F6* y *E2F8* en comparación a los controles. En cambio, los linfomas que no presentan infección por este virus no presentaron una sobreexpresión significativa de los genes mencionados (**Figura 26B**). Por lo tanto, estos resultados indican que el programa

transcripcional regulado por E2F se ve alterado bajo condiciones de infección de las células tumorales por el VEB.

Tras los resultados obtenidos, se evaluó si los E2F pudiesen tener un impacto en el pronóstico de los pacientes o asociarse a características clínicas adversas. Para ello, se estableció como punto de corte la mediana de expresión para cada E2F de todos los LPBs secuenciados. Se dispuso de datos de supervivencia de 22 de los 40 casos secuenciados y no se observaron diferencias en la SG en ninguno de los casos, únicamente una tendencia a una SG inferior en los casos con expresión elevada de *E2F2* ($p = 0.07$). En cuanto a la asociación con parámetros clínicos se incluyeron el IPI, ECOG, estadio Ann Arbor, LDH elevada y la afectación extraganglionar, de cuya información se disponía en 19 de los 40 casos secuenciados. Sin embargo, al distribuir los grupos entre expresión baja/alta de los E2F y características clínicas más favorables/adversas, hubo grupos con menos de 3 pacientes. Debido al número limitado de pacientes se consideró que los resultados no eran concluyentes y por ello no se muestran los resultados en esta tesis.

5.3. Estudio de expresión de miARNs

Con el objetivo de describir en mayor profundidad el transcriptoma del LPB, se estudió la expresión de miARNs mediante *microarrays* en 66 casos de LPB y 14 controles. El análisis de PCA reveló un grupo de LPB con un perfil de expresión cercano a los controles, mientras que otros LPB mostraron gran dispersión (varianza eje X: 33.3%, varianza eje Y: 12.6%), indicando que el LPB es un grupo heterogéneo en cuanto a la expresión de miARNs se refiere (**Figura 27A**).

El estudio de expresión diferencial mostró 59 miARNs diferencialmente expresados (mDEs): 16 sobreexpresados y 43 infraexpresados en el LPB respecto a los controles ($\log_2FC > |1|$, $p\text{-adj.} < 0.001$; **Figura 27B**). Entre ellos, destacan miR-148a-3p y -4417 como los miARNs con mayor expresión y miR-150-5p, -342-5p, -342-3p, -1972 y -3609 como los menos expresados. Para el resto del análisis, se

Resultados

consideraron únicamente los miARNs con dianas validadas según la base de datos proporcionada por *Affymetrix* (36 miARNs).

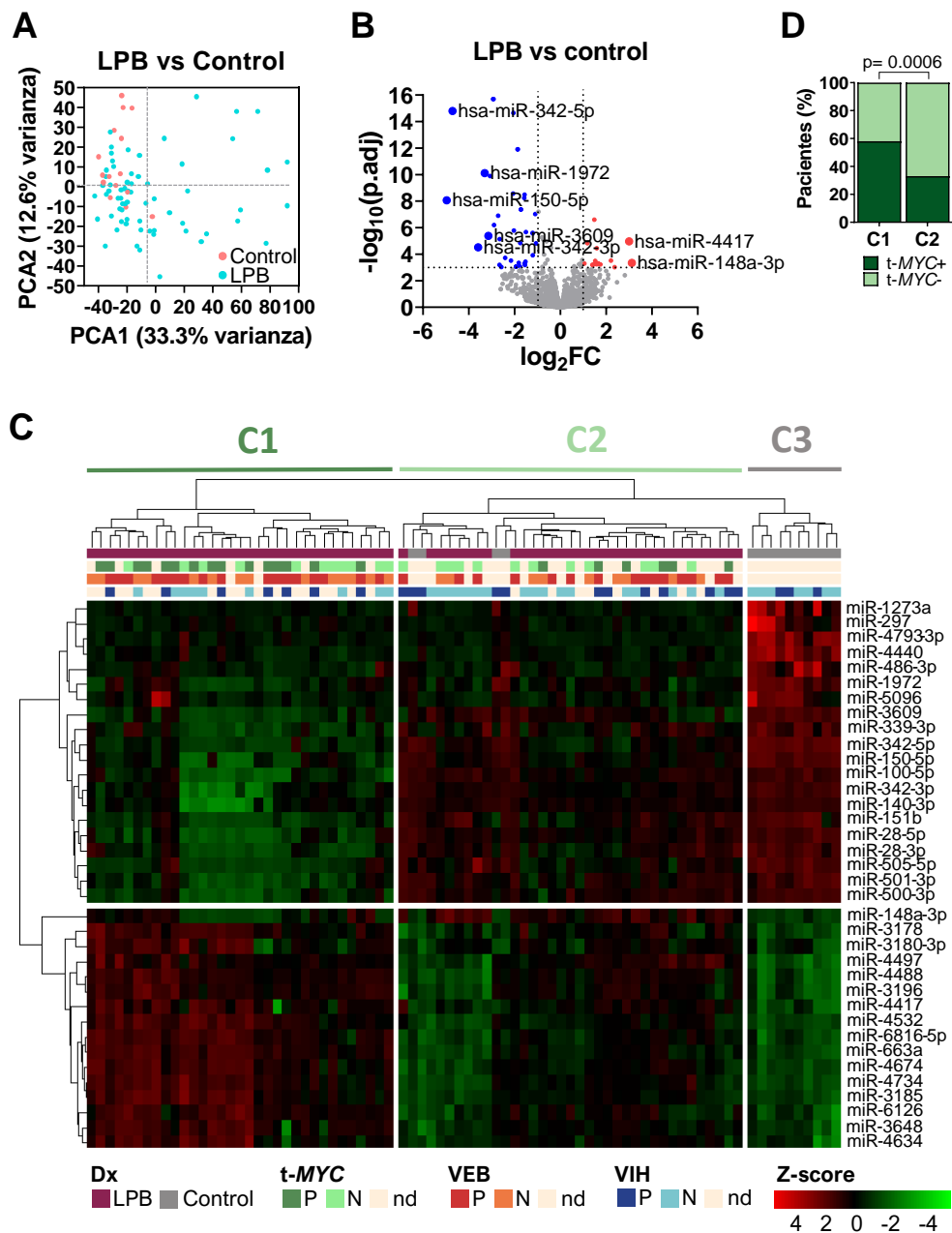


Figura 27. Diferencias en la expresión de miARNs entre LPBs y controles. Pie de figura en la siguiente página.

Figura 27. Diferencias en la expresión de miARNs entre LPBs y controles. **A.** PCA mostrando la varianza entre los casos de LPB (azul) y los controles (rosa) en ambos ejes. **B.** Gráfico Volcano mostrando los mDEs ($\log_2FC > |1|$, $p\text{-adj.} < 0.001$), destacando los miARNs más sobreexpresados (rojo) e infraexpresados (azul); los miARNs no diferencialmente expresados se muestran en gris. **C.** Mapa de color de la expresión de los mDEs jerarquizada por miARNs (filas) y por casos (columnas). El color representa el Z-score. En la parte superior se indica el diagnóstico (Dx), presencia de t-MYC e infecciones por el VEB y VIH de cada caso. En la parte más superior se indican los grupos de pacientes C1-2 (verde; LPB) y C3 (gris; control) según la expresión de los miARNs. **D.** Proporción de pacientes (%) con t-MYC en los grupos C1-C2 dependiendo de la t-MYC. Significación estadística calculada mediante el test exacto de Fisher.

A continuación, se evaluó la funcionalidad de los mDEs con el fin de evaluar el efecto que desempeñan los miARNs en el desarrollo del LPB. El análisis reveló que estos miARNs regulan positivamente dianas de MYC, genes de la vía mTORC1, reguladores del punto de control G2/M y dianas de E2F, tal y como se observó en el análisis de los datos de RNA-seq. Además, estos miARNs enriquecen la vía de la apoptosis y vías asociadas a la proliferación tales como la vía NF-kB y PI3K/Akt/mTOR (**Figura 28**).

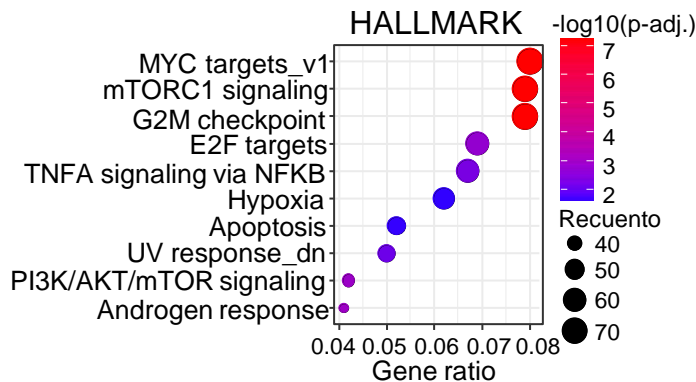


Figura 28. GSEA de las dianas de los mDEs en los LPBs vs controles. Se muestran los conjuntos de genes *hallmark* enriquecidos en el LPB según las dianas validadas (según la base de datos de Affymetrix) de los mDEs. El color y el tamaño de los puntos ilustran el $-\log_{10}(p\text{-adj.})$ y el recuento de genes, respectivamente. En el eje X se muestra la ratio de las dianas de los miARNs/genes totales de la vía.

Debido a que tanto el GSEA de los GDEs y mDEs coincidieron en un enriquecimiento de genes relacionados con el ciclo celular (punto de control de G2/M, dianas de E2F y dianas de MYC) en el LPB, nos focalizamos en estudiar las interacciones miARNs-genes diana incluidas en dichos conjuntos de genes *hallmark*.

Resultados

Para ello, se evaluaron las posibles interacciones entre los 7 mDEs más relevantes ($\log_2FC > |3|$, $p\text{-adj.} < 0.001$) y los GDEs. Mientras que miR-342-3p regula principalmente dianas de MYC (*CANX*, *GOT2*, *XPOT*, *KPAN2*), miR-148a-3p regula la expresión de dianas de E2F y genes implicados en el punto de control de G2/M (*MYC*, *AURKB*, *KIF2C*, *CCNA2*). miR-150-5p, además de regular dianas de E2F y genes del punto de control de G2/M (*CCNE1*, *BIRC5*, *EZH2*, *POLQ*), controla la expresión de *E2F3* tal y como demostró Meng et al.(283) (**Figura 29**). Todos estos miARNs podrían ser reguladores epigenéticos relevantes en la progresión del ciclo celular en el LPB.

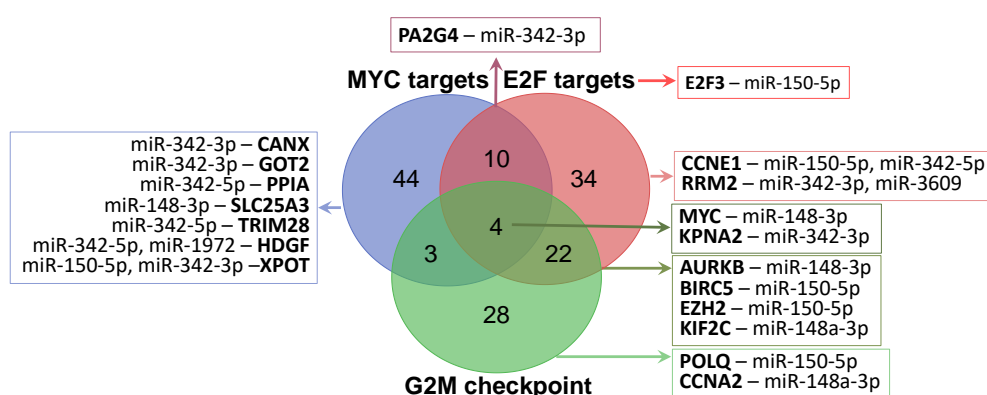


Figura 29. Diagrama de Venn de los GDEs, dianas de los miARNs más DE relacionados con el ciclo celular. Integración de los GDEs ($\log_2FC > |1|$, $p\text{-adj.} < 0.05$) y los mDEs ($\log_2FC > |3|$, $p\text{-adj.} < 0.001$) en los conjuntos de genes *hallmark* enriquecidos y relacionadas con el ciclo celular: MYC *targets* (azul), E2F *targets* (rosa) y G2M *checkpoint* (verde). Se incluye también E2F3 como diana de miR-150-5p.

5.3.1. Expresión de miARNs del VEB

Paralelamente, se analizó la expresión de los miARNs del VEB en el LPB VEB-positivo vs VEB-negativo, cuyo análisis demostró una sobreexpresión de miARNs BART del grupo 1 (BART1-3p, BART1-5p, BART17-3p, BART17-5p, BART4-5p, BART5-5p, BART6-3p, BART6-5p) y grupo 2 (BART10-3p, BART11-3p, BART11-5p, BART13-3p, BART13-5p, BART14-3p, BART7-3p, BART8-3p, BART9-3p) en los casos VEB-positivos. En cambio, los miARNs BHRF1, así como BART2-5p no estaban diferencialmente expresados (**Figura 30**). Según la expresión de estos miARNs, los

casos de LPB con infección por el VEB incluidos en el estudio se asociarían a un programa de latencia del virus tipo I o II.

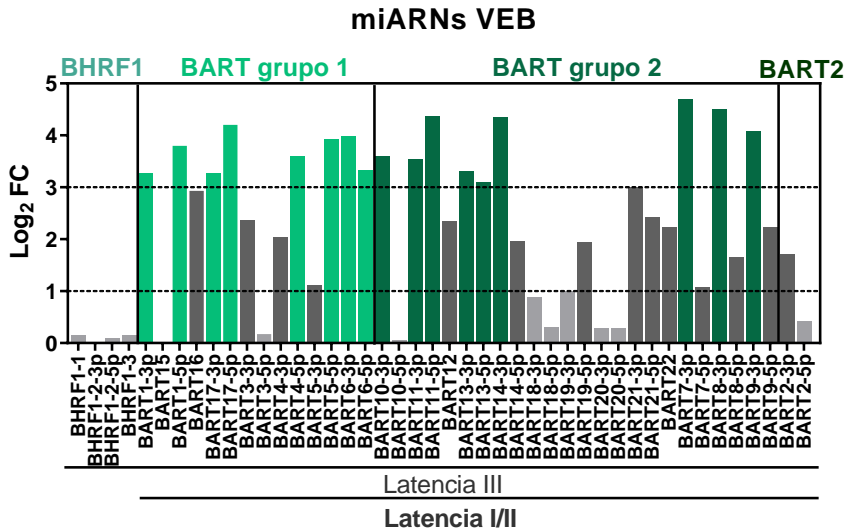


Figura 30. Expresión de miARNs del VEB. Se muestra la expresión diferencial (\log_2FC) de los miARNs del VEB en los LPB VEB-positivos vs los VEB-negativos. En la parte superior se muestran los 4 grupos de miARNs y en la parte inferior los miARNs incluidos en cada grupo. En la parte inferior se especifican los grupos de miARNs asociados al tipo de latencia I/II y a latencia III. Se representan por colores los miARNs más DE ($\log_2FC > 3$, verde [según el grupo]), miARNs ($\log_2FC > 1$ y < 3 , gris oscuro), miARNs no DE ($\log_2FC \leq 1$, gris claro).

5.4. Eje miR-150-5p/*E2F3*/*BIRC5* en la patogénesis del LPB

Debido a que miR-150-5p es el miARN más infraexpresado en el LPB y, además, reprime post-transcripcionalmente a *E2F3* (sobrexpresado en el LPB), se hipotetizó que miR-150-5p podría ejercer una función de supresor tumoral en dicho linfoma. Además, se identificó una correlación positiva entre *E2F3* y su diana *BIRC5* (Figura 25B), regulador del punto de control de la transición G2/M, y a su vez, posible diana de miR-150-5p, por lo que se decidió evaluar en mayor profundidad el papel del eje miR-150-5p/*E2F3*/*BIRC5* en el desarrollo del LPB.

5.4.1. miR-150-5p se correlaciona inversamente con *E2F3* y *BIRC5*

En primer lugar, se analizó si había una correlación entre la expresión de los 3 miembros. Se observó una asociación inversa entre las expresiones de los genes *E2F3* ($R = -0.59$; $p = 2.32 \cdot 10^{-6}$) y *BIRC5* ($R = -0.66$; $p = 4.87 \cdot 10^{-8}$) y la expresión de miR-150-5p, así como una asociación positiva entre *E2F3* y *BIRC5* ($R = 0.61$; $1.17 \cdot 10^{-6}$; **Figura 31A**). A continuación, se analizó si este eje favorece la proliferación, correlacionando sus expresiones con el marcador de proliferación *MKI67*. La expresión de *E2F3* ($R = 0.62$; $6.88 \cdot 10^{-7}$) y *BIRC5* ($R = 0.70$; $3.03 \cdot 10^{-9}$) se asoció positivamente con *MKI67*, al contrario que miR-150-5p ($R = -0.57$; $5.62 \cdot 10^{-6}$; **Figura 31B**). Estos resultados apuntan a que *E2F3* y *BIRC5* podrían actuar como promotores de la linfomagénesis mientras que miR-150-5p podría actuar como protector del desarrollo tumoral en dicho linfoma.

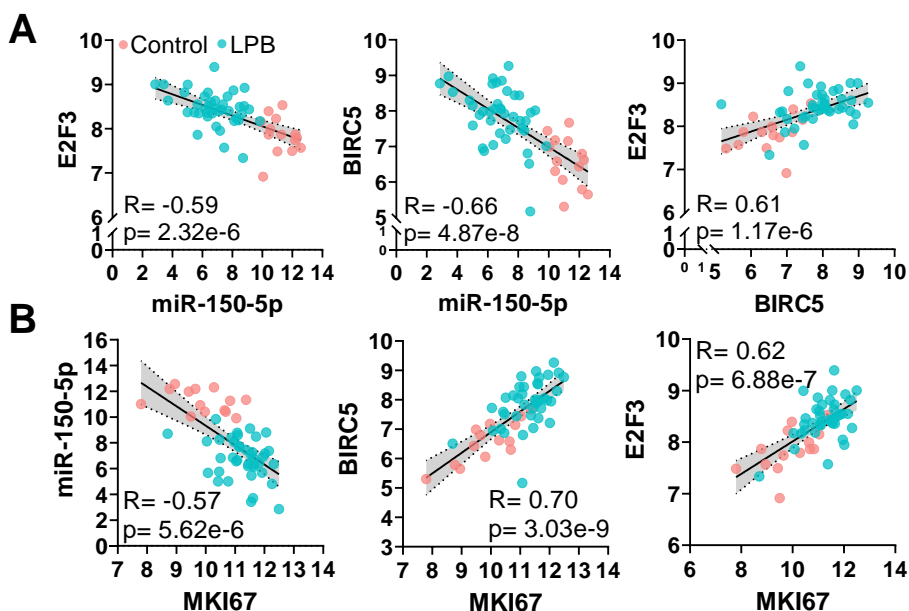


Figura 31. Correlación entre el eje miR-150-5p/*E2F3*/*BIRC5* y la proliferación. A. Se muestran las correlaciones de Spearman entre las expresiones de miR-150-5p y *E2F3* y *BIRC5*, así como la correlación de Spearman entre *BIRC5* y *E2F3*, incluyendo los controles (rosa) y los casos de LPB (azul). **B.** Se muestran las correlaciones del marcador de proliferación *MKI67* con miR-150-5p, *BIRC5* y *E2F3*.

La expresión del eje miR-150-5p/*E2F3*/*BIRC5* (**Figura 32**) fue validada mediante RT-qPCR, confirmando niveles aumentados de ARNm de *E2F3* y *BIRC5*, así como una infraexpresión de miR-150-5p en el LPB respecto a los casos control (**Figura 32B**).

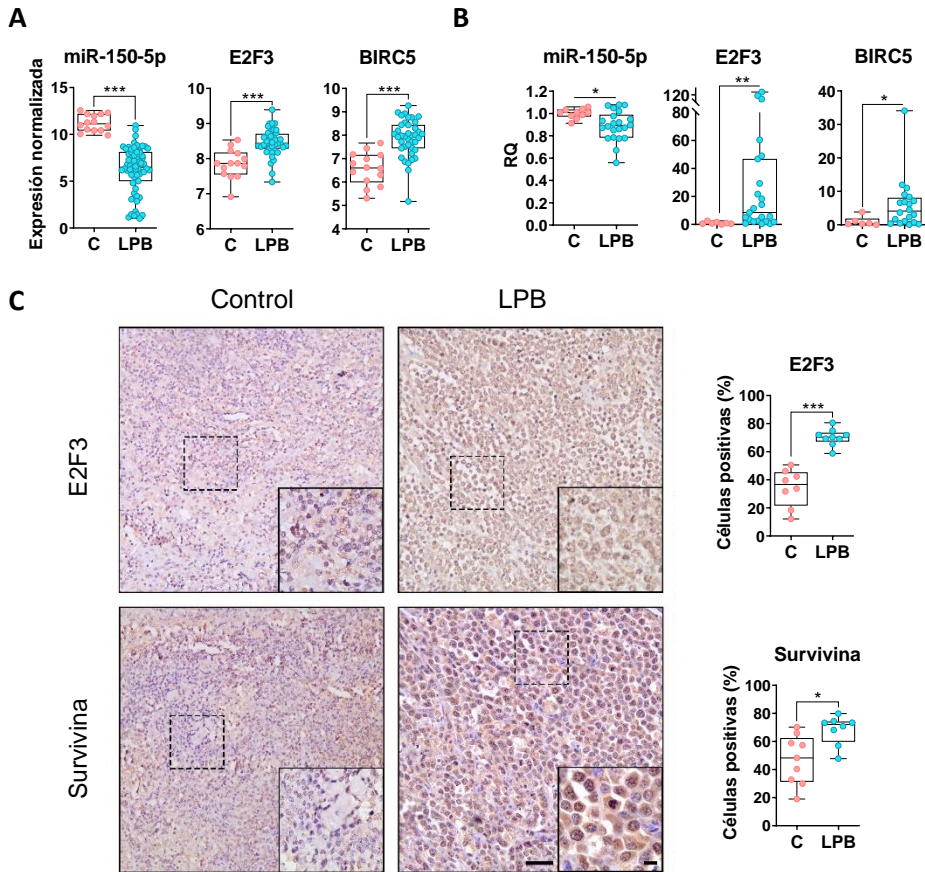


Figura 32. Validación de la expresión del eje miR-150/E2F3/BIRC5. **A.** En esta figura se muestra la expresión normalizada de miR-150-5p (*microarrays*), de *BIRC5* y *E2F3* (*RNA-seq*) de los controles y de los casos de LPB. **B.** Validación de la infraexpresión de miR-150-5p y la sobreexpresión de *BIRC5* y *E2F3* en el LPB mediante RT-qPCR. En estas figuras se muestra la cantidad relativa (RQ) de las expresiones, normalizadas respecto a la expresión de los controles. **C.** Expresión de las proteínas survivina y E2F3 analizadas mediante IHC a partir de cortes de 4µm de ganglios reactivos (control) y biopsias tumorales de LPB (izquierda), y la expresión relativa (%) de ambas proteínas (derecha). En todas las figuras se representan los casos control (rosa) y LPB (azul). Escala de la barra: 10µm (imagen pequeña), 50 µm (imagen grande). Los asteriscos representan la significancia estadística (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; Mann-Whitney U-test).

Resultados

Asimismo, se evaluaron los niveles de proteína de E2F3 y survivina (*BIRC5*) mediante IHC en los casos disponibles. La sobreexpresión de *E2F3* y *BIRC5* dio lugar a un aumento de los niveles de las proteínas codificadas en el LPB (n=7-9) respecto a los controles (n=8-9) (**Figura 32C**).

Pese a que según las anotaciones de *Affymetrix BIRC5* es diana validada de miR-150-5p, no ha sido validado en ensayos *in vitro* a diferencia de la interacción miR-150-5p/*E2F3*(283). Para confirmar la unión miR-150-5p/*BIRC5* se realizó el ensayo de luciferasa. Según la secuencia de miR-150-5p, éste podría unirse a 2 secuencias de la región 3'UTR de *BIRC5* (**Figura 33A**). La región 3'UTR conteniendo las secuencias de interés se clonó *downstream* del gen que codifica la luciferasa (pRP-luc-*BIRC5* 3'UTR). Este plásmido, además, contiene el gen que codifica mCherry para visualizar las células que han incorporado el plásmido (**Figura 33B**).

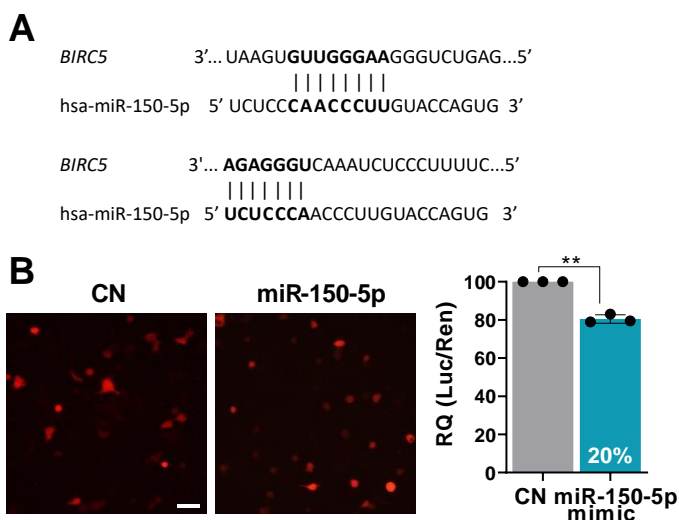


Figura 33. BIRC5 como diana de miR-150-5p. **A.** Posibles uniones de miR-150-5p a la región 3'UTR de *BIRC5*. **B.** La validación de la unión de miR-150-5p a la región 3'UTR de *BIRC5* se realizó mediante el ensayo de la luciferasa en las células HEK-293T. Las imágenes muestran la incorporación del plásmido Luc-*BIRC5*-3'UTR en las células nucleofectadas con miR-150-5p *mimic* y con el control negativo (CN). A la derecha se muestra la actividad relativa de la luciferasa (luciferasa/renilla). Escala de la barra: 50 µm. Significancia estadística **p < 0.01; t-test.

Las células HEK-293T fueron nucleofectadas con dicho plásmido junto con el plásmido que contiene el gen que codifica la renilla (pRP-hRLuc), para la

normalización de la expresión de la luciferasa. Las células nucleofectadas con miR-150-5p *mimic* mostraron una reducción del 20% de la expresión de la luciferasa en comparación a las células nucleofectadas con el control negativo (CN; **Figura 33B**), lo que validó que miR-150-5p se une a la región reguladora 3'UTR de *BIRC5*.

5.4.2. Evaluación de miR-150-5p como supresor tumoral

Para evaluar el papel de miR-150-5p como supresor tumoral en el LPB, éste fue sobreexpresado en las células PBL-1. La comprobación del aumento de expresión de miR-150-5p se realizó mediante RT-qPCR (**Figura 34A**).

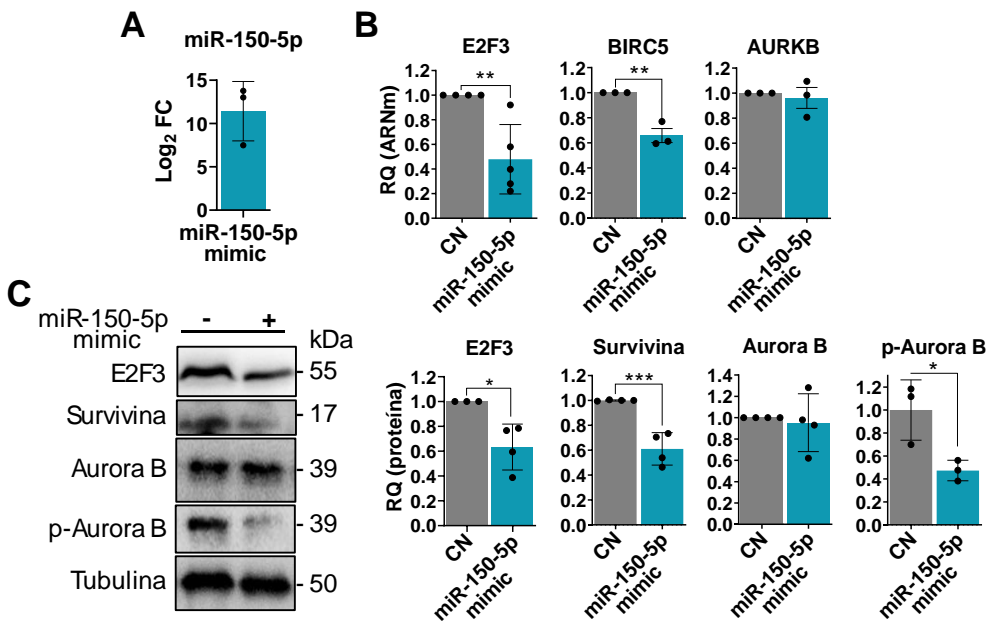


Figura 34. Expresión del eje miR-150-5p/E2F3/BIRC5. **A.** Expresión de miR-150-5p en las células PBL-1 nucleofectadas con miR-150-5p *mimic* determinado por RT-qPCR (normalizado respecto a RNU48). Se representa el log₂FC respecto a las células nucleofectadas con el miARN control negativo (CN). **B.** Expresión relativa (RQ) de *E2F3*, *BIRC5* y *AURKB* determinada por RT-qPCR (normalizada respecto a *ACTB*). **C.** Imágenes de Western Blot y cuantificación relativa de E2F3, survivina, Aurora B y p-Aurora B (normalizados respecto a tubulina). Cada barra representa la media \pm SEM de triplicados o cuadruplicados biológicos de las células nucleofectadas con miR-150-5p *mimic* (azul) normalizadas respecto a las nucleofectadas con CN (gris). Significancia estadística * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; t-test.

Tal y como se ha mencionado previamente, *E2F3* y *BIRC5* son reguladores del ciclo celular y, además, *BIRC5* es un regulador negativo de la apoptosis. Es por ello

Resultados

que se evaluó el efecto de la sobreexpresión de miR-150-5p en estos procesos celulares y en la proliferación, en comparación con las células control (CN). La apoptosis se evaluó a las 24h mediante citometría de flujo mediante la tinción del marcador de apoptosis anexina V y el intercalante del ADN TO-PRO-3. Los resultados mostraron un aumento de las células apoptóticas (tempranas y tardías) y una consecuente reducción en la viabilidad celular de aproximadamente el 15% (**Figura 35A**).

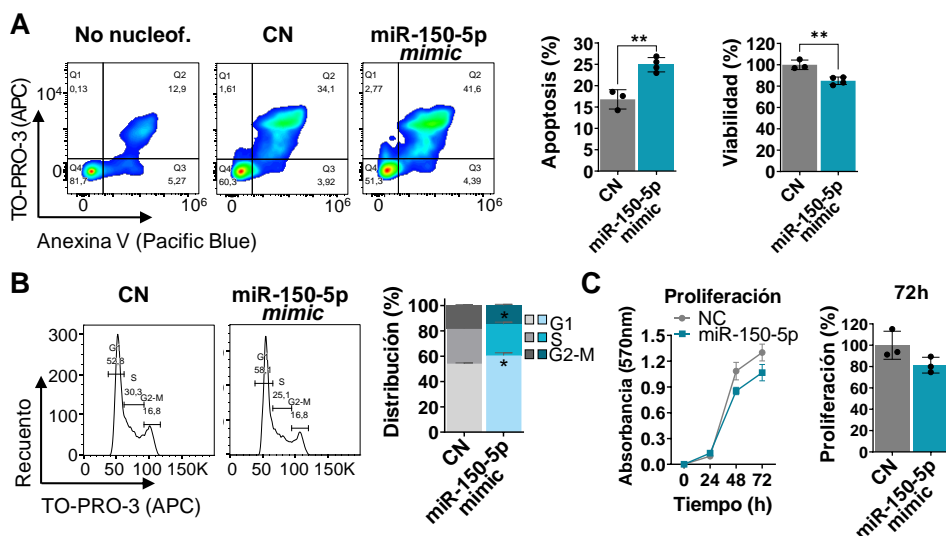


Figura 35. Evaluación del efecto de la sobreexpresión de miR-150-5p en PBL-1. **A.** Efecto de la sobreexpresión de miR-150-5p en la apoptosis evaluado a las 24h mediante la tinción con anexina V/ TO-PRO-3 y citometría de flujo (izquierda). Viabilidad relativa (anexina V^{neg}/TO-PRO-3^{neg}) y porcentaje de células apoptóticas, (tempranas: anexina V^{pos}/TO-PRO-3^{neg}; tardías: anexina V^{pos}/TO-PRO-3^{pos}; derecha). **B.** Efecto en la progresión del ciclo celular a las 24h mediante la tinción intracelular con TO-PRO-3 mediante citometría de flujo (izquierda). Distribución (%) de las células en las fases del ciclo celular (derecha). **C.** El efecto en la proliferación a las 24, 48 y 72h se determinó mediante ensayos MTT (absorbancia 570nm; izquierda) y la proliferación relativa a las 72h (derecha). Cada barra representa la media \pm SEM de triplicados o cuadruplicados biológicos. Significación estadística *p < 0.05, **p < 0.01; t-test.

El efecto en el ciclo celular se analizó a las 24h por citometría de flujo mediante la tinción con TO-PRO-3, cuyos resultados revelaron un incremento de células en la fase G1 y una disminución de estas en las fases G2/M (**Figura 35B**). Se investigó cómo estos efectos afectaban a la proliferación celular mediante ensayos MTT a las 24, 48 y 72h. No se detectaron diferencias en la proliferación a las 24h, mientras que a las 48 y 72h, miR-150-5p produjo una inhibición de la proliferación, alcanzando el

20% de inhibición a las 72h. Estos datos confirman que miR-150-5p desempeña un papel como supresor tumoral en las células PBL-1 a través de la represión de *E2F3* y *BIRC5*.

5.4.3. Evaluación de la regulación negativa de miR-150-5p

Como se ha visto previamente, *E2F3* se asocia a mayor proliferación en el LPB y a menor expresión de miR-150-5p (**Figuras 31A-B**), por lo que se hipotetizó que *E2F3* a su vez, podría reprimir a miR-150-5p. Además, miR-150-5p es reprimido directamente por *MYC*(123), el cual es diana de *E2F3*. Por todo ello, se analizó si *E2F3* pudiese inducir la regulación negativa de miR-150-5p mediada por *MYC* en el LPB. En primer lugar, se confirmó la correlación directa entre las expresiones de *E2F3* y *MYC* ($R=0.46$, $p=0.0004$; **Figura 36A**). No obstante, no se observó mayor expresión de *MYC* en aquellos pacientes con niveles superiores de *E2F3* (**Figura 36B**), probablemente debido a que tanto en el grupo con expresión de *E2F3* baja como alta incluyen casos con t-*MYC* que presentan una expresión constitutiva de este gen. Por otro lado, se confirmó que los a mayor expresión de *MYC* mayor es la infraexpresión de miR-150-5p ($R=-0.54$, $p=2.13 \cdot 10^{-5}$; **Figura 36C**).

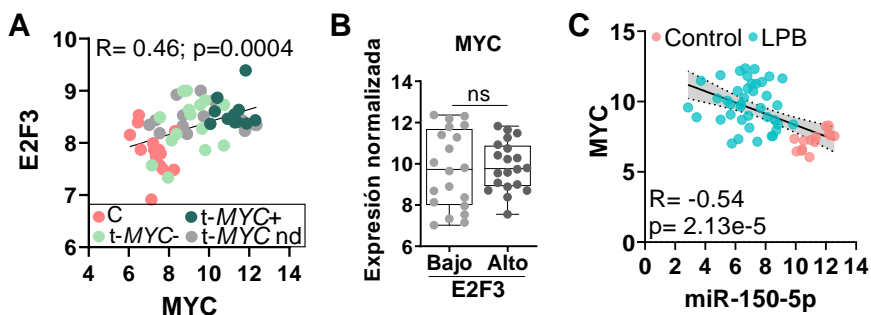


Figura 36. Expresión del eje E2F3/MYC/miR-150-5p. **A.** Correlación entre la expresión de *MYC* (eje X) y *E2F3* (eje Y), incluyendo los controles (rosa), LPB t-*MYC*-negativo (verde claro), LPB t-*MYC*-positivo (verde oscuro), LPB t-*MYC* no disponible (nd, gris). **B.** Expresión de *MYC* en LPB con expresión alta o baja de *E2F3*. **C.** Correlación entre la expresión de miR-150-5p (eje X) y *MYC* (eje Y) incluyendo los controles (rosa) y los LPB (azul). Significación estadística: test de correlación de Spearman (A y C), test de Mann-Whitney (B).

A continuación, se planificó generar líneas *knockout* (KO) para *MYC* (*MYC*^{KO}) y para *E2F3* con el objetivo de evaluar si la infraexpresión de miR-150-5p detectada en

Resultados

el LPB, se debe a la represión inducida por E2F3 a través de la activación de MYC. Para ello se editó genéticamente la línea PBL-1 mediante CRISPR/Cas9. No se consiguió obtener una línea KO estable para *E2F3*, lo cual podría deberse a la incapacidad de estas células para proliferar. En consecuencia, se seleccionó un clon que contenía mutaciones en el dominio de unión al ADN y en la estructura de cremallera de leucinas de la proteína. Estas mutaciones dieron lugar a un cambio de los aminoácidos 223 y 224 de NV a KA (**Figuras 37A-B**), generando una línea celular *knockdown* para *E2F3* con una reducción del 50% de su expresión (**Figura 37C**). En cambio, sí que fue posible establecer la línea *MYC*^{KO} estable reduciendo hasta el 90% los niveles de c-Myc (**Figura 37D**).

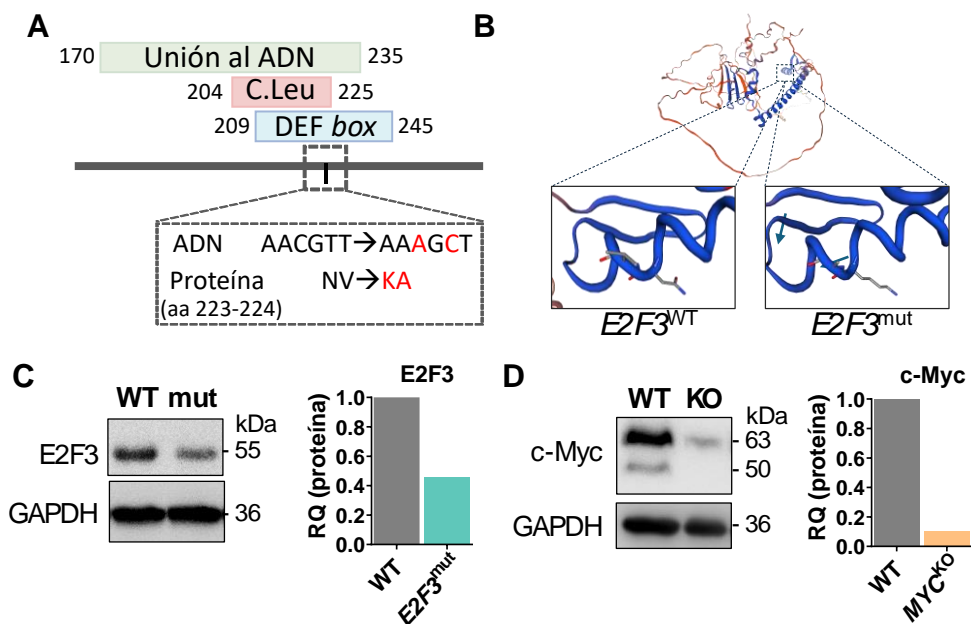


Figura 37. Generación de la línea *knockdown* para *E2F3* y *knockout* para *MYC*. **A.** Esquema de las mutaciones generadas en el ADN que dan lugar al cambio de los aminoácidos 223 y 224 que se forman parte del dominio de unión al ADN, de la cremallera de leucinas y del dominio DEF box. **B.** Imágenes del cambio de aminoácidos en la estructura proteica. **C.** Expresión de E2F3 analizada por Western blot y cálculo de la expresión relativa en las células PBL-1 *E2F3* mutado (*E2F3*^{mut}) comparada con las células PBL-1 (*E2F3*^{WT}). **D.** Imagen de Western blot de la expresión de c-Myc en las células PBL-1 *MYC* *knockdown* (*MYC*^{KO}) comparado con las células *MYC*^{WT}.

A continuación, se evaluó si las células *E2F3* *knockdown* presentaban niveles reducidos de c-Myc. Efectivamente, la pérdida de *E2F3* conllevó a una reducción de los niveles de c-Myc del 13% en las células *E2F3*^{mut} respecto a las células WT (**Figura**

38A). Seguidamente, se determinó la expresión de miR-150-5p en las células $E2F3^{mut}$ y MYC^{KO} mediante RT-qPCR. Ambas líneas celulares reflejaron un aumento de expresión de miR-150-5p en comparación con las células WT (**Figura 38B**). Para validar estos resultados, se nucleofectaron ambas líneas celulares con miR-150-5p y se observó que, tanto las células $E2F3^{mut}$ como MYC^{KO} , alcanzaron mayores niveles de miR-150-5p que las células WT, siendo superior en las MYC^{KO} . Estos resultados apuntan a que E2F3 induce la represión de miR-150-5p a través de la activación de MYC en el LPB.

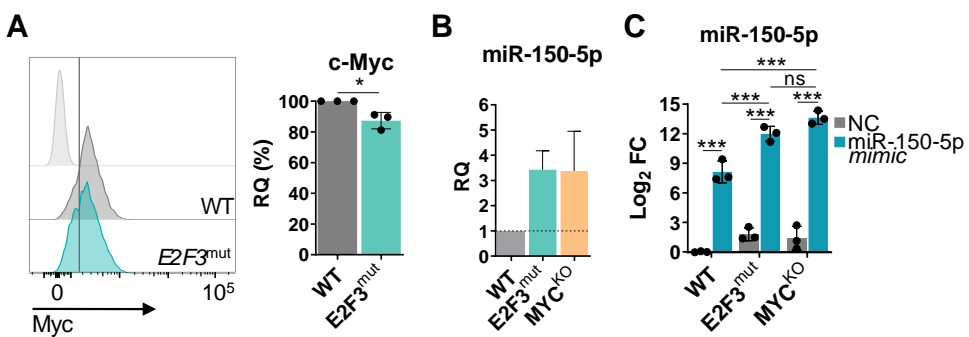


Figura 38. Sobreexpresión de miR-150-5p en las células PBL-1 $E2F3^{mut}$. **A.** Imagen representativa de la expresión de c-Myc analizada mediante citometría de flujo en las células PBL-1 WT (gris) y $E2F3^{mut}$ (verde, izquierda) y expresión de c-Myc relativa (%). **B.** Expresión relativa (RQ) de miR-150-5p evaluada mediante RT-qPCR (normalizada respecto a RNU48) en las células PBL-1 (WT, gris), $E2F3^{mut}$ (verde) y MYC^{KO} (naranja). **C.** Se muestra el \log_2 del cambio de expresión (FC) de miR-150-5p en las células $E2F3^{mut}$, MYC^{KO} y WT nucleofectadas con miR-150-5p (azul), normalizada respecto a las células WT nucleofectadas con el miARN control negativo (NC; gris). Las barras representan la media \pm SEM de triplicados biológicos. La significación estadística se calculó mediante el t-test (A) y el test de comparaciones múltiples de Tukey (C), * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

5.4.4. Efecto de la sobreexpresión de miR-150-5p en las células $E2F3^{mut}$

Para valorar que E2F3 es una diana relevante de miR-150-5p en su función como supresor tumoral, se evaluó el efecto que éste produce en las células $E2F3^{mut}$. La sobreexpresión de miR-150-5p condujo a una inhibición de la proliferación del 35%, superior al efecto observado en las células WT (**Figura 39A**). Curiosamente, no se detectaron cambios en la progresión del ciclo celular ni a las 24h ni a las 72h, así

Resultados

como tampoco en la inducción de la apoptosis en las células $E2F3^{mut}$, hechos que sí fueron observados en las células $E2F3^{WT}$ (Figuras 39B-C).

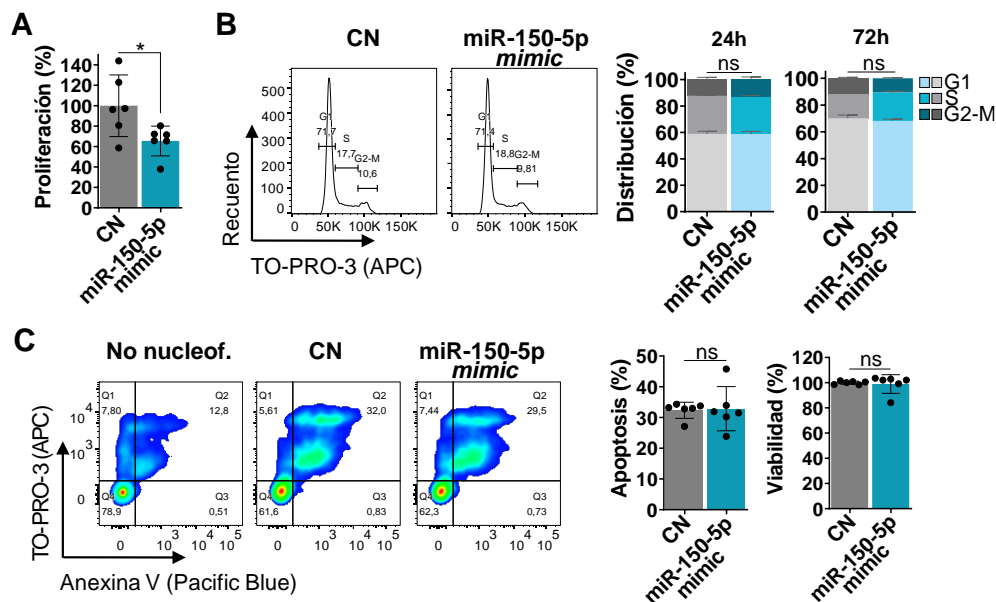


Figura 39. Evaluación del efecto de la sobreexpresión de miR-150-5p en PBL-1 $E2F3^{mut}$.

A. Proliferación relativa de las células nucleofectadas con miR-150-5p mimic respecto al control negativo (CN) a las 72h evaluada mediante ensayos MTT. **B.** Efecto en la progresión del ciclo celular a las 24 y 72h mediante la tinción intracelular con TO-PRO-3 mediante citometría de flujo (izquierda). Distribución (%) de las células en las fases del ciclo celular (derecha). **C.** Imágenes de citometría de flujo mostrando la apoptosis mediante la tinción con anexina V (*pacific blue*; X)/TO-POR-3 (APC; Y) en las células sin nucleofectar y nucleofectadas con el miARN control negativo (CN) o miR-150-5p mimic a las 24h; izquierda. Porcentaje de células apoptóticas (tempranas: anexina V^{pos}/TO-PRO-3^{neg} + tardías: anexina V^{pos}/TO-PRO-3^{pos}; derecha); derecha. Viabilidad relativa (%; Anexina V^{neg}/TO-PRO-3^{neg}). En todas ellas, las barras representan la media \pm SEM de triplicados biológicos y replicados técnicos. La relatividad se referencia respecto a las células nucleofectadas con CN. Significación estadística *p < 0.05; test de Mann-Whitney.

Tras estos resultados, se analizaron los niveles de expresión de dianas de miR-150-5p, sobreexpresadas en el LPB, e involucradas en el ciclo celular como $E2F3$, $BIRC5$, $CCNE1$ y $EZH2$. A diferencia de la reducción de los niveles de ARNm de $E2F3$, $BIRC5$ y $CCNE1$ observada en las células WT, no se vieron diferencias en los niveles de ARNm de dichos genes en las células $E2F3^{mut}$. Sin embargo, los niveles de $EZH2$ de ARNm no se alteraron en ninguna de las 2 líneas celulares (Figura 40A). Al

analizar los niveles de proteína, la disminución de la expresión de E2F3, de survivina y de ciclina E1 observadas en las células WT al sobreexpresar miR-150-5p, no se detectaron en las células *E2F3*^{mut} (**Figuras 40B-C**). La pérdida de efecto del miR-150-5p sobre la regulación del ciclo celular y la inducción de la apoptosis en las células *E2F3*^{mut} apuntan a que miR-150-5p ejerce un papel supresor tumoral controlando estos procesos celulares en el LPB, a través de la regulación de *E2F3*. Sin embargo, *E2F3* no parece ser una diana fundamental de dicho miARN en la regulación de la proliferación en el LPB.

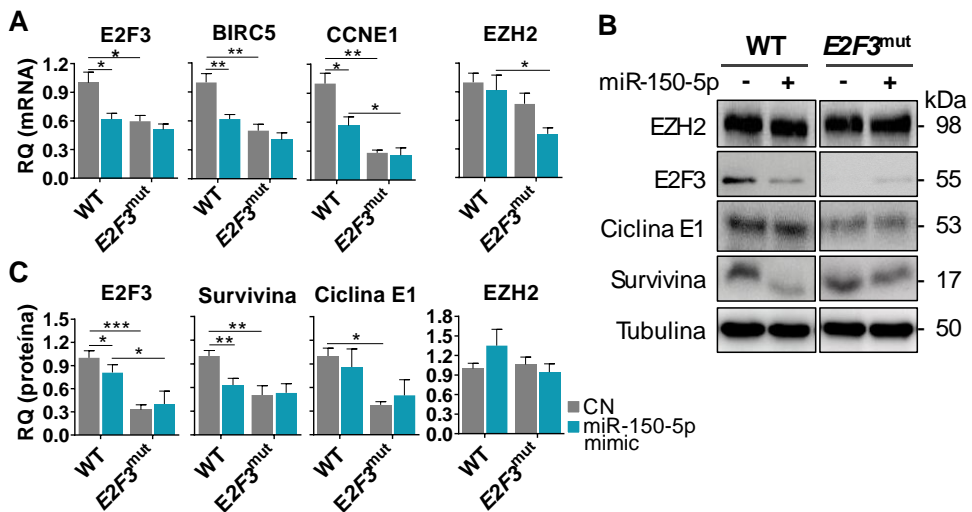


Figura 40. Expresión de dianas de miR-150-5p en PBL-1 WT y *E2F3*^{mut}. **A.** Expresión relativa (RQ) de *E2F3*, *BIRC5*, *CCNE1* y *EZH2* determinada por RT-qPCR (normalizada respecto a *ACTB*). Imágenes de Western Blot (**B**) y cuantificación relativa (**C**) de E2F3, survivina, ciclina E1 y Ezh2 (normalizados respecto a tubulina). Las barras muestran la media \pm SEM de triplicados biológicos y replicados técnicos de las células WT y *E2F3*^{mut} nucleofectadas con miR-150-5p mimic (azul) y miARN control negativo (CN). Las expresiones relativas fueron normalizadas respecto a WT CN. Significación estadística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; test de Mann-Whitney.

5.5. Evaluación del papel de E2F3 en la patogénesis del LPB

5.5.1. Programa transcripcional del ciclo celular regulado por E2F3

A la vista de todos los resultados previos, se decidió investigar el papel de E2F3 como posible promotor de la linfomagénesis en el LPB. Se analizó la expresión de

Resultados

dianas de E2F implicadas en el punto de control de G2/M en las células *E2F3^{mut}* con el objetivo de evaluar la asociación de E2F3 con la desregulación del punto de control de la transición G2/M identificado en el LPB. Para ello se evaluaron *AURKB*, *BIRC5*, *CCNA2*, *CCNE1*, *EZH2*, *MYC* y *RRM2*, observando una infraexpresión de todos ellos a excepción de *MYC* en las células *E2F3^{mut}* en comparación con las WT mediante RT-qPCR (Figura 41A).

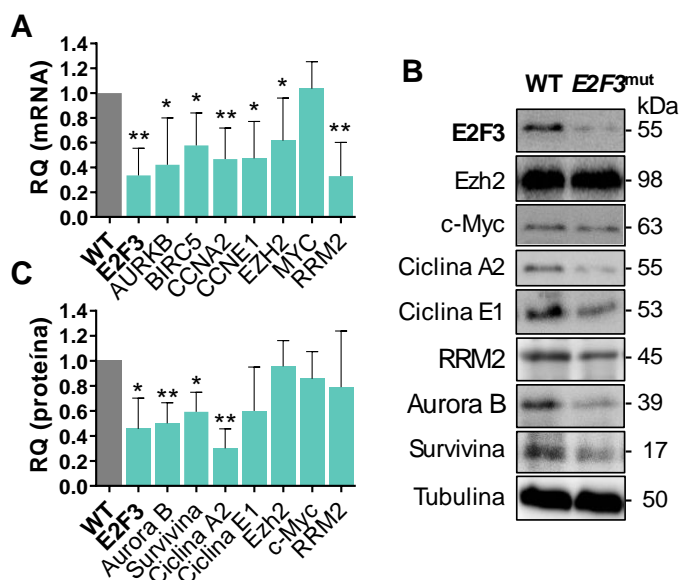


Figura 41. Expresión de dianas de E2F3 en PBL-1 WT y *E2F3^{mut}*. **A.** Expresión de dianas de E2F3, implicadas en el ciclo celular, determinada por RT-qPCR y normalizada respecto a ACTB. Se muestra la expresión de ARNm relativa en las células PBL-1 *E2F3^{mut}* (verde) normalizada respecto a la media de expresión en las células PBL-1 (WT; gris). **B.** Imágenes de Western blot representativas de la expresión proteica de los genes evaluados por RT-qPCR en la línea WT y *E2F3^{mut}*. **C.** Las cuantificaciones de las proteínas se normalizaron respecto a β -tubulina. En las figuras A y C, las barras representan la media \pm SEM de la expresión relativa de ARNm las proteínas de triplicados biológicos. Significancia estadística * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; t-test.

Seguidamente, se exploraron los niveles de las proteínas codificadas por dichos genes mediante Western blot, en los que se vio una reducción significativa de los niveles de E2F3, Aurora B, survivina y ciclina A2, así como una tendencia a la reducción de ciclina E1 (Figura 41B-C).

5.5.2. E2F3 en la progresión tumoral

La reducción de los niveles de E2F3 y la consecuente desregulación de genes implicados en el ciclo celular como *CCNE1* y *CCNA2* en las células *E2F3^{mut}* comprometieron la progresión del ciclo celular, a través de un arresto de las células en la fase G1 (**Figura 42A**).

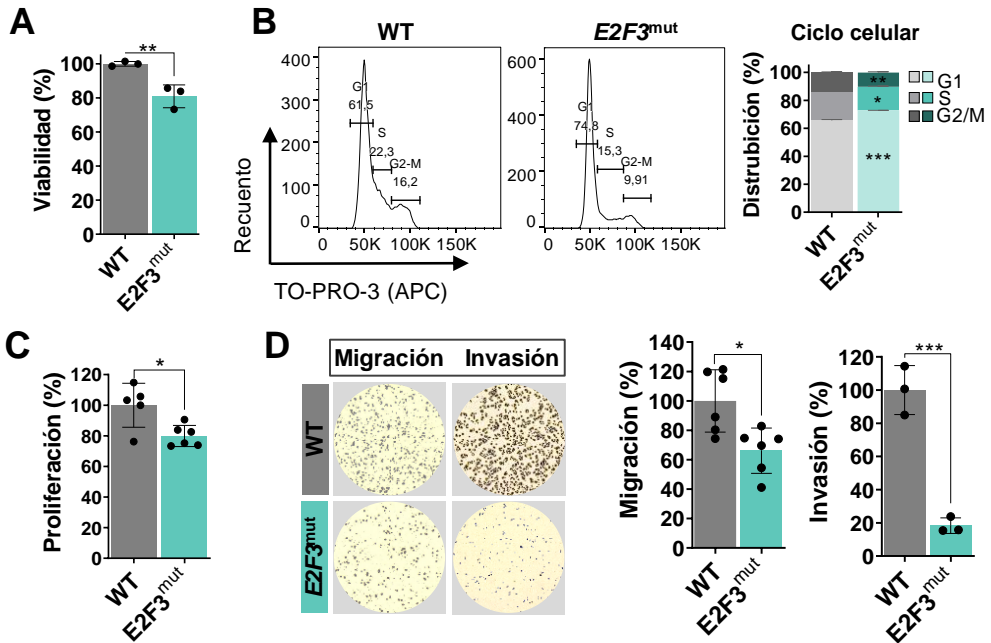


Figura 42. Contribución de E2F3 a la patogénesis del LPB. **A.** La imagen muestra la viabilidad relativa (%) de las células PBL-1 *E2F3^{mut}* respecto a las WT evaluada mediante el recuento celular con *tripan-blue*. **B.** La progresión del ciclo celular se analizó mediante citometría de flujo y el marcaje intracelular de TO-PRO-3 (APC). Imágenes de citometría de flujo de las células PBL-1 WT y *E2F3^{mut}* en la que se muestra el marcaje de TO-PRO-3 (eje X) y el recuento de células (eje Y) especificando las diferentes fases: G1 (primer pico), G2-M (último pico), S (región entre picos), [izquierda]. Proporción de células (%) WT y *E2F3^{mut}* en las fases del ciclo celular: G1, S, G2-M (derecha). **C.** Proliferación celular relativa (%) de las células *E2F3^{mut}* normalizada respecto a las células WT que se determinó mediante el ensayo MTT. **D.** La migración e invasión de las células WT y *E2F3^{mut}* fue determinada a las 48h después de sembrar las células en *Transwell* con insertos de membranas con poros de 5µm. Imágenes de los pocillos de las células migrantes e invasivas (izquierda) y migración e invasión relativa (%) de las células *E2F3^{mut}* normalizadas respecto a la media de las WT (derecha). En todos los casos se representan las medias \pm SEM de triplicados biológicos de las células WT (gris) y *E2F3^{mut}* (verde) y algunas incluyen replicados técnicos. Significación estadística * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, t-test o Mann Whitney test.

Estos hallazgos indican que la pérdida de E2F3 impide la correcta activación del programa transcripcional que induce la transición G1/S. Además, se evaluó cómo

Resultados

E2F3 contribuye a la linfomagénesis del LPB a través de otros mecanismos oncogénicos. En primer lugar, las células $E2F3^{mut}$ mostraron menor viabilidad que las WT (**Figura 42B**), así como pérdida de la capacidad proliferativa de estas células (**Figura 42C**). La pérdida de E2F3 a su vez, dio lugar a una inhibición de la migración (34%) y comprometió en gran medida la capacidad invasiva de las células tumorales (82%; **Figura 42D**).

5.5.3. Estudio del papel de E2F3 en el modelo de MCA de pollo

Con el fin de corroborar el papel linfomagénico de E2F3 en el LPB, se generaron modelos de xenoinjerto en la MCA de embrión de pollo inoculando las células PBL-1 WT o $E2F3^{mut}$ el día 9 (D9) del desarrollo embrionario siguiendo la estrategia ilustrada en la **Figura 17**. El peso de los huevos fue evaluado en los días 9, 12, 14 y 16 sin observar diferencias significativas entre ambos grupos (**Figura 43A**). El experimento finalizó el día 16, cuando se pesaron los embriones y los tumores extraídos. Se calculó la proporción del peso de los embriones respecto al peso de los huevos, el cual mostró una reducción en el modelo de xenoinjerto $E2F3^{mut}$ (**Figura 43B**), sin embargo, no se vieron diferencias en el peso tumoral entre ambos modelos (**Figura 43C**).

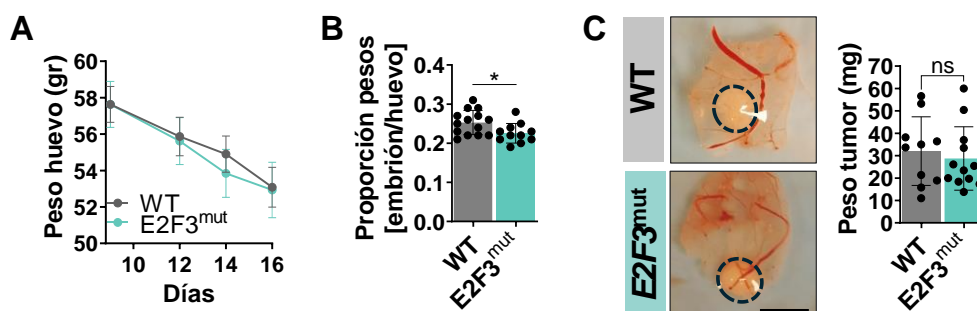


Figura 43. Evaluación de pesos en los modelos MCA PBL-1 WT i $E2F3^{mut}$. **A.** Peso relativo de los huevos (gr) por días en los WT (n=14) y $E2F3^{mut}$ (n=11). **B.** Proporción de pesos en gr (embrión/huevo) el D16. **C.** Imágenes representativas de los tumores generados en el modelo MCA por las células WT (n=10) y $E2F3^{mut}$ (n=12) el D16 y peso (mg) de los mismos. Los gráficos de barras representan las medias \pm SEM de los tumores generados por las células WT (gris) y $E2F3^{mut}$ (verde). Tamaño de la barra: 0.5cm. Significación estadística * $p < 0.05$; test de Mann-Whitney.

A fin de evaluar la asociación de E2F3 con el desarrollo tumoral, se analizaron mediante citometría de flujo las células CD138+ humanas presentes en los tumores mediante el cual se detectó una reducción considerable de células CD138+ en los tumores *E2F3*^{mut} (Figura 44A). Paralelamente, se evaluó mediante IHC la proliferación de ambos tumores, observando de nuevo, una pérdida de capacidad proliferativa en los tumores *E2F3*^{mut} (Figura 44B) lo cual revela que E2F3 contribuye al desarrollo tumoral en el LPB.

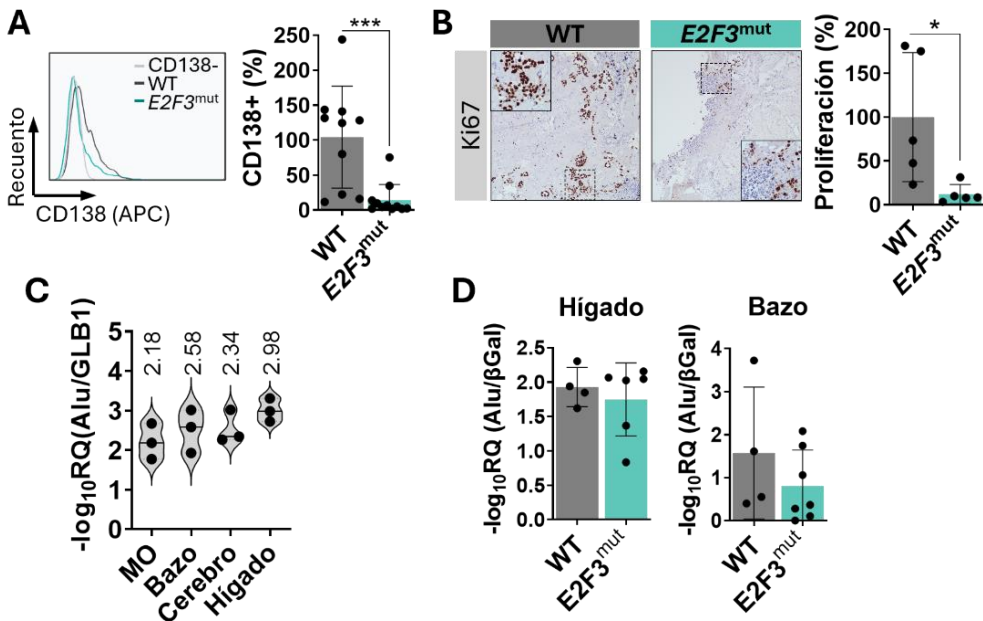


Figura 44. Capacidad proliferativa y migratoria de las células *E2F3*^{mut}. **A.** La presencia de las células de LPB en los tumores formados en la MCA fue evaluado mediante citometría de flujo y el marcaje de las células con CD138 (APC). Se representan las curvas de las células CD138- y CD138+ representativas de los tumores generados por las células WT (n= 10) y *E2F3*^{mut} (n=11), mostrando la expresión de CD138 (eje X) y el recuento de células (eje Y) [izquierda]. Porcentaje relativo de células CD138+ en los tumores *E2F3*^{mut} normalizado respecto a la media de las células CD138+ en los tumores WT (derecha). **B.** Imágenes representativas de las tinciones con Ki67 mediante IHC para evaluar la proliferación en los tumores generados de las células WT y *E2F3*^{mut} en el modelo MCA. Escala de la barra: 20 μ m (imagen pequeña) y 100 μ m (imagen grande) [izquierda]. Proliferación relativa (%) de los tumores *E2F3*^{mut} (n=5) normalizada respecto a la media de proliferación de los tumores WT (n=5) [derecha]. **C.** Evaluación de la migración de las células PBL-1 WT a la médula ósea, bazo, cerebro e hígado analizado mediante RT-qPCR la presencia de la secuencia Alu humana, normalizada respecto al gen *GLB1* de pollo. La imagen muestra el -log₁₀RQ. **D.** Migración relativa (-log₁₀ RQ) de las células *E2F3*^{mut} (n=6-7) respecto a las WT (n= 4) en el hígado y bazo. En todos los casos se representan las medias \pm SEM de los tumores WT (gris) y *E2F3*^{mut} (verde). Significación estadística *p <0.05; ***p<0.001; test de Mann-Whitney.

Resultados

Para analizar la migración de las células tumorales en dicho modelo, se cuantificó mediante RT-qPCR la presencia de la secuencia Alu humana en la médula ósea, bazo, cerebro e hígado por ser los órganos dónde más migración se ha observado en otros modelos MCA de linfomas (n=3). Finalmente, se seleccionaron el hígado y el bazo como órganos para valorar la migración entre los modelos MCA WT y *E2F3*^{mut} ya que se observaron niveles superiores de secuencia Alu (**Figura 44C**). No obstante, debido al bajo número de casos y a la dispersión observada, no fue posible identificar diferencias significativas en la migración a hígado y bazo entre el modelo *E2F3*^{mut} (n=7) y WT (n=4; **Figura 44D**).

5.6. Evaluación de E2F3 y survivina como dianas terapéuticas

Tras demostrar la capacidad oncogénica de E2F3 y la regulación que ejerce sobre *BIRC5*, a su vez sobreexpresado en el LPB, se investigó su valor como dianas terapéuticas. Se realizó una búsqueda bibliográfica de los inhibidores disponibles contra estas dianas. Dado que se encontró un inhibidor específico de E2F3, y la relevancia de los E2F en la patogénesis del LPB, se seleccionó el anti-E2F, HLM006474 (H). Del amplio espectro de inhibidores diseñados contra survivina, se seleccionó S12 (S), el cual inhibe la dimerización de la survivina.

5.6.1. Evaluación del efecto antitumoral de HLM006474 y S12 *in vitro*

En primer lugar, se determinó la concentración inhibitoria media (IC₅₀) de cada inhibidor en las células PBL-1 (**Figura 45**).

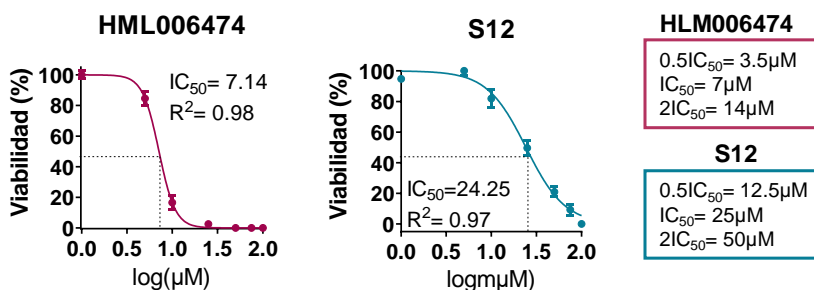


Figura 45. IC₅₀ de los inhibidores HLM006474 y S12. Pie de figura en la siguiente página.

Figura 45. IC₅₀ de los inhibidores HLM006474 y S12. Ambas figuras muestran el logaritmo de la concentración (μM ; eje X) y el porcentaje de viabilidad (eje Y) de HLM006474 (izquierda) y S12 (derecha). Se indica el valor R² de la curva y el valor redondeado establecido como IC₅₀. A la derecha se indican las concentraciones de la IC₅₀, así como la mitad y el doble de esta concentración para cada inhibidor.

Se analizó el efecto de estos inhibidores individualmente y en combinación (H+S) en las células PBL-1. Con la finalidad de evaluar un efecto dosis-dependiente de los inhibidores se usaron 3 concentraciones distintas, la mitad de la dosis IC₅₀ (0.5IC₅₀), la dosis IC₅₀ y el doble de la dosis IC₅₀ (2IC₅₀; **Figura 46**). Los tratamientos con H y H+S redujeron los niveles de E2F3 en las células PBL-1 (**Figura 46**). Tanto H como S en monoterapia o en combinación disminuyeron los niveles de survivina (**Figura 46**).

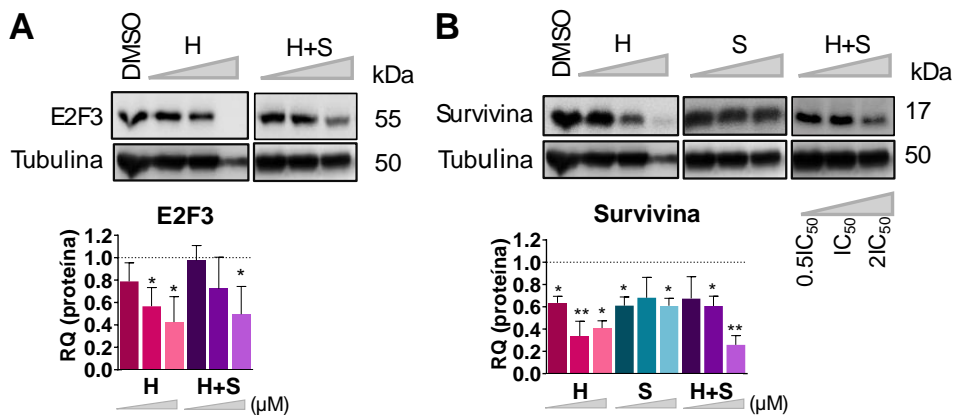


Figura 46. Inhibición de E2F3 y survivina en las células PBL-1. Imágenes de Western blot representativas de E2F3 (**A**) y survivina (**B**) en las células PBL-1 tratadas con dosis crecientes (0.5IC₅₀, IC₅₀, 2IC₅₀) de los inhibidores HLM006474 (H), S12 (S) y de la combinación de ambos (H+S). Las células se trataron con DMSO como grupo control (arriba). Las cuantificaciones de las proteínas se normalizaron respecto a β -tubulina (abajo). Las barras representan la expresión relativa de las proteínas E2F3 (**A**) y survivina (**B**) en las células tratadas con los inhibidores H (rosas), S (azules) y H+S (lilas), respecto a las tratadas con DMSO (valor = 1). Se representa la media \pm SEM de triplicados biológicos. La significancia estadística se calculó mediante el t-test comparando cada tratamiento respecto al DMSO, *p < 0.05.

Se valoró la efectividad de los inhibidores en la viabilidad celular, apoptosis, progresión del ciclo celular y proliferación. Los 3 tratamientos produjeron un efecto citotóxico en las células PBL-1, induciendo un aumento de la apoptosis y reduciendo

Resultados

la viabilidad celular de manera dosis-dependiente, siendo mucho más sensibles al tratamiento con la 2IC₅₀ de la combinación H+S (Figuras 47A, 50). Como era de esperar, el anti-E2F produjo un arresto de las células en la fase G1 mientras que el anti-survivina arrestó las células en las fases G2/M del ciclo celular (Figuras 47B, 49). Aunque no se observó un efecto acumulativo al aumentar la dosis de la combinación de los inhibidores, parece que este tratamiento incrementa el número de células en fase G1, de manera similar al inhibidor H. A su vez, los 3 tratamientos inhibieron la proliferación celular, siendo más efectivo el inhibidor S y apreciándose un efecto sinérgico en la combinación entre ambos inhibidores (Figura 48C).

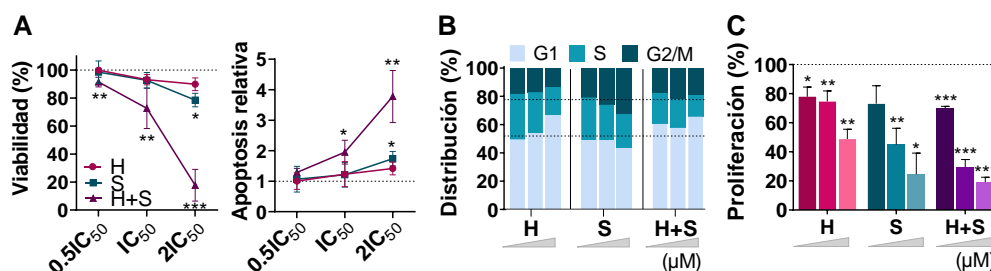


Figura 47. Efectos biológicos de HLM006474 (H) y S12 (S) en PBL-1. A. El impacto de los inhibidores H (rosa), S (verde) y H+S (lila) en la viabilidad y apoptosis se evaluó mediante citometría de flujo con la tinción con anexina V/TO-PRO-3 a las 24h del tratamiento. Porcentaje de células viables (anexina V^{neg}/TO-PRO-3^{neg}) normalizado respecto al grupo control (DMSO= 100%), a la izquierda. Proporción de células apoptóticas, incluyendo apoptóticas tempranas (anexina V^{pos}/TO-PRO-3^{neg}) y apoptóticas tardías (anexina V^{pos}/TO-PRO-3^{pos}), a la derecha. B. Distribución media de las células en las fases del ciclo celular evaluado a las 24h del tratamiento mediante la tinción intracelular de TO-PRO-3 y citometría de flujo. Las líneas discontinuas representan las distribuciones medias del grupo tratado con DMSO (100%). C. Proliferación relativa normalizada respecto a las células tratadas con DMSO (100%). Cada barra representa la media ± SEM de triplicados biológicos. Los triángulos representan el aumento de concentración de los inhibidores (0.5IC₅₀-IC₅₀-2IC₅₀). Significación estadística *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; t-test, comparando cada tratamiento respecto al DMSO.

Ya que el inhibidor H no es específico de E2F3 sino de la familia de E2F, se comprobó si E2F3 pudiera inducir resistencia frente a estos tratamientos, administrándolos en las células *E2F3*^{mut}. No se percibieron diferencias en cuanto a la citotoxicidad y arresto del ciclo celular en fase G1 al tratar las células *E2F3*^{mut} con H en comparación a las células WT (Figuras 50A-B), aunque parece aumentar sutilmente la inhibición de la proliferación de H a la dosis IC₅₀ (Figura 50C).

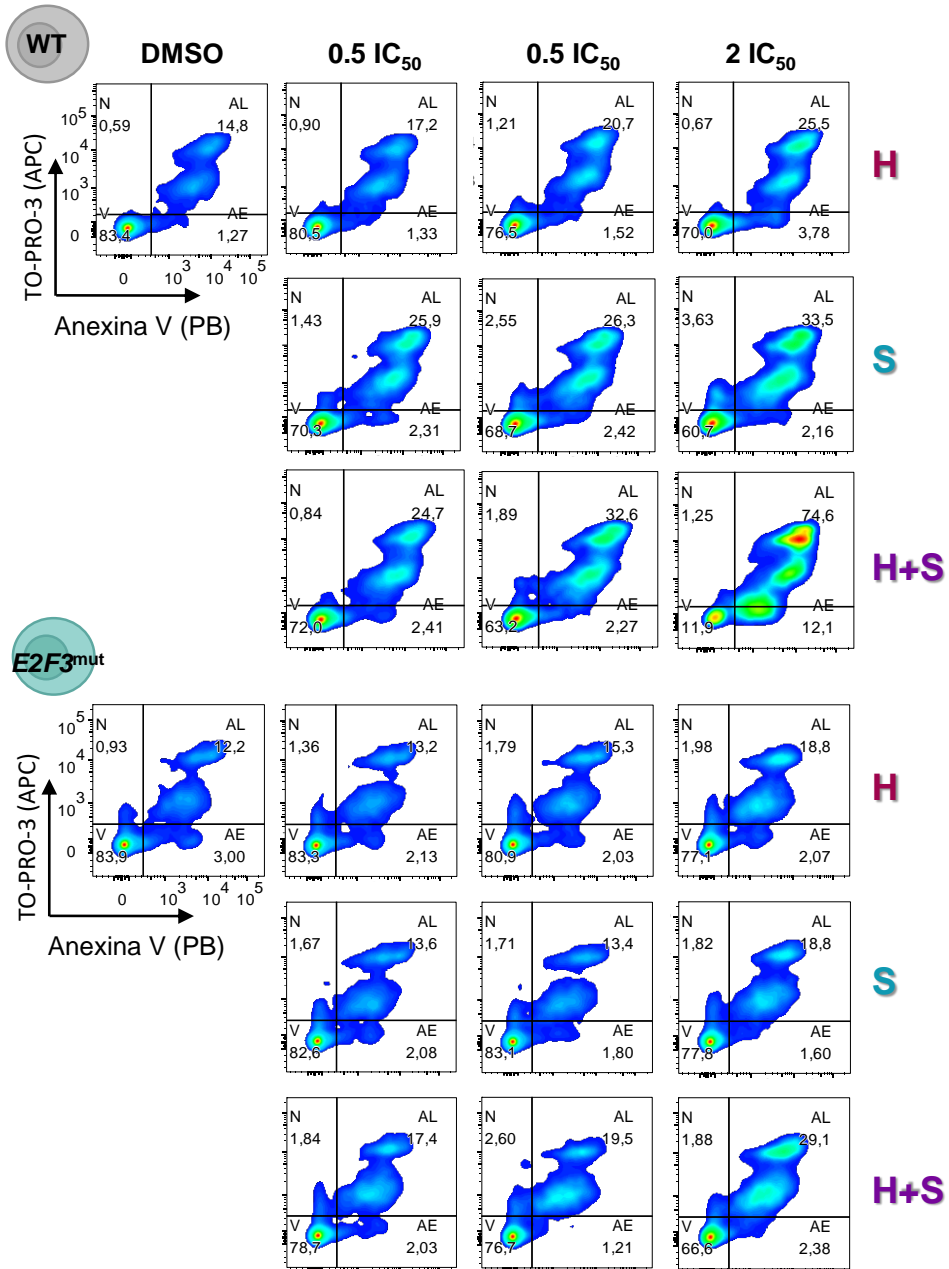


Figura 48. Efecto de HLM006474 y S12 en la apoptosis en PBL-1 WT y *E2F3^{mut}*. Imágenes de citometría de flujo del marcaje de las células con anexina V (*pacific blue*)/TO-PRO-3 (APC); células viables (abajo-izquierda), apoptóticas tempranas (abajo-derecha), apoptóticas-tardías (arriba-derecha) y necróticas (arriba-izquierda). Se incluyen las imágenes de tres dosis diferentes de HLM006474 (H), S12 (S) o la combinación (H+S), incluyendo las dosis 0.5IC₅₀, IC₅₀ y 2IC₅₀ en células WT (arriba) y células *E2F3^{mut}* (abajo). Se utilizó DMSO como grupo de control.

Resultados

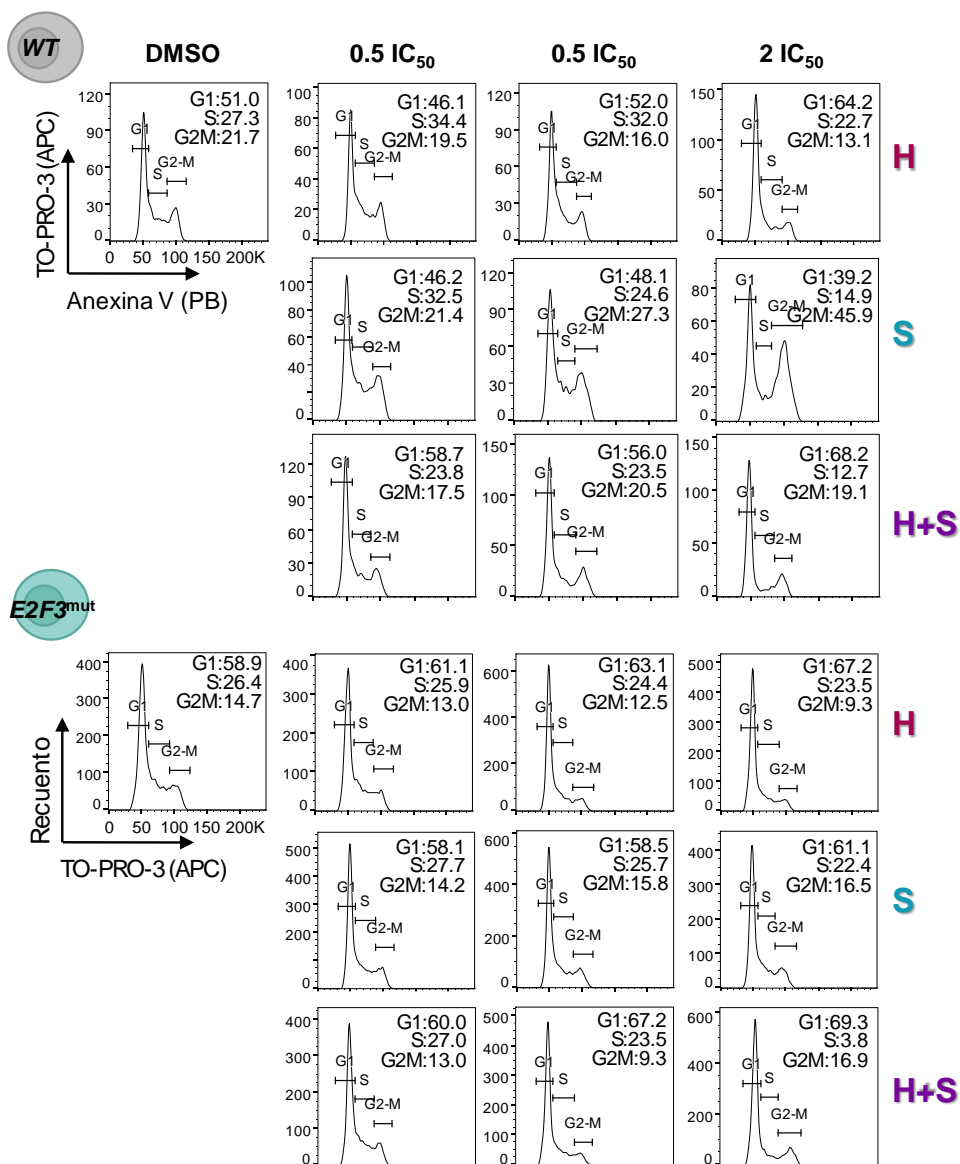


Figura 49. Efecto de HLM006474 y S12 en la progresión del ciclo celular en PBL-1 WT y E2F3^{mut}. Imágenes de citometría de flujo del marcaje con TO-PRO-3 (APC) de las células permeabilizadas. En cada gráfico, se separan tres fases diferentes del ciclo celular, incluida la fase G1 (primer pico), G2-M (segundo pico) y la fase S (que queda entre ambos picos). Se incluyen las imágenes de tres dosis diferentes de HLM006474 (H), S12 (S) o la combinación (H+S), incluyendo las dosis 0.5IC₅₀, IC₅₀ y 2IC₅₀ en células WT (arriba) y células E2F3^{mut} (abajo). Se utilizó DMSO como grupo de control.

La combinación de los tratamientos exhibió una clara disminución de la citotoxicidad y del efecto anti-proliferativo en estas células (**Figuras 50A, 50C, 48**).

Sin embargo, se observó una ligera pérdida de efectividad del tratamiento con S, tanto en la inducción de la apoptosis, como en el arresto de las células en G2 y la inhibición de la proliferación en las células *E2F3^{mut}* (**Figuras 50A-B, 48, 49**).

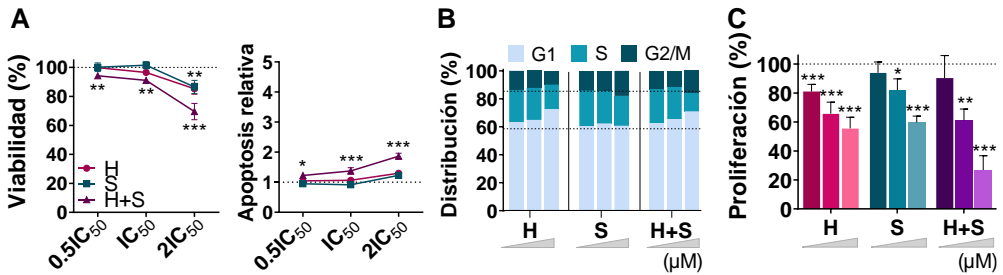


Figura 50. Efectos biológicos de los inhibidores HLM006474 (H) y S12 (S) en PBL-1 *E2F3^{mut}*. **A.** El impacto de los inhibidores H (rosa), S (verde-azul) y H+S (lila) en la viabilidad y apoptosis se evaluó mediante citometría de flujo a las 24h del tratamiento con la tinción con anexina V/TO-PRO-3. Porcentaje de células viables (anexina V^{neg}/TO-PRO-3^{neg}) normalizado respecto al grupo control (DMSO= 100%), a la izquierda. Proporción de células apoptóticas, incluyendo apoptóticas tempranas (anexina V^{pos}/TO-PRO-3^{neg}) y apoptóticas tardías (anexina V^{pos}/TO-PRO-3^{pos}), a la derecha. **B.** Distribución media de las células en las fases del ciclo celular evaluado a las 24h del tratamiento mediante la tinción intracelular de TO-PRO-3 y citometría de flujo. Las líneas discontinuas representan las distribuciones medias del grupo tratado con DMSO. **C.** Proliferación relativa normalizada respecto a las células tratadas con DMSO (100%). Cada barra representa la media ± SEM de triplicados biológicos. Los triángulos representan el aumento de concentración de los inhibidores (0.5IC₅₀-IC₅₀-2IC₅₀). Significación estadística *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; t-test, comparando cada tratamiento respectivo al DMSO.

5.6.2. Evaluación del efecto antitumoral de HLM006474 y S12 *in vivo*

Para validar el efecto anti-tumoral de dichos inhibidores en el LPB, se probaron en el modelo *in vivo* de xenoinjerto en las MCA. El estudio se realizó del mismo modo que ilustra la **Figura 17**, administrando los días 12 y 14 los tratamientos H, S y H+S (IC₅₀). Se valoró si los tratamientos afectaban al peso del huevo y el embrión, los resultados mostraron una disminución del peso de los huevos con el tratamiento H+S en el modelo de xenoinjerto WT, así como con el tratamiento con H el D14 en el modelo de xenoinjerto *E2F3^{mut}*, que se recuperó el D16 (**Figura 51A**). Para cuantificar los cambios de peso de los embriones con los tratamientos, éstos se normalizaron respecto al peso del huevo, ambos al fin del tratamiento (D16). Aunque se apreció una ratio de pesos significativamente superior con el tratamiento H+S en ambos

Resultados

modelos en comparación al resto de condiciones, este aumento se puede atribuir a la disminución de peso de los huevos (**Figura 51B**). En cambio, la reducción de la proporción de los pesos en el modelo $E2F3^{mut}$ tratado con H fue debido a una pérdida de peso de los embriones, sugiriendo que podría tener un efecto citotóxico en este modelo (**Figura 50B**). El tratamiento con la combinación H+S detuvo significativamente el crecimiento tumoral en los xenoinjertos PBL-1 WT mientras que no afectó a los $E2F3^{mut}$ (**Figura 50C**). Además, la monoterapia con H disminuyó significativamente el peso tumoral en el modelo MCA $E2F3^{mut}$, aunque no logró desencadenar una reducción visible del tumor en el grupo WT.

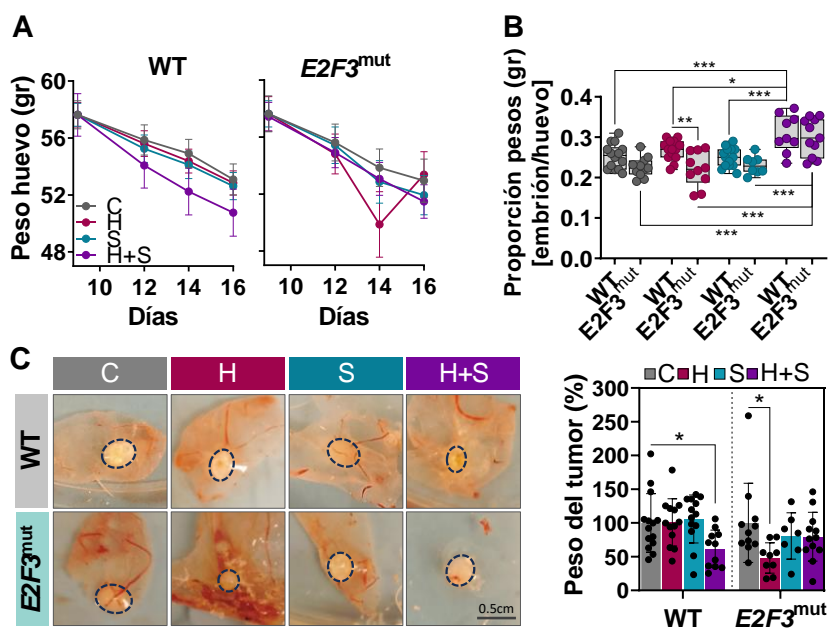


Figura 51. Tumores generados en el modelo de xenoinjerto de MCA. **A.** Peso relativo de los huevos (gr) por días en los WT (n=15/grupo, izquierda) y $E2F3^{mut}$ (n=12/grupo, derecha), normalizado respecto al peso a día 9 del modelo WT. **B.** Proporción de pesos en gr (embrión/huevo) el día 16 en el modelo WT (n=13/grupo) y $E2F3^{mut}$ (n=11/grupo). **C.** Imágenes representativas de los tumores generados por las células PBL-1 WT y $E2F3^{mut}$ el día 16 del desarrollo embrionario con los distintos tratamientos, izquierda. Media \pm SEM del porcentaje de peso relativo del tumor (n=7-14 CAM/grupo) normalizado respecto a la media del peso del grupo respectivo de cada tipo de xenoinjerto, derecha. Todas las figuras representan los tratamientos a la dosis IC₅₀ de HLM006474 (granate), S12 (azul), la combinación de ambos inhibidores (lila) y las células no tratadas, como control (gris). Significancia estadística *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001; test de comparaciones múltiples de Dunn.

De acuerdo con los resultados obtenidos *in vitro*, tanto el tratamiento H como S condujeron a una reducción de la proliferación de las células PBL-1 WT *in vivo*, que fue más acentuada con la combinación H+S (**Figuras 52, 53**). De nuevo, el análisis de las células CD138+ presentes en el tumor, confirmó que la combinación H+S reduce la cantidad de células de LPB respecto al grupo control (**Figura 55**). La combinación H+S también inhibió la proliferación en los tumores $E2F3^{mut}$, no obstante, debido a la considerable pérdida de la capacidad proliferativa de estas células en comparación a $E2F3^{WT}$ (**Figuras 53, 54**) el efecto anti-tumoral de los inhibidores no pudo ser bien evaluado en dichas células.

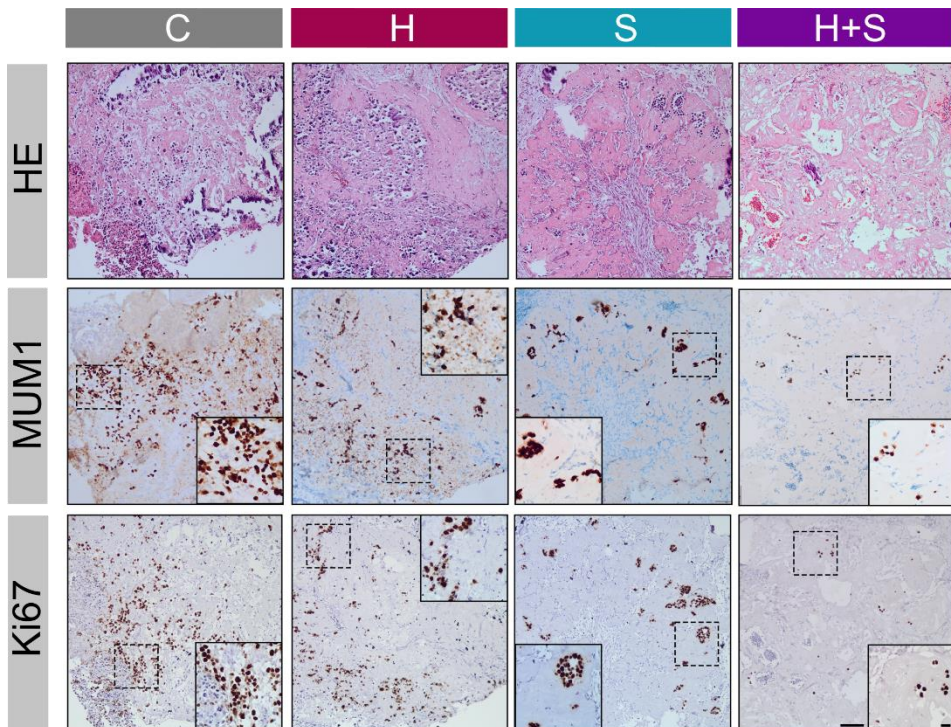


Figura 52. Proliferación de los tumores en el modelo MCA PBL-1 WT. Las imágenes muestran las tinciones de hematoxilina-eosina y las inmunohistoquímicas de MUM1 y Ki67 en cortes de 4 μ m de las biopsias de los tumores formados en la MCA por las células PBL-1 WT. Escala de la barra: 20 μ m (imagen pequeña), 100 μ m (imagen grande).

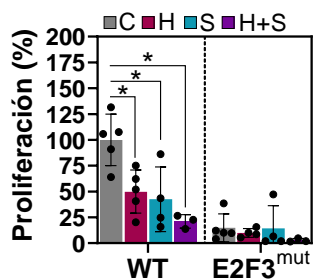


Figura 53. Proliferación relativa de las células PBL-1 WT y $E2F3^{mut}$ en los tumores generados en el modelo de xenoinjerto de MCA. Proliferación relativa de las células PBL-1 WT y $E2F3^{mut}$ en los tumores no tratados (C) y tratados con HLM006474 (H), S12 (S) o la combinación de ambos tratamientos (H+S), normalizado respecto al grupo control de las células WT (n=5 CAM/grupo). Cada barra representa media \pm SEM. Significación estadística *p < 0.05, ** < 0.01; test de Mann-Whitney.

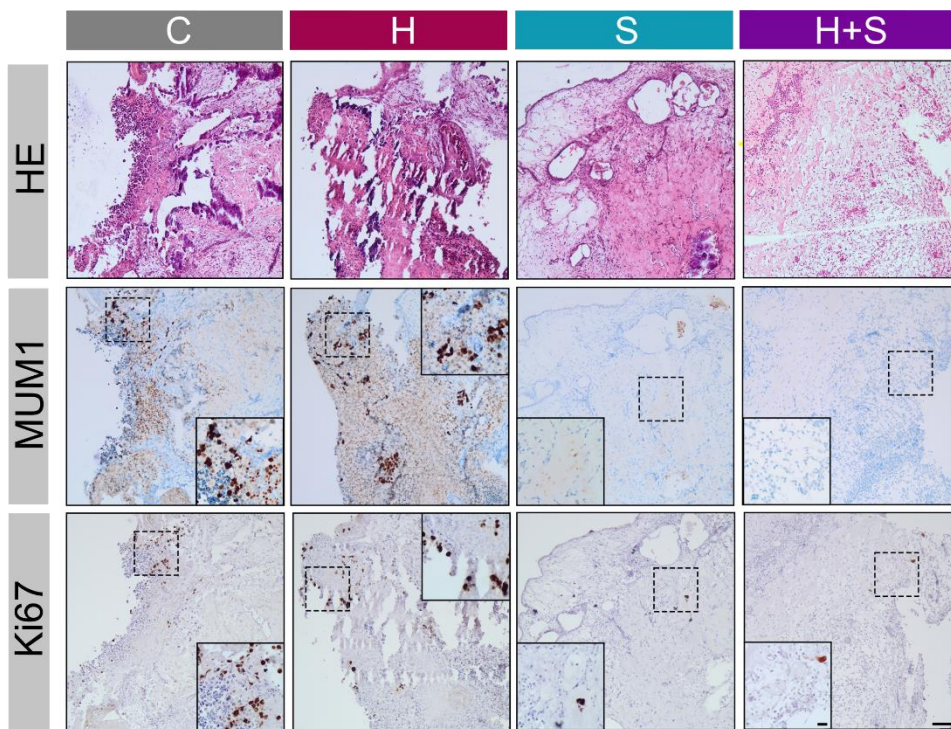


Figura 54. Proliferación de los tumores en el modelo MCA PBL-1 $E2F3^{mut}$. Las imágenes muestran las tinciones de hematoxilina-eosina y las inmunohistoquímicas de MUM1 y Ki67 en cortes de 4 μ m de las biopsias de los tumores formados en la MCA por las células PBL-1 $E2F3^{mut}$. Escala de la barra: 20 μ m (imagen pequeña), 100 μ m (imagen grande).

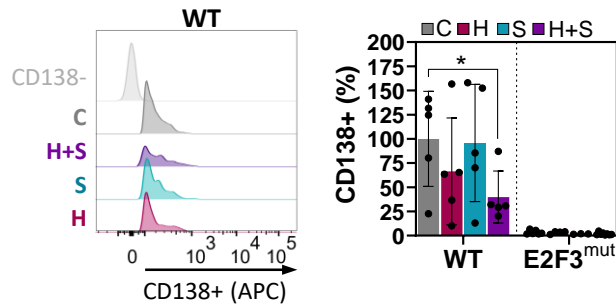


Figura 55. Células PBL-1 presentes en los tumores del modelo MCA. Recuento de células PBL-1 WT en los tumores analizado mediante citometría de flujo a partir del marcaje con CD138 (APC), izquierda. Se representan las curvas de las células CD138- (primera fila) y las células CD138+ representativas de los tumores no tratados (C) y tratados con HLM006474 (H), S12 (S) o la combinación de ambos tratamientos (H+S) [n=5 CAM/grupo]. Porcentaje de células CD138+ en los tumores MCA PBL-1 WT y *E2F3*^{mut} (n= 5 CAM/grupo), normalizado respecto al grupo control WT, derecha. Cada barra representa la media \pm SEM. Significación estadística *p < 0.05; t-test.

5.7. MYC y E2F3 en la diferenciación del LPB

Se sabe que *MYC* es un gen crucial en la regulación del centro germinal y una pérdida de *E2F3* desencadena alteraciones en la diferenciación celular en diferentes tejidos(235). Es por ello por lo que se hipotetizó que estos promotores de la linfomagénesis podrían ser relevantes en la diferenciación de las células del LPB. Se vio que las células PBL-1 *E2F3*^{mut} mostraban un tamaño celular (FSC) y una complejidad (SSC) inferior que las células WT, sugiriendo que *E2F3* podría influir en la diferenciación de los plasmablastos. En cambio, no se vieron prácticamente diferencias entre las células PBL-1 *MYC*^{KO} y WT (**Figura 56A**). Se analizó la correlación entre las expresiones de *E2F3* y *MYC* con diversos marcadores de CP (*SDC1/CD138*, *CD38*, *PRDM1/MUM1*, *NCAM1/CD56*) y de células B (*CD79B*, *CD19*, *CD20*, *PAX5*). Este análisis confirmó una correlación inversa entre *E2F3* y *MYC* con los marcadores de célula B, *CD79B* (p= 0.003; 0.02), *CD19* (p=2.7·10⁻⁷; 9.6·10⁻⁶), *CD20* (p=1.4·10⁻⁷; 3.7·10⁻⁵), *PAX5* (p=0.001; 8.3·10⁻⁶), respectivamente, así como una correlación directa entre *E2F3/PRDM1* (p=0.03) y *CD138/MYC* (p=0.002; **Figura 56B**) de manera significativa. Estos

Resultados

resultados apuntan a que E2F3 y MYC podrían regular la diferenciación de las células tumorales de este linfoma.

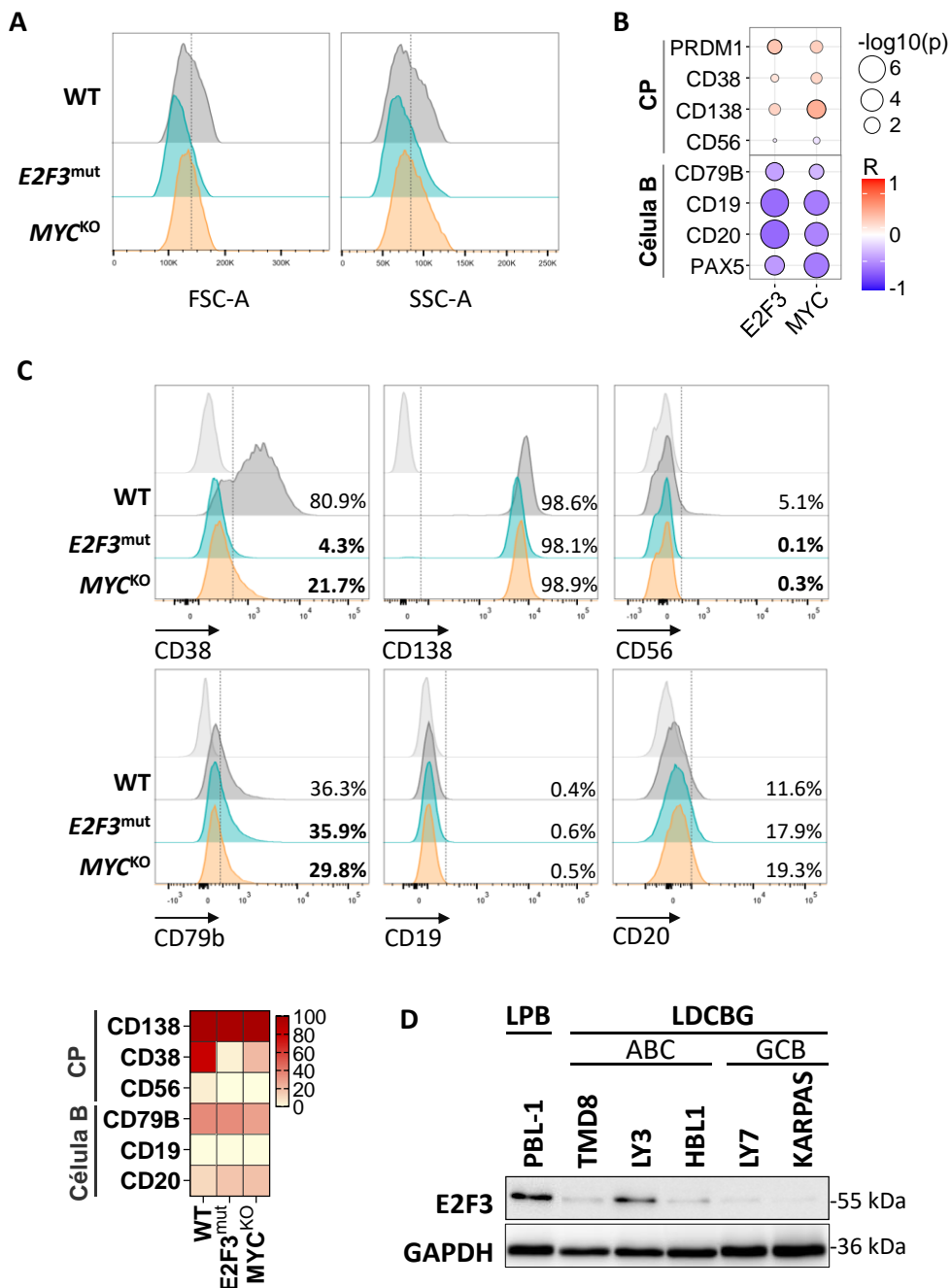


Figura 56. E2F3 y MYC en la diferenciación de los plasmablastos. Pie de figura en la siguiente página.

Figura 56. E2F3 y MYC en la diferenciación de los plasmablastos. **A.** Histogramas mostrando FSC y SSC de las células WT (gris), *E2F3*^{mut} (verde) y *MYC*^{KO} (naranja). La barra representa la mitad del pico de las células WT. **B.** Correlación de Spearman entre la expresión de *E2F3* y *MYC* con marcadores de CP (*PRDM1*, *CD38*, *CD138*, *CD56*) y célula B (*CD79B*, *CD19*, *CD20*, *PAX5*). El tamaño del círculo y el color representan el $-\log_{10}(\text{p-valor})$ y el valor de correlación R, respectivamente. **C.** Histogramas de la expresión de los marcadores de superficie de CP (*CD38*-PB, *CD138*-APC, *CD56*-APC-A750) y de células B (*CD79B*-PC5.5, *CD19*-ECD, *CD20*-PC7) analizados por citometría de flujo en las células WT (gris oscuro), *E2F3*^{mut} (verde) y *MYC*^{KO} (naranja). Las células negativas para cada marcador (gris claro) se muestran a la izquierda de la línea discontinua, mientras que se indica el porcentaje de células positivas a lado derecho de la línea. El mapa de color de abajo-izquierda representa el porcentaje de expresión de los marcadores, representándose en marrón-rojo y amarillo los marcadores con mayor y menor expresión de los marcadores, respectivamente. **D.** Imagen de Western blot de la expresión de *E2F3* y *GAPDH* en la línea PBL-1 y las líneas de LDCBG-ABC (TMD8, LY3, HBL1) y de LDCBG-GBC (LY7, KARPAS).

Para confirmar la asociación de estos FTs con la diferenciación de las células del LPB, se analizaron por citometría de flujo los marcadores de superficie de CP (*CD38*, *CD138*, *CD56*) y de célula B (*CD79B*, *CD19* y *CD20*) en las células PBL-1 WT, *E2F3*^{mut} y *MYC*^{KO}. Las células *MYC*^{KO}, y especialmente las células *E2F3*^{mut}, perdieron drásticamente la expresión de *CD38* (59% y 77%, respectivamente) y también se observó una reducción de aproximadamente el 5% del marcador de células plasmáticas aberrantes *CD56*, respecto a las células WT (**Figura 56C**). Por el contrario, se observó un aumento de expresión de *CD20* en las células *E2F3*^{mut} (6%) y *MYC*^{KO} (7.4%). Curiosamente, el 36% de las células WT expresaron el marcador de célula B *CD79b*, cuya expresión se redujo un 7% en las células *MYC*^{KO} (**Figura 56C**). Estos datos demuestran que la pérdida de *E2F3* y *MYC* afecta a la diferenciación de las células de LPB.

Por otro lado, se evaluó si la expresión de *E2F3* en líneas celulares de LDCBG tanto GCB como ABC para evaluar la oscilación de la expresión en diferentes estadios madurativos de la célula B en el centro germinal. Todas las líneas de LDCBG presentaron una marcada infraexpresión de *E2F3* independientemente de las células de origen en comparación con las células de LPB (**Figura 56D**). Estos resultados invitan a pensar que *E2F3* podría estar implicado en la diferenciación final de las células B tras la activación de las células B.

5.8. Estudios de metilación del ADN

Dado que por el momento no han sido descritas las alteraciones epigenéticas en el LPB, se llevó a cabo un estudio de metilación del ADN con el objetivo de explorar cómo afecta la metilación del ADN a la expresión génica en este linfoma. Para ello, se incluyeron 43 LPB (42 casos de LPB y la línea celular PBL-1) y 6 controles.

El análisis diferencial reveló un metiloma diferente entre los LPBs y los controles, con más heterogeneidad observada en el grupo de LPB. Además, la línea PBL-1 denotó un perfil similar al grupo LPB tal y como representa el análisis de PCA (**Figura 57A**). Dicho análisis reveló 57301 CpGs diferencialmente metilados (CDMs), 53059 hipometilados y 4242 hipermetilados ($\Delta\beta > |0.33|$, $p\text{-adj.} < 0.05$). La mayoría de las CpGs hipometiladas se localizaron en *open sea* (82.22%), en cambio las CpGs hipermetiladas mostraron una localización mayoritaria en las islas CpG y en menor medida en *open sea* (52.19% y 29.44%, respectivamente; **Figura 57B**). Respecto a la localización en referencia al gen, tanto las CpGs hipo como hipermetiladas se localizan mayoritariamente en el cuerpo del gen. En cuanto a las regiones promotoras, las CpGs hipometiladas mostraron mayor frecuencia en las regiones TSS1500 y 5'UTR en comparación con las hipermetiladas que presentaron mayor frecuencia en el 1^{er} exón y TSS200 (**Figura 57C**).

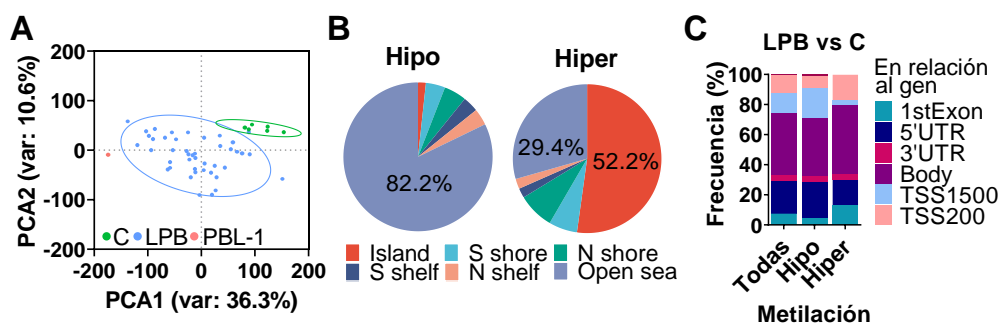


Figura 57. Perfil de metilación de los LPBs comparado con los controles. **A.** PCA mostrando la varianza del perfil de metilación del ADN entre la línea celular PBL-1 (rosa), casos de LPB (azul) y controles (verde). **B.** Localización de las CDMs entre LPB y controles ($\Delta\beta > |0.33|$, $p\text{-adj.} < 0.05$) en relación con la isla CpG, incluyendo las CpGs hipo e hipermetiladas. **C.** Localización de las CDMs en relación con las regiones del gen, incluyendo todas las CDMs, las hipo e hipermetiladas.

Según las CDMs localizadas en las islas, se establecieron 3 grupos de muestras (C1-C3) con perfiles de metilación diferenciales, incluyendo 1 grupo de controles (C1) y 2 grupos de LPBs (C2-3; **Figura 58A**).

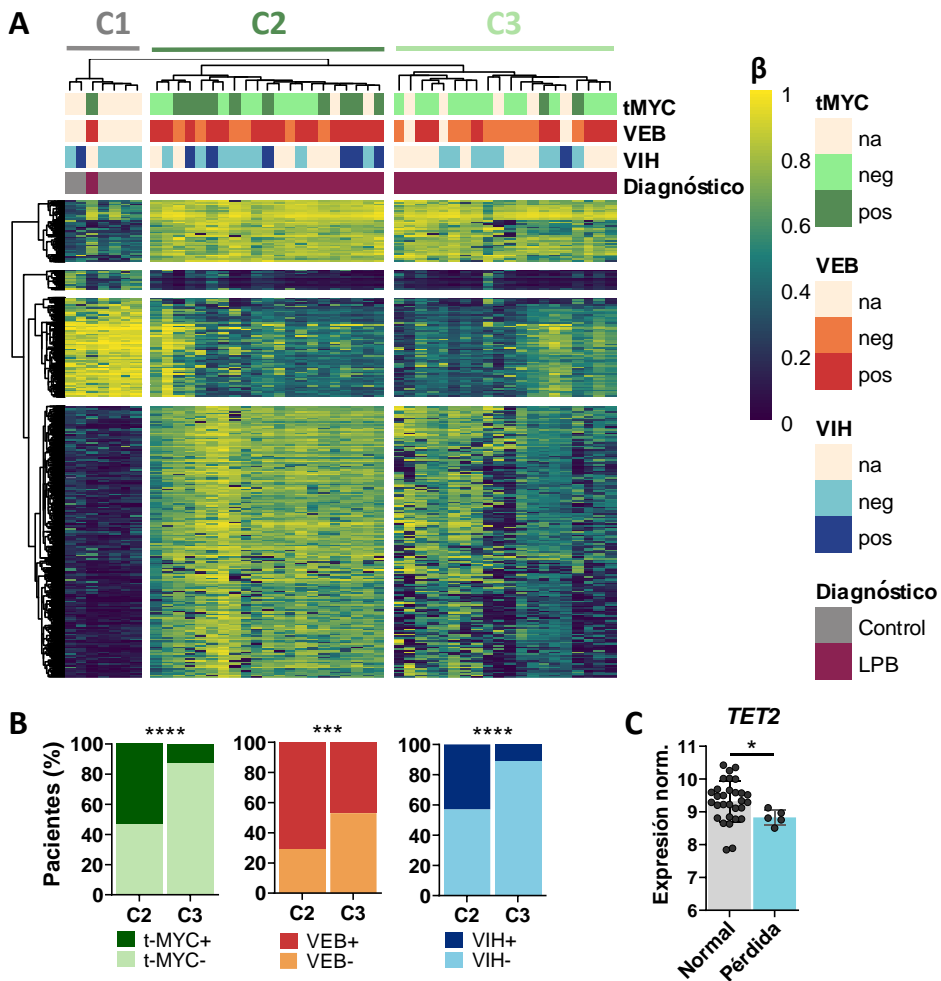


Figura 58. Subgrupos de LPB en base a las CDMs. **A.** Mapa de color de las CDMs ($\Delta\beta > |0.33|$, $p\text{-adj.} < 0.05$) localizadas en las islas comparando los LPBs vs los controles. El color indica el valor de metilación β y la figura representa la jerarquización por CDMs (filas) y por muestras (columnas). En la parte superior se clasifican las muestras, de arriba a abajo, según t-MYC, infección por el VEB, infección por el VIH y diagnóstico. El significado de cada color se muestra en la leyenda a la derecha. **B.** Asociación entre los grupos de LPB según el perfil de metilación del ADN con la t-MYC y las infecciones del VEB y VIH. **C.** Expresión de *TET2* en los pacientes con (azul) y sin (gris) pérdida de copia del gen. Significancia estadística, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$; test exacto de Fisher (B) y test de Mann-Whitney (C).

Resultados

Asimismo, las CDMs se agruparon en 4 conjuntos según los valores de metilación β . El conjunto que incluía más CDMs mostró hipermetilación en el grupo de LPB C2 en comparación al grupo C1, mientras que el grupo de LPBs C3, valores de metilación intermedios. Además, se evaluó si el perfil de metilación del LPB difería en base a alguno de los 3 parámetros asociados a la etiopatogenia de este linfoma descritos al inicio del trabajo. Curiosamente, el C3 se asoció mayoritariamente a pacientes sin infección por el VIH y con ausencia de t-MYC, mientras que en el C2 la frecuencia de pacientes positivos para ambos parámetros aumentó (**Figura 58B**). Asimismo, los pacientes con la infección del VEB en las células tumorales también fueron más frecuentes en el C2. Por otro lado, se confirmó que aquellos pacientes con pérdida de *TET2*, según el estudio de Frontzek et al.(284), presentaban niveles reducidos de expresión de este gen (**Figura 58C**). Por lo tanto, la pérdida de *TET2* podrían conducir al incremento de marcas de metilación en las islas CpG apreciado en el LPB.

Con el objetivo de evaluar la implicación de *MYC* y el VEB en las modificaciones epigenéticas, se estudió la expresión de los genes *DNMT* y *TET* comparando en los LPBs los casos positivos y negativos para cada parámetro respecto a los controles, de manera independiente. No se consideró para dicho análisis la infección por el VIH ya que este dato fue ausente para muchos de los pacientes y es probable que la frecuencia de pacientes VIH-positivos variase entre los grupos C2 y C3. Según este análisis, *DNMT3A*, *DNMT3B* y *TET1* mostraron una expresión diferencial en los LPBs respecto a los controles, alcanzando una mayor sobreexpresión de *DNMT3B* en los LPB t-MYC-positivos respecto a los controles que los t-MYC-negativos (Log_2FC : 5.26 vs 3.27; **Figura 59A**). De hecho, los casos t-MYC-positivos presentaron sobreexpresión de *DNMT3B* respecto a los t-MYC-negativos ($p=1.09 \cdot 10^{-6}$; **Figura 59B**). Además, analizando la correlación entre la expresión de *MYC* y los reguladores de la metilación del ADN, se confirmó que los niveles de *DNMT3B* aumentan a la vez que aumenta la expresión de *MYC* ($p= 2 \cdot 10^{-7}$; **Figura 59BC**). También se contempló una correlación positiva con *TET1* ($p= 0.001$) y una correlación inversa con *DNMT3A*

($p = 2.5 \cdot 10^{-5}$; **Figura 59C**). Conjuntamente, estos datos sugieren que MYC podría potenciar la metilación del ADN mediante la activación de *DNMT3B*.

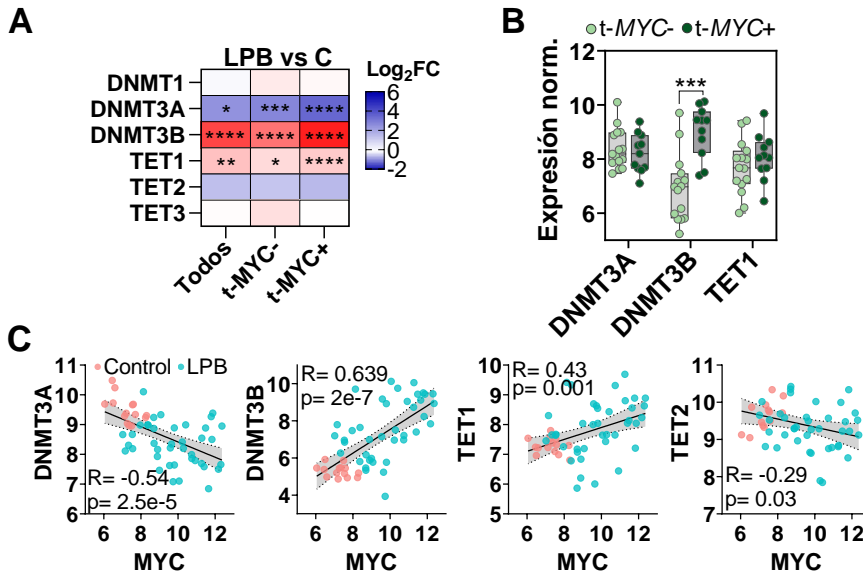


Figura 59. Implicación de MYC en la regulación de la metilación en el LPB. **A.** Expresión diferencial de *DNMTs* y *TETs* comparando todos los LPBs, LPB t-MYC-negativos y LPB t-MYC-positivos con los controles. El color representa el log₂FC, incluyendo los genes sobreexpresados (rojo) e infraexpresados (azul) y los asteriscos representan el p-adj. **B.** Expresión normalizada de *DNMT3A/B* y *TET1* en los LPB t-MYC-negativos (verde claro) y t-MYC-positivos (verde oscuro). **C.** Correlaciones entre *MYC* y *DNMT3A*, *DNMT3B*, *TET1*, *TET2*. Los puntos rosa y azules representan los controles y los LPBs, respectivamente. Significancia estadística * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; test de Mann-Whitney (B); test de Spearman (C).

Por otro lado, se realizó el mismo tipo de análisis considerando la infección del VEB en las células del LPB. Cabe destacar que todas las CDMs en los casos LPB VEB-positivos evidenciaron un patrón de hipermetilación, mientras que no se detectaron CDMs hipometiladas (**Figura 60A**). De nuevo, se analizaron las expresiones de *DNMTs* y *TETs* comparando LPB totales, LPB VEB-positivos y LPB VEB-negativos respecto a los controles. Se observaron sobreexpresiones de *DNMT3B* y *TET1*, así como infraexpresiones de *DNMT3A* en todas las comparaciones (**Figura 60B**). Debido a la hipermetilación apreciada en los LPB VEB-positivos, se evaluaron las expresiones de *DNMTs* y *TETs* en los casos VEB-positivos y VEB-

Resultados

negativos. Sin embargo, no se encontraron diferencias en las expresiones de estos genes entre ambos grupos (**Figura 60C**).

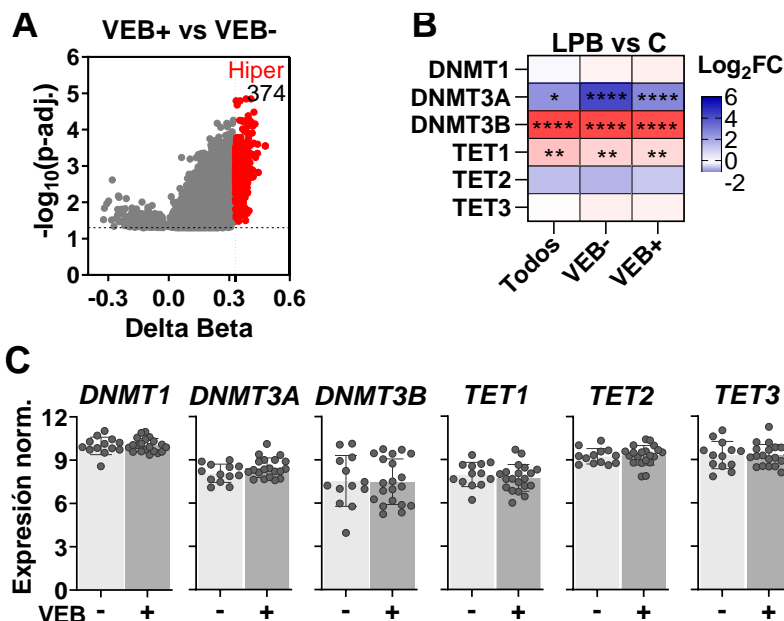


Figura 60. Relación entre la infección del VEB y la metilación en el LPB. **A.** Gráfico Volcano mostrando las CpGs con $-\log_{10}(p\text{-adj.}) > 1.30$ ($p=0.05$). Se representan las CDMs en rojo ($\Delta\beta > |0.33|$) y las CpGs no DM en gris. **B.** Expresión diferencial de *DNMTs* y *TETs* comparando todos los LPB, LPB VEB-negativos y LPB VEB-positivos con los controles. El color representa el \log_2FC , incluyendo los genes sobreexpresados (rojo) e infraexpresados (azul) y los asteriscos representan el p-adj. **C.** Expresión normalizada de los *DNMTs* y *TETs* en los LPB VEB-negativos (gris claro) y VEB-positivos (gris oscuro). Significación estadística calculada mediante test de Mann-Whitney (C, ns para todos los casos).

Finalmente, se examinó cómo el patrón de metilación del ADN influye en la expresión génica en el LPB. Para ello, se realizó un análisis de enriquecimiento considerando las CDMs cuyo patrón de metilación se correlaciona con la expresión génica usando el conjunto de genes GO-BP. Este análisis desveló que la metilación del ADN influye especialmente en la actividad mitocondrial, en la traducción y biosíntesis de las proteínas, así como en la fase de mitosis del ciclo celular y la inhibición de la muerte celular (**Figura 61A**).

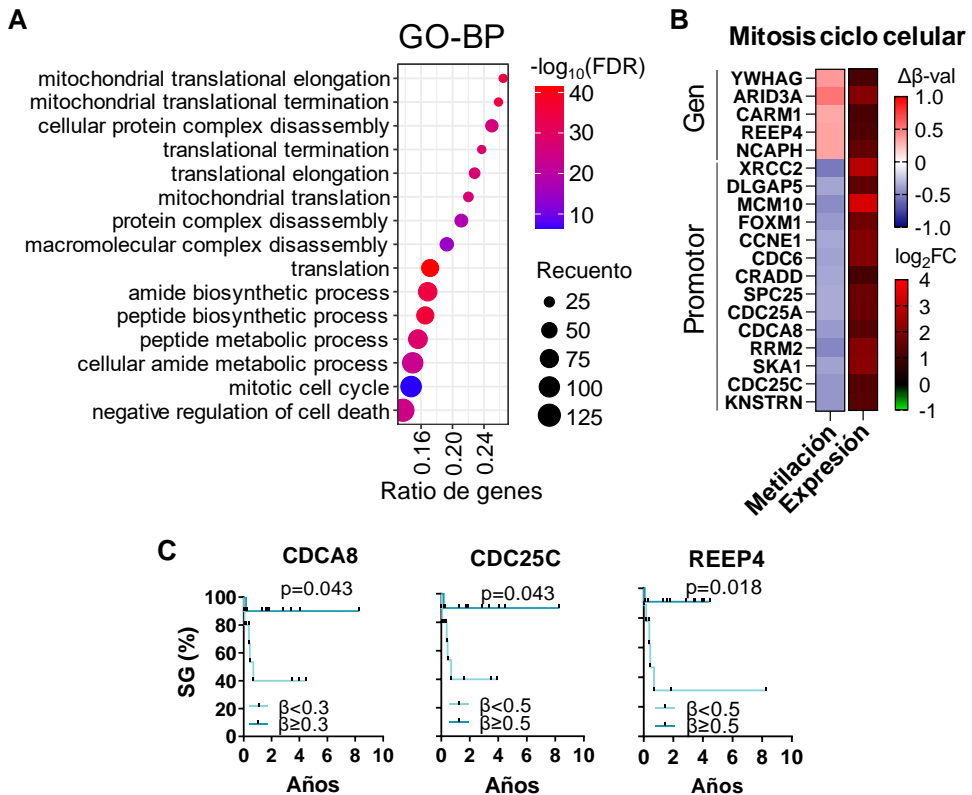


Figura 61. GO-BP enriquecidos en el LPB según el patrón de metilación y la expresión génica. **A.** La figura muestra el análisis realizado con *Genomic Regions Enrichment of Annotations Tool* (GREAT) usando la base de datos GO e incluyendo las CDMs y los GDEs. El color y el tamaño de los puntos ilustran el FDR ($-\log_{10}$) y el recuento de genes, respectivamente. En el eje X se muestra la ratio de genes enriquecidos/genes totales de cada proceso biológico. El color y el tamaño de los puntos ilustran el FDR ($-\log_{10}$) y el recuento de genes, respectivamente. En el eje X se muestra la ratio entre los genes enriquecidos/ los genes del proceso biológico. **B.** Se muestran los genes enriquecidos en la mitosis para los cuales el perfil de metilación conlleva a la sobreexpresión del gen. Se representa la diferencia del valor de metilación β entre LPB vs controles (escala rojo-azul) y la diferencia de expresión génica entre LPB vs controles ($\log_2\text{FC}$; escala rojo-verde). **C.** Curva Kaplan-Meier mostrando los años (X) y la probabilidad de SG (%), (Y) en base al valor β de metilación del ADN de los genes CDCA8, CDC25C y REEP4 (n=10/grupo). Significación estadística, test log-rank (Mantel-Cox).

Centrándose en los genes que regulan la mitosis, de los 103 genes sobreexpresados según dicho análisis, 19 de ellos se consideraron GDEs de acuerdo con los resultados del RNA-seq. La hipometilación de genes en el cuerpo (*YWHAG*, *ARID3A*, *CARM1*, *REEP4*, *NCAPH*) o la hipometilación en la región promotora (*MCM10*, *XRCC2*, *SKA1*, *RRM2*, *CDC6*, *CCNE1*, entre otros) de estos se vinculó con la sobreexpresión de estos en el LPB (**Figura 61B**). A continuación, se evaluó si la

Resultados

metilación de estos genes podría tener un impacto en el pronóstico de los pacientes. Para ello se establecieron como punto de corte las medianas de los valores β de las CpGs para cada gen. Valores β por debajo de la mediana, localizadas en los genes *CDCA8* (cg22449745), *CDC25C* (cg02236244) y *REEP4* (cg16315334) se asociaron a SG inferiores. Estos resultados apuntan a que los cambios en el patrón de metilación del ADN contribuyen a la progresión descontrolada de la mitosis en el LPB con un impacto en el pronóstico de estos pacientes.

6. DISCUSIÓN

El LPB es una neoplasia de célula B grande foco frecuente por lo que la dificultad de reunir cohortes con un número elevado de pacientes limita el estudio de dicho linfoma. Hasta la fecha, Liu et al. han publicado el estudio genético con la serie más amplia de pacientes con LPB, incluyendo exclusivamente aquellos con infección por el VIH (n=110), mientras que Frontzek et al. han reunido la cohorte más grande de LPB independientemente de dicha infección (n=85)(43,56). En cambio, los esfuerzos depositados en describir el perfil de expresión génica del LPB son más bien escasos. Por el momento, únicamente 4 estudios han investigado el transcriptoma del LPB en cohortes que oscilan entre 9 y 20 pacientes(285,43,67,66). Además, las alteraciones epigenéticas mediadas por miARNs únicamente han sido exploradas en un estudio(286). Sin embargo, otras alteraciones epigenéticas como la metilación del ADN, modificaciones de las histonas o remodelación de la cromatina se desconocen actualmente en el dicho linfoma.

Los pacientes con LPB son tratados con pautas de quimioterapia utilizadas en otros linfomas agresivos, la mayoría basada en el esquema CHOP. Sin embargo, este tratamiento resulta inefectivo en muchos de los casos de LPB(35,37,90). Dada la falta de un tratamiento dirigido de manera específica contra el LPB y la agresividad del linfoma, el pronóstico de los pacientes sigue siendo realmente desfavorable(35,52,91,287). No obstante, la descripción de alteraciones genéticas presentes en el LBP, ha permitido identificar vías de señalización con un funcionamiento alterado, las cuales implican a genes que podrían ser potenciales dianas terapéuticas(43,56,66,67,71). A partir de estos trabajos, algunos análisis funcionales llevados a cabo en modelos *in vitro* de LPB han tratado de demostrar el efecto terapéutico beneficioso de determinados fármacos o inhibidores no aplicados a la práctica clínica(39,56,95).

Ante este escenario, esta tesis doctoral ha tenido como objetivo avanzar en 2 aspectos importantes de la investigación traslacional en el LPB, prácticamente desconocidos por el momento. Por un lado, profundizar en el estudio de las alteraciones en la expresión génica y por otro, explorar las alteraciones epigenéticas asociadas a la desregulación transcriptómica que desencadenan la formación del

Discusión

LPB. Con la integración de estos estudios, los esfuerzos se han destinado a determinar procesos celulares alterados en el LPB, no descritos hasta la fecha, identificar posibles promotores de la enfermedad, así como a proponer nuevas estrategias terapéuticas.

6.1. Cohorte de estudio

Por lo que respecta a los datos clínicos de los pacientes, un 36% de ellos tenía infección por el VIH cuando se les diagnosticó el LPB, un porcentaje bajo respecto a lo que se ha descrito previamente en la literatura(1,288,289). Este hecho podría explicarse por la falta de este dato en diversos pacientes incluidos en nuestra cohorte. También podría ser consecuencia de la mejora del estado de inmunodepresión de los pacientes infectados por el VIH en la era de la terapia antirretroviral combinada(290,291). Tal y como se ha mencionado en la introducción, la infección de las células del linfoma por el VEB es frecuente en el LPB (alrededor del 60-75%)(1). En nuestra cohorte la proporción de pacientes VEB-positivos es del 58%. Sin embargo, esta frecuencia aumenta entre los pacientes con LPB infectados por el VIH, alcanzando el 75–100% de los casos(11,13,22). En la cohorte de estudio presentada en esta tesis todos los pacientes VIH-positivos mostraron la presencia del VEB en las células tumorales. Además, según el estudio de expresión de miARNs, el perfil de miARNs del VEB apuntaría a un tipo de latencia I/II en los casos con LPB VEB-positivos, tal y como se ha descrito en otros estudios(19,36). La *t-MYC*, presente en alrededor del 50% de los pacientes, es la principal alteración genética descrita en el LPB(13,16). En este estudio los pacientes con *t-MYC* fueron del 48%. Curiosamente, los VEB-positivos se asociaron significativamente con un estado general de los pacientes (ECOG) más conservado. Se ha relacionado al VEB con el desarrollo de linfomas asociados al VIH(19), sin embargo, parece ser que la infección por el VEB se relaciona con pronósticos más favorables tal y como se ha visto en esta tesis y en otras cohortes(11,37,52).

6.2. Perfil de expresión génica en el LPB

Según nuestro conocimiento, este trabajo constituye la investigación transcriptómica más extensa realizada en el LPB. Además, los estudios previos han comparado el perfil transcriptómico del LPB según la presencia o no del VEB en el linfoma(53,66,67). También se ha comparado el perfil de expresión génica del LPB con el de otras entidades similares como el MM y el LDCBG(43,285). En este estudio se ha comparado por primera vez el LPB respecto a muestras control sin evidencia de neoplasia, lo que ha permitido identificar los mecanismos aberrantes que se vinculan con el desarrollo tumoral en este linfoma.

Mediante el análisis de PCA de la expresión génica se identificó heterogeneidad en los casos de LPB. Sin embargo, al representar los GDEs en un mapa de color, no fue posible identificar grupos con distintos perfiles de expresión en base a los 3 factores relacionados con la etiopatogenia del linfoma como son la infección por el VIH, la presencia del VEB y la t-MYC en las células tumorales. A través de análisis funcionales, este estudio ha identificado alteraciones significativas en el ciclo celular en el LPB, incluyendo la desregulación de las dianas de MYC y de E2F, y el punto de control de la transición G2/M. Mediante un análisis de enriquecimiento y un enfoque de difusión en red de genes mutados en el LPB, Witte et al. evaluaron el impacto de las alteraciones genéticas presentes en el LPB sobre genes vecinos(66). Dicho análisis reveló que dianas de MYC y de E2F y genes involucrados en el punto de control G2/M se mostraron enriquecidos en este linfoma, por lo que nuestro estudio de expresión génica confirma estos hallazgos. Además, el funcionamiento aberrante del ciclo celular según la expresión de genes implicados en dicho proceso, se vio afectado por la infección del VEB(66). En este sentido, el enriquecimiento de las dianas de E2F en los pacientes VEB-positivos respecto a los VEB-negativos obtenido en esta tesis, respalda la idea de que esta infección viral contribuye a la desregulación de la progresión del ciclo celular en el LPB. Concretamente, se observó que los pacientes VEB-positivos presentaron niveles de ARNm de *E2F6* y *E2F8* significativamente superiores al grupo control. En relación a estos datos, se ha descrito que la proteína EBNA3C del VEB recluta a E2F6 para alterar la capacidad

Discusión

proliferativa de las células B mediante la regulación de la transcripción de *E2F1*(292). Este mecanismo podría explicar la contribución del VEB a la transformación maligna de las células B en el LPB.

En relación con la firma de expresión génica en pacientes LPB VEB-positivos se observó a una marcada respuesta inflamatoria (respuesta al IFN- γ e IFN- α , señalización de TNF- α y la vía NF- κ B). Se ha visto que la inflamación está estrechamente vinculada al desarrollo tumoral, promoviendo la angiogénesis, la metástasis y favoreciendo la aparición de mutaciones y daños en el ADN(293,293). Además de desencadenar una respuesta pro-inflamatoria, se ha postulado que el VEB, junto con el VIH, pueden contribuir a reprimir la respuesta anti-tumoral mediada por el sistema inmune en diversos linfomas, a través de la remodelación de un microambiente más permisivo que favorece la supervivencia tumoral(52,294–296,19). Sin embargo, nuestros resultados revelan una evasión inmunitaria en el LPB con una deficiencia de respuesta inmune en el LPB en comparación al grupo control, es independiente de las infecciones del VEB y del VIH. Estos hallazgos refuerzan la idea de que, aunque estas infecciones virales pueden contribuir a la supervivencia tumoral a través de mecanismos de evasión del sistema inmune, el propio tumor alberga firmas genéticas que dan lugar a un microambiente permisivo. Este perfil de expresión permite el camuflaje frente al reconocimiento inmunológico, asegurando la supervivencia de las células neoplásicas.

Además, el estudio de expresión génica desveló que el LPB exhibe un incremento de demanda metabólica, asociado a un potenciamiento de la glicólisis, de la fosforilación oxidativa, de la respiración celular y de procesos regulados por mTORC1(297,298). En cáncer, la reprogramación metabólica ha sido descrita como uno de los mecanismos necesarios para la síntesis proteica y de ATP que aseguren la proliferación desmesurada y progresión tumoral(299,300). Cabe mencionar, que en otros linfomas como el LDCBG, la señalización de mTORC1 tiene un impacto en el pronóstico de los pacientes, presentando supervivencias más prolongadas aquellos con inactivación de mTORC1(301). Asimismo, la fosforilación oxidativa parece que está implicada en la resistencia a la quimioterapia en diversas neoplasias

linfoides(302–304). Por todo ello, una línea de investigación relacionada con la demanda energética y la fosforilación oxidativa en el LPB podría abrir puertas a interesantes estrategias terapéuticas para explorar en el tratamiento de este linfoma(305–307).

6.3. E2F en la patogénesis del LPB

El papel crucial de los FT E2F en la regulación del ciclo celular ha sido ampliamente descrito(308–310). Alteraciones genéticas, como amplificaciones o deleciones de E2F, se han asociado con el desarrollo de diferentes tipos de cáncer (188,189,311). Se ha demostrado que tras condiciones que inducen daño en el ADN, la regulación positiva de E2F3 promueve la transcripción de dianas de E2F, impidiendo que las células dañadas abandonen el ciclo celular(221). E2F3 ha sido relacionado con la progresión tumoral y con una SG más corta en ciertos cánceres(312–316). En los estudios realizados en el presente trabajo se ha observado una sobreexpresión de todos los miembros de la familia a excepción del inhibidor del ciclo, *E2F5*, así como un enriquecimiento de genes diana de estos FTs. Además, en el LPB se identificó una asociación entre la expresión del ARNm de *E2F1-E2F3* y de *E2F8* y el marcador de proliferación *MKI67*. Estos resultados revelan por primera vez que los E2F son reguladores relevantes de la expresión génica en el LPB y podrían estar asociados a la agresividad de este linfoma.

En el hepatocarcinoma celular se ha descrito la asociación de los E2F con estadios avanzados, grados elevados de la enfermedad, así como en la SG de los pacientes(317). Concretamente, una expresión elevada de E2F1 afecta desfavorablemente la supervivencia de los pacientes en diversos cánceres, incluyendo cáncer de pulmón, mama, ovario y hepático(317,318). No obstante, los casos incluidos en los análisis de supervivencia en el LPB fueron limitados debido a la falta de datos clínicos de diversos pacientes. El aumento de casos con disponibilidad de datos clínicos en este tipo de análisis permitiría identificar asociaciones entre estos datos y la expresión de E2F de manera más consistente.

6.4. Asociación entre el perfil de expresión de miARNs y la t-MYC

Los miARNs regulan post-transcripcionalmente la expresión génica(116). Se ha descrito que diversos miARNs regulan la expresión de *MYC*, y este a su vez, es un importante regulador de la expresión de miARNs, reprimiendo miARNs supresores de tumores o activando oncomiARNs(319–321). Aunque el mecanismo por el cual c-Myc regula los miARNs no está establecido, se ha descrito que c-Myc se une al promotor de *DROSHA*, el cual se encarga de generar los pre-miARNs impidiendo la maduración de los mismos(320). La red *MYC*/miRNA está implicada en el desarrollo del cáncer(117,322), entre cuyas interacciones tiene especial interés *Myc*/miR-17-92 por su implicación en el crecimiento tumoral en linfomas de células B(323,324).

La t-*MYC* se ha postulado como la principal alteración genética relacionada con la patogénesis del LPB, y aunque un par de estudios han descrito el perfil de expresión de miARNs de cohortes pequeñas de LPB, la relación entre *MYC* y el perfil de miARN no ha sido explorada en este linfoma(119,286). Hasta la fecha, el estudio de expresión de miARNs llevado a cabo en esta tesis es el más completo realizado en el LPB. Mediante el análisis de este estudio, se ha visto que esta neoplasia es heterogénea en cuanto a expresión de miARNs se refiere y que los pacientes se pueden agrupar en 2 perfiles de expresión según la presencia de la t-*MYC*. Los casos con t-*MYC* muestran un perfil de expresión de miARNs más diferente al de los controles que al de los casos sin dicha alteración genética. Este hallazgo sugiere que la modulación del perfil de miARNs podría ser un mecanismo de linfomagénesis impulsado por *Myc* en el LPB.

6.5. miR-150-5p como supresor tumoral

En este estudio se ha identificado a miR-150-5p como el miARN más infraexpresado en el LPB respecto a los controles. Se ha visto que este miARN presenta funciones duales en el cáncer. En unos casos actúa como un oncomiR, promoviendo la progresión, metástasis y proliferación tumoral(124,125). En cambio

en otros funciona como miARN supresor tumoral, inhibiendo la metástasis y la invasión tumoral en diversos cánceres(126–129). Concretamente, el precursor miR-150 desempeña una función de supresor tumoral en el LF y la infraexpresión de éste se ha vinculado a la transformación del LF, un linfoma indolente, en un linfoma más agresivo(123). Asimismo, el bloqueo en el proceso de maduración de miR-150 permite el desarrollo leucémico, reafirmando su papel en la prevención del desarrollo de los procesos linfoproliferativos(325,326). Una pérdida de miR-150 también se ha asociado a la resistencia a inhibidores tirosina-quinasa en otras neoplasias hematológicas como la leucemia mieloide crónica(327).

La reducida expresión de la forma madura de este miARN, miR-150-5p, que presentaron los pacientes con LPB y la correlación negativa observada entre miR-150-5p y la proliferación (*MKI67*) hicieron pensar que este miARN desempeña una función anti-linfomagénica en el LPB. Los resultados presentados en esta tesis al restaurar la expresión de miR-150-5p en la línea celular PBL-1, demostraron su funcionalidad en la prevención de la linfomagénesis del LPB tal y como se expone en los siguientes apartados.

6.5.1. miR-150-5p en la regulación de la apoptosis y del ciclo celular

Previamente, se demostró que *E2F3* es diana directa de miR-150-5p(283). Dado que el análisis de secuenciación de ARN apuntó a que los E2F desempeñan un papel fundamental en la regulación de la expresión génica en el LPB, la interacción miR-150-5p/E2F3 despertó nuestro interés.

Los estudios de expresión génica mostraron una sobreexpresión de *BIRC5*, diana a su vez de E2F3 y gen relevante del complejo regulador de la mitosis CPC en el LPB. Mediante los estudios de correlación de las expresiones se observaron correlaciones inversas entre *E2F3* y *BIRC5* con miR-150-5p, así como una correlación positiva entre *E2F3* y *BIRC5*. En este estudio se demostró que miR-150-5p se une directamente al promotor de *BIRC5*, aunque el porcentaje de represión de *BIRC5* observado fue del 20%. La nucleofección de concentraciones crecientes de miR-150-5p *mimic* podría

Discusión

demostrar una mayor inhibición de la actividad de la luciferasa de manera dosis-dependiente. Además, se evaluó la posible asociación de estos elementos a la proliferación. Se observó que niveles superiores de *E2F3* y *BIRC5* se vincularon a un aumento de *MKI67*, de manera opuesta a la expresión de miR-150-5p. En un estudio realizado en cáncer de páncreas se vio que la represión de este miARN da lugar al aumento de *E2F3* asociándose al desarrollo del cáncer de páncreas(283). El conjunto de estos resultados hizo pensar que el eje miR-150-5p/*E2F3/BIRC5* podría desempeñar un papel fundamental en la desregulación del ciclo celular y el desarrollo tumoral en el LPB.

Los estudios *in vitro* llevados a cabo en esta tesis en la línea PBL-1, demostraron que miR-150-5p bloquea aproximadamente un 40% la expresión de E2F3 y survivina. Además, miR-150-5p induce indirectamente a la inactivación de Aurora B, bloqueando el estado fosforilado de la proteína. La survivina es activada por diversas proteínas, entre ellas, Aurora B fosforila la survivina en el residuo de serina 117, dando lugar a su activación(243,244). Por lo tanto, los resultados obtenidos son sugestivos de que miR-150-5p podría ser un elemento importante en el control del complejo CPC, impidiendo la activación de survivina mediante la represión indirecta de Aurora B.

Por otro lado, se observó en menor medida, una reducción de los niveles de ciclina E1, transcripcionalmente activada por E2F3 y posible diana de miR-150-5p según la base de datos de Affymetrix, aunque dicha interacción no ha sido validada en esta tesis. Un estudio realizado en carcinoma nasofaríngeo demostró la unión directa del precursor miR-150 a *CCNE2* pero no a *CCNE1*(328). Según lo previamente mencionado, la disminución de *CCNE1* que observamos tras la sobreexpresión de miR-150-5p sería más bien, consecuencia de la pérdida de E2F3, que de la represión de *CCNE1* por parte de dicho miARN. La infraexpresión observada de la survivina, podría ser causada directamente por la represión del promotor de *BIRC5* por parte de miR-150-5p o de manera indirecta por la pérdida de E2F3. Para tratar de averiguarlo, se aumentó la expresión de este miARN en las células *E2F3^{mut}*. Pese a ello, no se vio potenciada la represión sobre *BIRC5* y *CCNE1*

ya que no se detectaron cambios de expresión de E2F3. Estos resultados refuerzan la idea de que la represión de *BIRC5* y *CCNE1*, tras el incremento de expresión de miR-150-5p podría deberse a la pérdida de los niveles de E2F3 en lugar de la inhibición post-transcripcional directa por parte de miR-150-5p.

Dado que la survivina es una proteína anti-apoptótica, tal y como se esperaba, la disminución de sus niveles desencadenó un aumento de la apoptosis y una consecuente limitación de la viabilidad celular. Como E2F3 y survivina son reguladores del ciclo celular, la reducción de los niveles de estas proteínas conllevó a alteraciones en el ciclo celular. Concretamente, miR-150-5p retardó la transición entre las fases G1/S del ciclo celular, causando un arresto de las células en la fase G1 y reduciendo las células en fase G2/M. Estos resultados demuestran que la pérdida de E2F3 inducida por miR-150-5p, limita la activación del programa transcripcional de E2F3 necesario para la progresión de las células en G1 a la fase S. Además, se detectó una reducción de la transcripción de *CCNE1*, cuyo complejo con CDK2 es fundamental para la transición a la fase S del ciclo celular, corroborando el incremento de células en G1(329). No obstante, dado que survivina forma parte del complejo CPC, esencial durante la fase de mitosis, se podría esperar que la pérdida de survivina produjese un arresto de células en G2/M impidiendo la transición a la fase G1. En cambio, se ha visto que el complejo AuroraB/survivina/mTOR controla la transición G1/S y la proliferación en células T(251) y además, la survivina es fundamental en la progresión del ciclo celular independientemente de la señalización de mitógenos en las células B(250). Estos estudios apuntan a que la survivina también es relevante para la salida de las células de la fase G1, por lo que su pérdida encajaría con el bloqueo de la transición G1/S observada en las células PBL-1.

Para confirmar el papel supresor tumoral de miR-150-5p en el LPB bajo condiciones de pérdida de expresión de E2F3, se repitieron los experimentos en las células *E2F3^{mut}*. Tras sobreexpresar miR-150-5p en estas células no se detectaron diferencias significativas en los niveles de ARNm ni de proteína de E2F3, survivina y ciclina E1. En consecuencia, la incapacidad de miR-150-5p de inducir cambios en la apoptosis y en la progresión del ciclo celular en las células *E2F3^{mut}* reafirman que

Discusión

este miARN es capaz de regular dichos procesos celulares reprimiendo *E2F3*. No obstante, aunque las células *E2F3^{mut}* son *knockdown* para este gen y mantienen unos niveles del 50% de la proteína, el aumento de miR-150-5p no reduce aún más los niveles de *E2F3*. En la regulación miARN-genes diana, Ago2 es una proteína fundamental, cuya pérdida origina alteraciones en estas interacciones(330). Esta proteína, compete con Pum1 y Pum2 por su unión a las regiones 3'UTR de los genes(331). Pum1 y Pum2, a su vez facilitan la unión de miARNs a la región 3'UTR de *E2F3* en condiciones normales, sin embargo, en cáncer esta regulación negativa se ve alterada para evitar la represión post-transcripcional de *E2F3*(332). En relación con estos hechos, la pérdida de *E2F3* podría conllevar la activación de mecanismos que desregulen la expresión de Ago2, Pum1 o Pum2 evitando la unión de miARNs al promotor de *E2F3*. De este modo impediría la pérdida completa de los niveles de *E2F3* en las células PBL-1 *E2F3^{mut}*.

6.5.2. miR-150-5p como inhibidor de la proliferación

Además de los efectos comentados previamente, hemos visto que miR-150-5p podría ser un inhibidor de la proliferación en el LPB, tal y como sugirió la correlación negativa entre la expresión de miR-150-5p y el marcador de proliferación *MKI67*. Posteriormente, los estudios *in vitro* demostraron un efecto anti-proliferativo de miR-150-5p al ser sobreexpresado en las células PBL-1. Como *MKI67* es activado por *E2F3*(333), se pensó que la inhibición de la proliferación conseguida al aumentar los niveles de miR-150-5p podría ser causada por la represión de *E2F3*. La ausencia de capacidad anti-proliferativa de miR-150-5p en las células *E2F3^{mut}* confirmaría esta hipótesis. Por el contrario, la sobreexpresión de miR-150-5p limitó la capacidad proliferativa de las células *E2F3^{mut}*, incluso en mayor medida que en las células WT. Sin embargo, miR-150-5p no bloqueó la expresión de *E2F3* en las células *E2F3^{mut}*. Conjuntamente, estos resultados insinúan que la disminución de la proliferación producida por miR-150-5p se debe a la regulación de otros genes diana no evaluados en esta tesis. Estos genes podrían a su vez, ser regulados por *E2F3*, lo que explicaría mayor reducción de la proliferación en las células *E2F3^{mut}* con sobreexpresión de miR-150-5p. Se ha expuesto en síndromes mielodisplásicos que *MYB* es diana

directa de miR-150-5p y que la represión de este gen conlleva la inhibición de la proliferación y del crecimiento tumoral en esta enfermedad(334). Así pues, podría ser que miR-150-5p controlase la proliferación del LPB a través de la represión directa de *MYB*, interacción que sería interesante evaluar en futuros estudios.

6.5.3. Regulación de la expresión de miR-150-5p

Tras demostrar que miR-150-5p reprime a *E2F3*, se valoró si *E2F3* a su vez, podría regular la expresión de este miARN en un bucle de retroalimentación negativa. Como ya se ha descrito en otros cánceres, *E2F3* regula la expresión de otros miARNs (miR-200b, -200c, -17-92) y estos a su vez, se unen directamente a *E2F3*(335). Dado que *MYC* es transcripcionalmente regulado por *E2F3* y *Myc* reprime el precursor miR-150 tal y como se ha demostrado en LF(123), se pensó que *E2F3* podría regular negativamente la expresión de miR-150-5p a través de la activación *MYC*. Tal y como se esperaba, las células *MYC*^{KO} presentaron niveles aumentados de miR-150-5p, así como las células *E2F3*^{mut}. Estas últimas, además mostraron expresión disminuida de *Myc*. Los niveles superiores de miR-150-5p alcanzados al sobreexpresar este miARN en las células *MYC*^{KO} respecto a las *E2F3*^{mut} respaldan la hipótesis de un eje de retroalimentación negativa *E2F3/MYC/miR-150-5p*. El hecho de que tanto *E2F3* como *MYC* muestren una expresión aumentada en el LPB, explicaría la infraexpresión de miR-150-5p observada en los casos de LPB analizados en este trabajo.

6.6. E2F3 como promotor de la linfomagénesis en el LPB

Los estudios de expresión génica revelaron una sobreexpresión de casi todos los *E2F* en el LPB, incluyendo *E2F3*. A su vez, se detectó una correlación positiva entre la expresión de *E2F3* y el marcador de proliferación *MKI67* que sugiere la implicación de *E2F3* en la regulación de este proceso celular. Teniendo en cuenta los datos mencionados, planteamos la hipótesis de que *E2F3* podría desempeñar un papel importante como impulsor de la linfomagénesis en el LPB. Los experimentos *in vitro* utilizando células de LPB *knockdown* para *E2F3* demostraron que estas células reprimen la transcripción de *CCNE1* y *CCNA2*, que son reguladores de la transición

Discusión

G1/S. Además, se relacionó con una regulación negativa de *BIRC5* y *AURKB*, compuestos del complejo CPC, y reguladores esenciales para asegurar la correcta segregación cromosómica durante la mitosis. Tal y como se ha mencionado previamente, la survivina a su vez es necesaria para la transición G1/S(250,251). Por tanto, la desregulación de los genes analizados en esta tesis, explicaría la ralentización de la transición G1/S de las células *E2F3^{mut}*. Para ahondar en los mecanismos por los que E2F3 promueve la progresión del ciclo celular en el LPB, sería interesante estudiar la expresión de otras dianas de E2F3 incluyendo ciclinas, CDKs y los reguladores negativos del ciclo, CDKNs, así como la represión de *E2F3* ejercida por Rb.

En relación con otros mecanismos oncogénicos, las células *E2F3^{mut}* vieron comprometida la capacidad migratoria, invasiva y proliferativa tal y como manifestaron los estudios *in vitro*. Estos resultados han sido observados en otros modelos de glioma y cáncer de colon, en los que se ha visto que E2F3 favorece la activación de STAT3(336,337). Puesto que *STAT3* es uno de los principales genes mutados en el LPB, cabe la posibilidad de que E2F3 potencie la activación de la vía JAK-STAT a través de la regulación positiva de *STAT3* en el LPB, aunque este mecanismo no ha sido evaluado en la presente tesis. Además, se ha descrito que *STAT3* favorece la unión de los E2F a sus dianas, promoviendo la sobreexpresión de la ciclina B1 y Cdc2 y contribuyendo a la progresión G2/M del ciclo celular(338). Es probable que las mutaciones activadoras en *STAT3* observadas en el LPB contribuyan al funcionamiento aberrante del punto de control G2/M. Debido a que únicamente se incluyeron en el estudio de RNA-seq 4 pacientes con alteraciones genéticas en *STAT3* según el estudio de Fabian F et al., no fue posible realizar un análisis comparativo concluyente(56).

Por otro lado, bajo condiciones de deficiencia de Rb, Myc es necesario para promover la acumulación de E2F3(339). Además, la pérdida de Rb contribuye a la estabilización de c-Myc, y éste facilita la transcripción del programa transcripcional activado por E2F3(340). Estos hallazgos llevan a pensar que c-Myc y E2F3 cooperan

para inducir la desregulación del programa transcripcional del ciclo celular, lo que conduciría a una proliferación aberrante en el LPB.

El bloqueo de la capacidad proliferativa de las células *E2F3^{mut}* fue validado mediante el modelo de xenoinjerto de MCA. A pesar de ello, el tamaño tumoral no se vio reducido en el modelo MCA *E2F3^{mut}* en comparación al modelo MCA WT. Tal y como se observó mediante las tinciones de HE, ambos tumores presentaron un elevado número de células del sistema inmune del pollo reaccionando frente a la presencia de este cuerpo extraño. La infiltración de células dendríticas, macrófagos, granulocitos (equivalentes a neutrófilos humanos) ha sido observada en otros modelos MCA de LB(341). Esto sugiere que el tamaño del tumor se ve influido, en gran parte, por la infiltración de estas células del embrión de pollo, más que por la masa generada por las células tumorales en sí, lo que enmascara diferencias apreciables en el tamaño de los tumores generados entre ambos modelos. En cambio, la dispersión y el bajo número de casos incluidos en los estudios de migración evaluados mediante la cuantificación de la secuencia *ALU* humana en hígado y bazo, no permitieron observar diferencias de migración entre ambos modelos. Las tinciones de MUM-1 mediante IHC en estos órganos podrían ser una alternativa para evaluar de manera más eficaz la migración de las células tumorales. Cabe destacar que el porcentaje de matrigel empleado para la inoculación de las células influye en la capacidad migratoria de las mismas, de manera que cuanto más rica sea la matriz de colágeno, más se limita la migración de las células(341). Este hecho podría dificultar la evaluación la capacidad migratoria en los modelos de MCA generados en esta tesis, por lo que una reducción del porcentaje de matrigel empleado para la inoculación sería considerable para evaluar mejor dicho proceso.

Por todo lo expuesto previamente, nuestros datos demuestran que la supresión de *E2F3* atenúa los mecanismos linfoproliferativos en las células PBL-1, reforzando la idea de que *E2F3* contribuye en la patogénesis de LPB.

6.7. E2F3 y survivina como dianas terapéuticas

Los niveles elevados de survivina(342,343) y E2F(344) se han asociado con un mal pronóstico en varios tipos de cáncer. Concretamente, altos niveles de E2F3 se han relacionado con supervivencias inferiores(315,317,345,346), aunque este hecho no ha sido observado en la cohorte de LPB evaluada en este estudio. Tras demostrar el papel del eje miR-150-5p/*E2F3/BIRC5* en el desarrollo del LPB, se decidió abordar el estudio de E2F3 y survivina como potenciales dianas terapéuticas en este linfoma. Cabe mencionar que no se encontraron inhibidores específicos de E2F3 por lo que se escogió el inhibidor HLM006474 que previamente había mostrado resultados favorables en la detención del crecimiento tumoral en modelos de melanoma y cáncer de pulmón(347–349). Aunque algunos estudios han sugerido que HLM006474 actúa directamente contra E2F4 y aumenta los niveles de E2F3(347,348), nuestros resultados evidencian una inhibición dosis dependiente de E2F3 y de survivina en las células PBL-1. No obstante, no se evaluó el efecto inhibitorio de HLM006474 sobre el resto de miembros de la familia en estas células.

De manera opuesta, la survivina ha sido ampliamente estudiada como estrategia anticancerígena en diversos estudios preclínicos y en ensayos clínicos. Dentro de las estrategias existentes anti-survivina se incluyen principalmente inhibidores de la transcripción de *BIRC5*, inhibidores de la homodimerización de la survivina e inhibidores de la unión de la survivina a proteínas asociadas(264). También existen inmunoterapias contra survivina que incluyen la vacuna peptídica SurVaxM, la cual genera la producción de anticuerpos contra survivina y una respuesta anti-tumoral mediada por células T, estimulando al sistema inmune contra esta proteína oncogénica(350,351). En esta tesis, se evaluó el papel del inhibidor de la dimerización de la survivina S12, el cual da lugar a una degradación de la proteína(264,352,353). Las células PBL-1 exhibieron reducción de los niveles de survivina al ser tratadas con S12 tanto de manera individual como en combinación con HLM006474, lo que confirmaría que estos tratamientos conducen a la degradación de la proteína.

Tal y como se esperaba, el tratamiento con HLM006474 indujo un arresto de las células PBL-1 en la fase G1, mientras que S12 ralentizó la progresión de las células en la fase M. Puesto que E2F3 y survivina son reguladores de distintas fases del ciclo (G1 y G2/M, respectivamente), la detención del ciclo celular en la fase G1 inducida por la combinación de inhibidores, podría atribuirse a un mecanismo de acción más rápido de HLM006474 en comparación con S12. Por otro lado, no ha sido evaluada la expresión del resto de miembros E2F con el tratamiento HLM006474. Es de esperar que otros miembros de la familia como E2F1 y E2F2, activadores también de la transición G1/S se vean a su vez afectados por este tratamiento. Estas teorías explicarían el bloqueo de la transición G1/S observado con la combinación de los inhibidores.

Por otro lado, S12 mostró un efecto pro-apoptótico significativo que no se observó en el tratamiento con HLM006474, pese a la disminución de la survivina producida por este último inhibidor. No obstante, HLM006474 potenció el efecto pro-apoptótico y anti-proliferativo de S12, de manera sinérgica. La mayor sensibilidad de las células al tratamiento con S12 en cuanto a la capacidad proliferativa en comparación al inhibidor HLM006474 podría explicarse por el efecto citotóxico observado en las células tratadas con S12. El efecto sinérgico observado con la combinación de los inhibidores podría venir dado por la inhibición de múltiples interacciones proteicas involucradas en la apoptosis y la proliferación celular.

Curiosamente, en los ensayos *in vitro* HLM006474 aumentó ligeramente el efecto anti-proliferativo en las células *E2F3^{mut}* a la dosis IC_{50} sugiriendo que E2F3 podría inducir resistencia frente a este inhibidor. Los estudios *in vivo* mostraron que el tratamiento con HLM006474 detiene el crecimiento tumoral en el modelo MCA de *E2F3^{mut}* lo que apuntaría a que las células con mayor expresión de E2F3 exhiben resistencia frente a este inhibidor. Se evaluó si HLM006474 producía un efecto tóxico en el modelo MCA, sin embargo, no se vieron diferencias en el peso del huevo ni del embrión en el modelo MCA *E2F3^{mut}* tratado con el anti-E2F lo que apuntaría a la seguridad de este inhibidor en dicho modelo *in vivo*. Aunque se observó una pérdida de peso del huevo el día 16 con el inhibidor de E2F, el día 16 no se apreciaron

Discusión

variaciones en los pesos del huevo ni del embrión respecto al grupo control. Estos resultados podrían sugerir que HLM006474 tuvo un efecto tóxico durante la primera administración, que no tuvo la segunda dosis, probablemente debido a una adaptación del organismo al tratamiento. Tampoco se detectaron diferencias significativas en el peso de los huevos ni en el peso de los embriones con el tratamiento S12 en ninguno de los modelos indicando a la seguridad de este tratamiento en ambos modelos.

La combinación de los inhibidores *in vitro* produjo un efecto citotóxico en las células PBL-1 WT y $E2F3^{mut}$, siendo mucho más intenso en las células WT. En los ensayos *in vivo*, aunque no fue significativa, se observó una tendencia a una pérdida de peso del huevo de manera progresiva que podría estar reflejando un efecto tóxico de la combinación H+S en los modelos MCA. Dado que la estrategia empleada en este modelo no permite pesar los embriones previamente al tratamiento, se relativizaron los pesos de los embriones respecto el peso de los huevos al final del experimento. De esta manera se pueden analizar las diferencias en el peso de los embriones entre los distintos tratamientos, asegurando que las diferencias no son debidas al tamaño de los huevos. Con esta normalización no se vieron diferencias con los tratamientos individuales respecto al grupo no tratado, mientras que se detectaron proporciones de peso superiores con la combinación tanto en el modelo MCA WT $E2F3^{mut}$. Tal y como se ha mencionado, el peso de los huevos a día 16 con la combinación del tratamiento disminuyó, aumentando así el cociente entre los pesos. Por lo tanto, no parece que la combinación H+S afecte al peso del embrión, lo que podría descartar un efecto nocivo en estas condiciones. Cabe remarcar que debido a la limitación de no poder pesar a los embriones por días en el modelo MCA, no se puede garantizar por completo la seguridad de los inhibidores. Para ello, convendría reproducir estos experimentos en otro modelo animal como, por ejemplo, modelos murinos, que permitan explorar en mayor detalle los efectos dañinos que estos inhibidores puedan tener *in vivo*.

Por otro lado, la represión del crecimiento tumoral observado *in vivo* en células $E2F3^{mut}$ por HLM006474 (IC_{50}) sugiere que E2F3 puede conferir resistencia contra

este inhibidor. Estos hallazgos indican que E2F3 podría ser una diana terapéutica prometedora y que el uso de un inhibidor específico de E2F3 podría mostrar resultados más efectivos en el tratamiento de este linfoma. Por el contrario, el inhibidor S12 y los tratamientos combinados exhiben una eficacia reducida sobre la proliferación de las células *E2F3^{mut}* *in vitro*, probablemente a consecuencia de los niveles reducidos de survivina observados en las células *E2F3^{mut}*. En conjunto, los resultados comentados en este apartado refuerzan la idea de que E2F3 y survivina pueden ser nuevas dianas terapéuticas y que la combinación de los inhibidores HLM006474 y S12 se postulan como potenciales estrategias terapéuticas para el tratamiento del LPB (Figura 62).

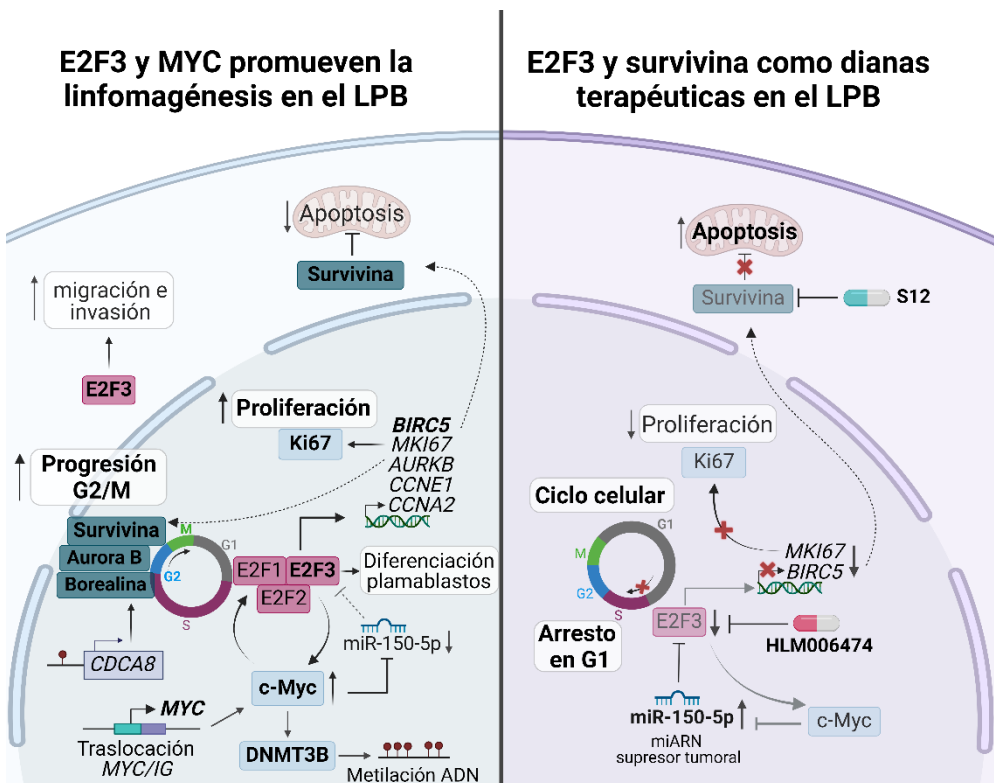


Figura 62. Hallazgos en la linfomagénesis del LPB. A la izquierda, eje E2F3/BIRC5/miR-150-5p/MYC en la linfomagénesis del LPB induciendo la progresión del ciclo celular. La inhibición de E2F3 y survivina ralentiza la progresión del ciclo celular y el desarrollo tumoral del LPB, suponiendo posibles estrategias terapéuticas.

Discusión

Otras estrategias anti-survivina como Terameprocol(354) o YM155(355), inhibidores de la expresión de survivina que ya han sido probados en ensayos clínicos, podrían probarse en la línea PBL-1 para reafirmar el efecto anti-tumoral de la inhibición de survivina en el LPB. Concretamente, se ha descrito en el cáncer de pulmón que YM155 reduce la fosforilación oxidativa y el metabolismo mitocondrial(356). Puesto que el LPB mostró un elevado requerimiento energético, con un potenciamiento de la fosforilación oxidativa y la actividad mitocondrial, resulta de gran interés evaluar el efecto de este inhibidor como terapia contra el LPB. Otro punto a tener en cuenta sería analizar el impacto HLM006474 y S12 junto con CHOP. De este modo, se valoraría si estos inhibidores potencian el efecto anti-tumoral de la terapia estándar aplicada para el tratamiento del LPB.

6.8. Modelos funcionales en el LPB

A diferencia de otros linfomas más comunes donde existen diversidad de líneas celulares y modelos de estudios *in vitro*, los modelos en el LPB son muy escasos. Matsuki et al. establecieron 3 líneas celulares (KY1-3) a partir del ganglio linfático de un paciente con LPB. Posteriormente, Mine et al. establecieron la línea PBL-1 a partir de la ascitis de un paciente con LPB(39,95). A diferencia de las líneas KY1-3, PBL-1 es positiva para t-MYC y para el VEB, lo que lo convierte en un modelo de estudio óptimo, dada la estrecha asociación entre estos parámetros y la etiopatogenia del LPB(39). No obstante, únicamente Frontzek et al. han realizado estudios adicionales en las células PBL-1 identificando potenciales dianas terapéuticas y estrategias terapéuticas alternativas(56). La imposibilidad de adquirir las líneas celulares KY1-3 limitó los estudios *in vitro* a la línea celular PBL-1.

Es importante remarcar que, hasta el momento no se han realizado estudios *in vivo* en modelos de LPB. Únicamente, Chapuy et al. generaron un modelo PDX en un ratón NSG (*NOD scid gamma mouse*). A pesar de ello, no se han publicado estudios usando este modelo murino para profundizar en los mecanismos moleculares asociados al desarrollo del LPB(103). Los pocos estudios *in vitro* en busca de nuevos tratamientos en el LPB, no han sido validados en ningún modelo animal, por lo que

se desconocen los efectos tóxicos que estos puedan tener. En este trabajo, se han tratado de validar los resultados de los inhibidores seleccionados *in vitro*, en el modelo MCA de pollo *in vivo*. No obstante, aunque este modelo reduce considerablemente el gasto económico y el tiempo experimental, los resultados obtenidos en comparación a un modelo murino, son mucho más variables, por lo que se necesitan mayor número de muestras para evaluar los resultados(357,358). Es por ello, que algunos de los resultados obtenidos, como por ejemplo la evaluación de la migración en este modelo, no han permitido detectar diferencias significativas. Además, no permite valorar en detalle la toxicidad de los tratamientos con tanto detalle como en otros modelos animales. La generación de modelos PDX o CDX (*cell-derived xenograft*) en ratones a partir de las células PBL-1 podrían usarse como modelos *in vivo*, tal y como han sido generados para el estudio del LDCBG(103,359,360). Con ellos se podrían evaluar periódicamente medidas de peso y tamaño de los animales. Además, se podría valorar el estado físico de los ratones a diario y se podrían realizar pruebas de comportamiento con el fin de detectar efectos de los inhibidores.

Con todo ello, pese a que los modelos utilizados en este trabajo representan herramientas útiles para el estudio del LPB, se requieren más modelos de estudios *in vitro* y especialmente *in vivo*, que permitan reproducir la enfermedad a fin de entender en mayor detalle la biología del LPB y la validación de estrategias terapéuticas dirigidas contra este linfoma.

6.9. E2F3 y MYC en la diferenciación de los plasmablastos

MYC es un FT esencial durante la hematopoyesis y la diferenciación de las células B en proceso complejo(361). En el CG, MYC asegura la proliferación de las células B con afinidad antigénica. Posteriormente, MYC es reprimido para permitir a la célula B activada salir del CG y finalizar el proceso de diferenciación a CP o célula B de memoria. Concretamente, en el proceso de diferenciación a plasmablasto, BLIMP1 reprime a Myc para promover la diferenciación terminal a CP(362). En cambio, aunque se ha descrito que E2F3 es relevante en la diferenciación neuronal(229–232),

Discusión

su papel en la diferenciación de las células B no ha sido evaluado. Sin embargo, parece que la inactivación de *E2f3* en ratones deficientes para *E2f1* y *E2f2* produce severas alteraciones en la médula ósea, reduciendo la presencia de linfocitos en ésta. Dichos resultados son sugestivos de que la combinación de estos 3 miembros es fundamental para una correcta diferenciación hematopoyética en la médula ósea(235,236).

Dada la relación entre E2F3 y MYC, se evaluó la posible asociación entre estos FTs y la diferenciación de los plasmablastos. Las diferencias en el tamaño y complejidad de las células PBL-1 *E2F3*^{mut} sugirieron que E2F3 podría estar afectando a la diferenciación de estas células. Según el estudio de expresión génica, se confirmó una asociación entre *E2F3* y *MYC* y la pérdida de marcadores de célula B (*CD79B*, *CD19*, *CD20*, *PAX5*) así como una asociación positiva *PRDM1-E2F3* y *CD138-MYC*. Aunque se ha descrito que algunos LPB expresan CD79A, no se han publicado resultados referentes a CD79B(86,363). En el LDCBG, mutaciones en CD79B se asocian al subtipo MCD (de célula B activada) mientras que mutaciones en CD79A se asocian al subtipo EZH (de CG)(82). Puesto que el LPB se encuentra más cerca del subtipo ABC (*activated B-cell*) que del GCB (*germinal center B-cell*), en cuanto a célula de origen se refiere, es por ello que se decidió explorar la expresión de CD79B. Se analizó también el marcador de CP aberrantes, CD56 que se expresa comúnmente en células de MM(12), aunque no se observó ninguna correlación con la expresión de ninguno de los 2 FTs.

Sorprendentemente, los estudios *in vitro* demuestran una marcada pérdida de CD38 en las células *MYC*^{KO} y especialmente *E2F3*^{mut}, así como un incremento de CD20 en ambos casos, devolviendo al plasmablasto hacia un estadio de diferenciación previo, más semejante al de una célula B activada. Para nuestra sorpresa, se detectó una expresión del 12% de CD20 en las células PBL-1 WT. Sin embargo, Mine *et al.* especificaron que esta línea celular presentaba una expresión negativa para dicho marcador(39). En nuestro caso, para detectar CD20 se usó un anticuerpo optimizado en la práctica clínica. Es posible que la sensibilidad de este

anticuerpo sea superior al empleado por Mine *et al.* explicando la ausencia de detección de CD20 en su estudio(39).

Por otro lado, cabe la posibilidad de que las células establecidas inicialmente, respecto a las células adquiridas y empleadas posteriormente en nuestro estudio, hayan sufrido alguna transformación tras pases del cultivo celular. De manera remarcable, se observó una pérdida completa de expresión de CD56 en ambas células modificadas, lo que apunta a que tanto E2F3 como MYC están involucrados en la transformación de las células B a plasmablastos neoplásicos. Además, se detectó una reducción de los niveles CD79B en las células MYC^{KO}. Myc potencia la señalización activada por el receptor BCR, del cual forman parte CD79A y CD79B. Algunos autores ha postulado que *CD79B* podría ser diana de MYC en el LB(364), por lo que el cambio observado en las células PBL-1 deficientes para Myc podría atribuirse a estos hechos(364).

Por último, la sobreexpresión de E2F3 en la línea PBL-1 en comparación a líneas de LDCBG, tanto de subtipo GCB como ABC, refuerza la idea de que E2F3 es requerido durante el proceso de diferenciación final de las células B. En conjunto, estos resultados conducen a concluir que E2F3 favorece la linfomagénesis mediada por MYC, a través del descontrol producido en las etapas tardías de la diferenciación de las células B. Asimismo, se ha visto que miR-150 está involucrado en el control de la diferenciación de las células B y T a través de la represión de *MYB*(120,365), cuyo gen es regulado por E2F(366,367). Por tanto, un punto a tener en cuenta para seguir con esta línea de investigación sería evaluar el eje E2F3/MYC/miR-150-5p/MYB en la diferenciación y transformación neoplásica de los plasmablastos.

6.10. Metilación del LPB

La metilación del ADN se ha establecido como una de las regulaciones epigenéticas fundamentales que controlan la expresión génica(368). Alteraciones en el patrón de metilación del ADN se han vinculado extensamente al desarrollo del cáncer(368). Los reguladores de la metilación, como es el caso de DNMTs y TETs,

Discusión

son fundamentales para establecer un correcto balance en el patrón de metilación. No obstante, alteraciones en dichos genes conllevan defectos en la diferenciación de las células B(369,370).

Tal y como describieron Frontzek et al. en la misma cohorte de pacientes incluida en esta tesis doctoral, *TET2* es uno de los genes principalmente alterados en el LPB, mostrando pérdidas en el número de copias (12%)(56). Las mutaciones en *TET2* son frecuentes en otras entidades cercanas, como el LDCBG(371). La pérdida de *TET2* en estos pacientes se reflejó en una pérdida de la expresión de este tal y como demostró nuestro estudio de secuenciación del ARN. La deficiencia de *TET2* da lugar a la hipermetilación del ADN lo que conlleva al enriquecimiento de motivos de unión de FTs fundamentales en la diferenciación de las células B en el CG, incluyendo *BATF* (FT activador de células B), *c-MYC/MAX*, *IRF4*, *PAX5*, *MEF2C*(371). A su vez, se ha descrito que la pérdida de *TET2* aumenta las estructuras *R-loops* y *G-quadruplexes* del ADN que pueden interferir en el proceso de transcripción. Estas estructuras incrementan las translocaciones en las regiones de las Igs y las roturas de doble cadena del ADN dando lugar al desarrollo de neoplasias de célula B(372). Asimismo, la pérdida de *TET2* se asocia a un bloqueo en la diferenciación hacia CP, desencadenando el proceso linfoproliferativo de las células B(81). Por todo ello, la pérdida de *TET2* en el LPB, podría bloquear la diferenciación final de plasmablasto a CP a través de la represión de genes que regulan la diferenciación terminal de las células B.

Mediante el estudio de metilación del ADN se observó disparidad en cuanto a la localización de las islas CpGs hipo e hipometiladas. En este sentido, son de especial interés las CpGs hipermetiladas ya que presentan mayor predisposición en regiones promotoras de los genes. Para evaluar las alteraciones en el patrón de metilación del ADN en el LPB, se evaluó la expresión de los *DNMTs* y *TETs*. Los datos revelaron niveles de expresión inferiores de *TET2* y *DNMT3A*, así como un aumento de expresión de *DNMT3B* y *TET1* en el LPB respecto a los controles. Aunque *DNMT3B* se encuentra altamente sobreexpresado, la mayoría de CDMs están hipometiladas, probablemente por un mayor efecto combinado de la pérdida de expresión de

DNMT3A y la ganancia de *TET1*. Curiosamente, del mismo modo que se observó en el perfil de expresión de miARNs, los resultados muestran que es posible clasificar a los pacientes con LPB en 2 grupos según el perfil de metilación del ADN, en base a la presencia de t-MYC. La hipermetilación de genes reforzada en los pacientes con t-MYC-positiva puede explicarse por el aumento de expresión de *DNMT3B* en comparación con los casos t-MYC-negativos. MYC se une al promotor de *DNMT3B*, activándolo y favoreciendo la linfomagénesis mediada por MYC en la LLA-T y en el LB(139). Estos hallazgos refuerzan la idea de que otro de los mecanismos por los que MYC promueve la linfomagénesis en el LPB podría ser la alteración de la expresión génica a consecuencia de cambios epigenéticos mediados por *DNMT3B*.

Otro elemento importante en la etiopatogenia del LPB es el VEB, que puede alterar las firmas epigenéticas según se ha descrito en diferentes linfomas(373). Parece ser que la proteína LMP1 del VEB favorece la hipermetilación del ADN aumentando la expresión de *DNMT1* y *DNMT3B*, así como LMP2 potencia la expresión de *DNMT3A*(374–376). Nuestros resultados mostraron una marcada hipermetilación en pacientes VEB-positivos apuntando a que el VEB contribuye a la desregulación de las marcas epigenéticas en el LPB. No obstante, no se observaron diferencias de expresión en ninguno de los *DNMTs* ni *TETs* entre los pacientes VEB-positivos y los VEB-negativos. Puesto que el programa de latencia del VEB en estos pacientes parece ser 0 o 1 y, por tanto, no se esperaría expresión de LMP1 ni LMP2, la ausencia de estas proteínas virales podría explicar la expresión equiparable de los *DNMTs* entre pacientes VEB-positivos y negativos. Cabe mencionar que la metilación de H3K4me3 impide la metilación *de novo* por parte de las *DNMT3A/B*(377,378). Puesto que no se han evaluado otras alteraciones epigenéticas, una hipótesis sería que los pacientes VEB-positivos y VEB-negativos podrían presentar distintas conformaciones estructurales de la cromatina. Esto favorecería la actuación de las *DNMT3* en los casos VEB-positivos, lo que explicaría la hipermetilación detectada en comparación con los VEB-negativos sin reconocer cambios en la expresión de los *DNMTs* y *TETs*. Sería de especial interés analizar la acetilación de las histonas y la

Discusión

remodelación de la cromatina en el LPB para completar el mapa de como las alteraciones epigenéticas influyen en la patogénesis del LPB.

Finalmente, para evaluar cómo las alteraciones epigenéticas se asocian a la desregulación de la expresión génica en el LPB, se integraron los estudios de metilación de ADN y de secuenciación del ARN. Las alteraciones en las marcas de metilación del ADN se vincularon con el enriquecimiento de la biogénesis mitocondrial, así como la traducción y metabolismo de las proteínas. Asimismo, nuestros estudios revelan que la sobreexpresión de genes promotores de la mitosis y de inhibidores de la muerte celular, que favorecen la proliferación y supervivencia del LPB, es consecuencia, en parte, de las alteraciones en el patrón de metilación del ADN.

Tal y como ya ha sido implementado en la práctica clínica en otros cánceres, los perfiles de metilación detectados en sangre permiten mejorar el diagnóstico y la predicción del pronóstico de los pacientes(379). Por ello, profundizar en los mecanismos de esta desregulación epigenética, así como su asociación con los parámetros clínicos, puede suponer avances y mejoras en la monitorización de los pacientes con LPB. En este sentido, hemos visto que la hipometilación de las CpGs localizadas en los genes *CDCA8* (cg22449745) y *CDC25C* (cg02236244) que se asocian a la sobreexpresión de estos genes, y la hipometilación *REEP4* (cg16315334) que conlleva una represión de su expresión, tienen un impacto desfavorable en el pronóstico de los pacientes con LPB. *REEP4* es esencial para la correcta segregación cromosómica durante la mitosis, garantizando el reensamblaje de la membrana nuclear durante la división(380). Aunque su papel como biomarcador pronóstico no ha sido ampliamente descrito, parece ser que la hipometilación cg16311504 en dicho gen se asocia a SG inferiores en pacientes con glioma(381). *CDC25C* es un regulador de la transición G2/M y es esencial durante la reparación del ADN. Una expresión elevada de *CDC25C* se ha relacionado con pronósticos desfavorables en diversos cánceres(382,383). En cambio, el valor pronóstico de *CDCA8* ha sido ampliamente descrito en oncología(384–387). Tal y como se ha mencionado en la introducción, *CDCA8* codifica la borealina, elemento fundamental del complejo CPC y diana de

E2F(242). Además, se ha postulado que CDCA8 contribuye a la desregulación del ciclo celular modulando la expresión de *E2F1* y controlando la progresión tumoral en el carcinoma hepatocelular y el glioma(384,387). Es interesante remarcar que altos niveles de CDCA8 y REEP4 parecen desempeñar un papel relevante en los puntos de control inmunológico controlando la infiltración de células inmunitarias(381,385). Según estos trabajos, CDCA8, además de ser importante en la progresión tumoral en el LPB, podría ser un regulador relevante de la evasión del sistema inmune en este linfoma, tal y como se ha descrito en el carcinoma hepatocelular(386).

7. CONCLUSIONES

1. El LPB alberga firmas genéticas propias que permiten la evasión del sistema inmune, cuyo proceso puede ser potenciado por las infecciones por el VIH y el VEB.
2. El eje MYC/miR-150-5p/E2F3/survivina participa en el desarrollo y progresión del LPB, siendo miR-150-5p un supresor tumoral que previene la linfomagénesis mediada por MYC y E2F3.
3. La presencia de la translocación de *MYC* y la infección por el VEB se asocian a modificaciones epigenéticas en los pacientes con LPB.
4. Los FTs MYC y E2F y las modificaciones en el patrón de metilación del ADN conducen a alteraciones transcripcionales que afectan a la progresión del ciclo celular en el LPB, especialmente al punto de control G2/M.
5. E2F3 y MYC participan en la transformación neoplásica de los plasmablastos.
6. Los oncogenes E2F3 y survivina pueden ser potenciales dianas terapéuticas para el tratamiento del LPB.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Dado que los resultados obtenidos en esta tesis únicamente han sido demostrados en un modelo de línea celular de LPB, PBL-1, habría que validarlos en otros modelos. En este sentido, para validar los resultados de E2F3 como promotor de la linfomagénesis en el LPB, se seguirán 2 estrategias. Por un lado, se seleccionará otro clon *knockdown* para *E2F3* y se repetirá la batería de experimentos realizados en el clon seleccionado en esta tesis. Por otro lado, se generarán células PBL-1 *knockdown* para *E2F3* mediante la nucleofección con siARNs contra este gen.

Dado que se dispone de células tumorales criopreservadas de un paciente con LPB, se realizarán con ellas cultivos primarios en los que se testarán los inhibidores HLM006474 y S12. Estas células, además, se inocularán en el modelo de MCA de pollo y se tratarán con 2 inhibidores mencionados. De este modo, se tratará de validar los resultados obtenidos en otro modelo de células de LPB tanto *in vitro* como *in vivo*.

Puesto que unos cultivos primarios es poco probable que sobrevivan tras ser nucleofectadas, la validación de miR-150-5p como supresor tumoral queda descartada en este modelo. Aunque las líneas celulares (KY1-3) establecidas por Matsuki et al. no presentan algunas características estrechamente relacionadas con el LPB a diferencia de las células PBL-1, como son la t-MYC y la infección por el VEB, se está tratando de conseguir estas líneas celulares(95). De esta manera se podrían reproducir los resultados obtenidos en relación con el papel supresor tumoral de miR-150-5p en otras líneas celulares.

Además, sería interesante profundizar en estudiar los mecanismos por los que E2F3 contribuye en la diferenciación de los plasmablastos. Se podría evaluar la relación entre E2F3 y FTs esenciales durante el proceso de diferenciación de las células B, y cómo estas relaciones se ven afectadas en las células E2F3 *knockdown*.

Puesto que, hasta la fecha, la metilación del ADN en el LPB no ha sido descrita, se ampliará el análisis bioinformático de este estudio para ahondar en como el patrón de metilación del ADN desregula la expresión génica en el LPB. Se tratará de describir en mayor profundidad las localizaciones de las CDMs, las distancias

Perspectivas futuras

respecto a los promotores de los genes y cómo la metilación afecta a los FTs, entre otras.

Por último, se ha planteado realizar un estudio de *spatial transcriptomics* con las muestras FFEP disponibles de los casos con LPB incluidos en los estudios transcriptómicos y de metilación del ADN. Por un lado, se podrán tener una visión más precisa de la expresión génica a través de todo el tumor y, por otro lado, se podrán identificar las células presentes en el microambiente, así como su distribución y localización de estas en la muestra tumoral. De esta manera, se podrá obtener un mapa del microambiente del LPB, no explorado por el momento, y evaluar como éste influencia en el desarrollo de este linfoma.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th ed. Vol. 2. International Agency for Research on Cancer (IARC); 2017.
2. De Silva NS, Klein U. Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat Rev Immunol.* marzo de 2015;15(3):137-48.
3. Allen CDC, Okada T, Cyster JG. Germinal-Center Organization and Cellular Dynamics. *Immunity.* 24 de agosto de 2007;27(2):190-202.
4. Young C, Brink R. The unique biology of germinal center B cells. *Immunity.* 10 de agosto de 2021;54(8):1652-64.
5. Natkunam Y. The Biology of the Germinal Center. *Hematology.* 1 de enero de 2007;2007(1):210-5.
6. Chan TD, Brink R. Affinity-based selection and the germinal center response. *Immunol Rev.* mayo de 2012;247(1):11-23.
7. Mlynarczyk C, Fontán L, Melnick A. Germinal center-derived lymphomas: The darkest side of humoral immunity. *Immunol Rev.* 2019;288(1):214-39.
8. Montes-Moreno S, Gonzalez-Medina AR, Rodriguez-Pinilla SM, Maestre L, Sanchez-Verde L, Roncador G, et al. Aggressive large B-cell lymphoma with plasma cell differentiation: immunohistochemical characterization of plasmablastic lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma with partial plasmablastic phenotype. *Haematologica.* agosto de 2010;95(8):1342-9.
9. Vega F, Chang CC, Medeiros LJ, Udden MM, Cho-Vega JH, Lau CC, et al. Plasmablastic lymphomas and plasmablastic plasma cell myelomas have nearly identical immunophenotypic profiles. *Mod Pathol.* 1 de junio de 2005;18(6):806-15.
10. Montes-Moreno S, Martinez-Magunacelaya N, Zecchini-Barrese T, Villambrosía SG de, Linares E, Ranchal T, et al. Plasmablastic lymphoma phenotype is determined by genetic alterations in MYC and PRDM1. *Mod Pathol.* enero de 2017;30(1):85-94.
11. Morscio J, Dierickx D, Nijs J, Verhoef G, Bittoun E, Vanoeteren X, et al. Clinicopathologic Comparison of Plasmablastic Lymphoma in HIV-positive, Immunocompetent, and Posttransplant Patients: Single-center Series of 25 Cases and Meta-analysis of 277 Reported Cases. *Am J Surg Pathol.* julio de 2014;38(7):875.
12. Kumar S, Kimlinger T, Morice W. Immunophenotyping in multiple myeloma and related plasma cell disorders. *Best Pract Res Clin Haematol.* septiembre de 2010;23(3):433-51.
13. Castillo JJ, Bibas M, Miranda RN. The biology and treatment of plasmablastic lymphoma. *Blood.* 4 de septiembre de 2015;125(15):2323-30.
14. Castillo JJ, Winer ES, Stachurski D, Perez K, Jabbour M, Milani C, et al. Clinical and pathological differences between human immunodeficiency virus-positive and human immunodeficiency virus-negative patients with plasmablastic lymphoma. *Leuk Lymphoma.* noviembre de 2010;51(11):2047-53.
15. Tchernonog E, Faurie P, Coppo P, Monjanel H, Bonnet A, Génin MA, et al. Clinical characteristics and prognostic factors of plasmablastic lymphoma patients: analysis of 135 patients from the LYSA group. *Ann Oncol.* 1 de abril de 2017;28(4):843-8.
16. Valera A, Balagué O, Colomo L, Martínez A, Delabie J, Taddesse-Heath L, et al. IG/MYC Rearrangements are the Main Cytogenetic Alteration in Plasmablastic Lymphomas. *Am J Surg Pathol.* noviembre de 2010;34(11):1686-94.
17. Vaubell JI, Sing Y, Ramburan A, Sewram V, Thejpal R, Rapiti N, et al. Pediatric Plasmablastic Lymphoma: A Clinicopathologic Study. *Int J Surg Pathol.* octubre de 2014;22(7):607-16.
18. Carbone A. AIDS-related non-Hodgkin's lymphomas: From pathology and molecular pathogenesis to treatment. *Hum Pathol.* 1 de abril de 2002;33(4):392-404.
19. Verdu-Bou M, Tapia G, Hernandez-Rodriguez A, Navarro JT. Clinical and Therapeutic Implications of Epstein-Barr Virus in HIV-Related Lymphomas. *Cancers.* enero de 2021;13(21):5534.

Bibliografía

20. Delecluse HJ, Anagnostopoulos I, Dallenbach F, Hummel M, Marafioti T, Schneider U, et al. Plasmablastic lymphomas of the oral cavity: a new entity associated with the human immunodeficiency virus infection. *Blood*. 15 de febrero de 1997;89(4):1413-20.
21. Dong HY, Scadden DT, De Leval L, Tang Z, Isaacson PG, Harris NL. Plasmablastic Lymphoma in HIV-Positive Patients: An Aggressive Epstein-Barr Virus-Associated Extramedullary Plasmacytic Neoplasm. *Am J Surg Pathol*. diciembre de 2005;29(12):1633-41.
22. Teruya-Feldstein J, Chiao E, Filippa DA, Lin O, Comenzo R, Coleman M, et al. CD20-negative large-cell lymphoma with plasmablastic features: a clinically heterogenous spectrum in both HIV-positive and -negative patients. *Ann Oncol*. 1 de noviembre de 2004;15(11):1673-9.
23. Hertel N, Merz H, Bernd HW, Bernard V, Künstner A, Busch H, et al. Performance of international prognostic indices in plasmablastic lymphoma: a comparative evaluation. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1 de octubre de 2021;147(10):3043-50.
24. Chien N, Villa D, Freeman CL, Slack GW, Savage KJ, Scott DW, et al. Characteristics and Treatment Outcomes of Plasmablastic Lymphoma in British Columbia (BC). *Blood*. 5 de noviembre de 2020;136(Supplement 1):17-8.
25. Greipp PR, Raymond NM, Kyle RA, O'Fallon WM. Multiple Myeloma: Significance of Plasmablastic Subtype in Morphological Classification. *Blood*. 1 de febrero de 1985;65(2):305-10.
26. Chang ST, Liao YL, Lu CL, Chuang SS, Li CY. Plasmablastic cytomorphologic features in plasma cell neoplasms in immunocompetent patients are significantly associated with EBV. *Am J Clin Pathol*. agosto de 2007;128(2):339-44.
27. Leopold G, Dotlic S, Mahdi A, Pugh M, Dojcinov S. Differential diagnosis of aggressive neoplasms with plasmablastic and late post-follicular differentiation. *Diagn Histopathol*. 1 de septiembre de 2020;26(9):421-39.
28. Boulanger E, Gérard L, Gabarre J, Molina JM, Rapp C, Abino JF, et al. Prognostic factors and outcome of human herpesvirus 8-associated primary effusion lymphoma in patients with AIDS. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 de julio de 2005;23(19):4372-80.
29. Hu Z, Pan Z, Chen W, Shi Y, Wang W, Yuan J, et al. Primary Effusion Lymphoma: A Clinicopathological Study of 70 Cases. *Cancers*. 19 de febrero de 2021;13(4):878.
30. Bower M, Pria AD, Coyle C, Nelson M, Naresh K. Diagnostic Criteria Schemes for Multicentric Castleman Disease in 75 Cases. *JAIDS J Acquir Immune Defic Syndr*. 1 de febrero de 2014;65(2):e80.
31. Horn H, Staiger AM, Vöhringer M, Hay U, Campo E, Rosenwald A, et al. Diffuse Large B-cell Lymphomas of Immunoblastic Type Are a Major Reservoir for MYC-IGH Translocations. *Am J Surg Pathol*. enero de 2015;39(1):61.
32. Laurent C, Do C, Gascoyne RD, Lamant L, Ysebaert L, Laurent G, et al. Anaplastic Lymphoma Kinase-Positive Diffuse Large B-Cell Lymphoma: A Rare Clinicopathologic Entity With Poor Prognosis. *J Clin Oncol*. septiembre de 2009;27(25):4211-6.
33. Bailly J, Jenkins N, Chetty D, Mohamed Z, Verburgh ER, Opie JJ. Plasmablastic lymphoma: An update. *Int J Lab Hematol*. 2022;44(S1):54-63.
34. Bibas M. Plasmablastic Lymphoma. A State-of-the-Art Review: Part 1-Epidemiology, Pathogenesis, Clinicopathologic Characteristics, Differential Diagnosis, Prognostic Factors, and Special Populations. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 1 de enero de 2024;16(1):e2024007.
35. Castillo JJ, Furman M, Beltrán BE, Bibas M, Bower M, Chen W, et al. Human immunodeficiency virus-associated plasmablastic lymphoma. *Cancer*. 2012;118(21):5270-7.
36. Sausen DG, Basith A, Muqeemuddin S. EBV and Lymphomagenesis. *Cancers*. 4 de abril de 2023;15(7):2133.
37. Loghavi S, Alayed K, Aladily TN, Zuo Z, Ng SB, Tang G, et al. Stage, age, and EBV status impact outcomes of plasmablastic lymphoma patients: a clinicopathologic analysis of 61 patients. *J Hematol Oncol J Hematol Oncol*. 10 de junio de 2015;8:65.

38. Quintanilla-Martinez L. The 2016 updated WHO classification of lymphoid neoplasias. *Hematol Oncol.* 2017;35(S1):37-45.
39. Mine S, Hishima T, Suganuma A, Fukumoto H, Sato Y, Kataoka M, et al. Interleukin-6-dependent growth in a newly established plasmablastic lymphoma cell line and its therapeutic targets. *Sci Rep.* 31 de agosto de 2017;7(1):10188.
40. Wang R, Wang J, Zhang N, Wan Y, Liu Y, Zhang L, et al. The interaction between Vav1 and EBNA1 promotes survival of Burkitt's lymphoma cells by down-regulating the expression of Bim. *Biochem Biophys Res Commun.* 16 de abril de 2019;511(4):787-93.
41. Gnanasundram SV, Pyndiah S, Daskalogianni C, Armfield K, Nylander K, Wilson JB, et al. PI3K δ activates E2F1 synthesis in response to mRNA translation stress. *Nat Commun.* 13 de diciembre de 2017;8:2103.
42. Ambrosio MR, Mundo L, Gazaneo S, Piccolini M, Vara PS, Sayed S, et al. MicroRNAs sequencing unveils distinct molecular subgroups of plasmablastic lymphoma. *Oncotarget.* 31 de octubre de 2017;8(64):107356-73.
43. Liu Z, Filip I, Gomez K, Engelbrecht D, Meer S, Laloo PN, et al. Genomic Characterization of HIV-Associated Plasmablastic Lymphoma Identifies Pervasive Mutations in the JAK-STAT Pathway. *Blood Cancer Discov.* 1 de julio de 2020;1(1):112-25.
44. Ma SD, Hegde S, Young KH, Sullivan R, Rajesh D, Zhou Y, et al. A New Model of Epstein-Barr Virus Infection Reveals an Important Role for Early Lytic Viral Protein Expression in the Development of Lymphomas. *J Virol.* enero de 2011;85(1):165-77.
45. Forte E, Luftig MA. The role of microRNAs in Epstein-Barr virus latency and lytic reactivation. *Microbes Infect Inst Pasteur.* diciembre de 2011;13(14-15):1156-67.
46. Židovec Lepej S, Matulić M, Gršković P, Pavlica M, Radmanić L, Korać P. miRNAs: EBV Mechanism for Escaping Host's Immune Response and Supporting Tumorigenesis. *Pathogens.* 8 de mayo de 2020;9(5):353.
47. Wang M, Yu F, Wu W, Wang Y, Ding H, Qian L. Epstein-Barr virus-encoded microRNAs as regulators in host immune responses. *Int J Biol Sci.* 5 de abril de 2018;14(5):565-76.
48. Vereide DT, Seto E, Chiu YF, Hayes M, Tagawa T, Grundhoff A, et al. Epstein-Barr virus maintains lymphomas via its miRNAs. *Oncogene.* 6 de marzo de 2014;33(10):1258-64.
49. Cristino AS, Nourse J, West RA, Sabdia MB, Law SC, Gunawardana J, et al. EBV microRNA-BHRF1-2-5p targets the 3'UTR of immune checkpoint ligands PD-L1 and PD-L2. *Blood.* 19 de diciembre de 2019;134(25):2261-70.
50. Yoon CJ, Chang MS, Kim DH, Kim W, Koo BK, Yun SC, et al. Epstein-Barr virus-encoded miR-BART5-5p upregulates PD-L1 through PIAS3/pSTAT3 modulation, worsening clinical outcomes of PD-L1-positive gastric carcinomas. *Gastric Cancer.* 1 de septiembre de 2020;23(5):780-95.
51. Wang J, Ge J, Wang Y, Xiong F, Guo J, Jiang X, et al. EBV miRNAs BART11 and BART17-3p promote immune escape through the enhancer-mediated transcription of PD-L1. *Nat Commun.* 14 de febrero de 2022;13(1):866.
52. Laurent C, Fabiani B, Do C, Tchernonog E, Cartron G, Gravelle P, et al. Immune-checkpoint expression in Epstein-Barr virus positive and negative plasmablastic lymphoma: a clinical and pathological study in 82 patients. *Haematologica.* agosto de 2016;101(8):976-84.
53. Gravelle P, Péricart S, Tosolini M, Fabiani B, Coppo P, Amara N, et al. EBV infection determines the immune hallmarks of plasmablastic lymphoma. *Oncoimmunology.* 30 de julio de 2018;7(10):e1486950.
54. Rensing ME, van Gent M, Gram AM, Hooykaas MJG, Piersma SJ, Wiertz EJHJ. Immune Evasion by Epstein-Barr Virus. En: Münz C, editor. *Epstein Barr Virus Volume 2: One Herpes Virus: Many Diseases* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2015 [citado 3 de abril de 2024]. p. 355-81. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-3-319-22834-1_12
55. Frontzek F, Hailfinger S, Lenz G. Plasmablastic lymphoma: from genetics to treatment. *Leuk Lymphoma.* 21 de marzo de 2023;64(4):799-807.

Bibliografía

56. Frontzek F, Staiger AM, Zapukhlyak M, Xu W, Bonzheim I, Borgmann V, et al. Molecular and functional profiling identifies therapeutically targetable vulnerabilities in plasmablastic lymphoma. *Nat Commun.* 31 de agosto de 2021;12(1):5183.
57. Klapproth K, Wirth T. Advances in the understanding of MYC-induced lymphomagenesis. *Br J Haematol.* mayo de 2010;149(4):484-97.
58. Korać P, Dotlić S, Matulić M, Zajc Petranović M, Dominis M. Role of MYC in B Cell Lymphomagenesis. *Genes.* 4 de abril de 2017;8(4):115.
59. Nguyen L, Papenhausen P, Shao H. The Role of c-MYC in B-Cell Lymphomas: Diagnostic and Molecular Aspects. *Genes.* 5 de abril de 2017;8(4):116.
60. Finkin S, Hartweg H, Oliveira TY, Kara EE, Nussenzweig MC. Protein Amounts of the MYC Transcription Factor Determine Germinal Center B Cell Division Capacity. *Immunity.* 20 de agosto de 2019;51(2):324-336.e5.
61. Reimold AM, Iwakoshi NN, Manis J, Vallabhajosyula P, Szomolanyi-Tsuda E, Gravalles EM, et al. Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature.* julio de 2001;412(6844):300-7.
62. Lin KI, Angelin-Duclos C, Kuo TC, Calame K. Blimp-1-Dependent Repression of Pax-5 Is Required for Differentiation of B Cells to Immunoglobulin M-Secreting Plasma Cells. *Mol Cell Biol.* julio de 2002;22(13):4771-80.
63. Klein U, Casola S, Cattoretti G, Shen Q, Lia M, Mo T, et al. Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination. *Nat Immunol.* julio de 2006;7(7):773-82.
64. Pather S, Mashale T, Willem P, Patel M, Perner Y, Motaung M, et al. MYC status in HIV-associated plasmablastic lymphoma: dual-colour CISH, FISH and immunohistochemistry. *Histopathology.* 2021;79(1):86-95.
65. Witte HM, Hertel N, Merz H, Bernd HW, Bernard V, Stölting S, et al. Clinicopathological characteristics and MYC status determine treatment outcome in plasmablastic lymphoma: a multi-center study of 76 consecutive patients. *Blood Cancer J.* 29 de mayo de 2020;10(5):1-5.
66. Witte HM, Künstner A, Hertel N, Bernd HW, Bernard V, Stölting S, et al. Integrative genomic and transcriptomic analysis in plasmablastic lymphoma identifies disruption of key regulatory pathways. *Blood Adv.* 21 de enero de 2022;6(2):637-51.
67. Ramis-Zaldivar JE, Gonzalez-Farre B, Nicolae A, Pack S, Clot G, Nadeu F, et al. MAPK and JAK-STAT pathways dysregulation in plasmablastic lymphoma. *Haematologica.* 6 de mayo de 2021;106(10):2682-93.
68. Salghetti SE, Young Kim S, Tansey WP. Destruction of Myc by ubiquitin-mediated proteolysis: cancer-associated and transforming mutations stabilize Myc. *EMBO J.* febrero de 1999;18(3):717-26.
69. Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA. The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci.* 15 de marzo de 2004;117(8):1281-3.
70. Vainchenker W, Constantinescu SN. JAK/STAT signaling in hematological malignancies. *Oncogene.* mayo de 2013;32(21):2601-13.
71. Garcia-Reyero J, Magunacelaya NM, de Villambrosia SG, Loghavi S, Mediavilla AG, Tonda R, et al. Genetic lesions in MYC and STAT3 drive oncogenic transcription factor overexpression in plasmablastic lymphoma. *Haematologica.* 9 de abril de 2020;106(4):1120-8.
72. Santaripa L, Lippman SM, El-Naggar AK. Targeting the MAPK–RAS–RAF signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets.* 1 de enero de 2012;16(1):103-19.
73. Kovall RA, Gebelein B, Sprinzak D, Kopan R. The Canonical Notch Signaling Pathway: Structural and Biochemical Insights into Shape, Sugar, and Force. *Dev Cell.* 8 de mayo de 2017;41(3):228-41.
74. Arruga F, Vaisitti T, Deaglio S. The NOTCH Pathway and Its Mutations in Mature B Cell Malignancies. *Front Oncol [Internet].* 26 de noviembre de 2018 [citado 28 de marzo de 2024];8.

- Disponible en:
<https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2018.00550/full>
75. Oswald F, Kostezka U, Astrahantseff K, Bourteele S, Dillinger K, Zechner U, et al. SHARP is a novel component of the Notch/RBP-J κ signalling pathway. *EMBO J.* 15 de octubre de 2002;21(20):5417-26.
 76. Zheng L, Conner SD. PI3P4Ky functions in DTX1-mediated Notch signaling. *Proc Natl Acad Sci.* 27 de febrero de 2018;115(9):E1983-90.
 77. Capece D, Verzella D, Flati I, Arboretto P, Cornice J, Franzoso G. NF- κ B: blending metabolism, immunity, and inflammation. *Trends Immunol.* 1 de septiembre de 2022;43(9):757-75.
 78. Oren M, Prives C. p53: A tale of complexity and context. *Cell.* 28 de marzo de 2024;187(7):1569-73.
 79. Shaffer AL, Lin KI, Kuo TC, Yu X, Hurt EM, Rosenwald A, et al. Blimp-1 Orchestrates Plasma Cell Differentiation by Extinguishing the Mature B Cell Gene Expression Program. *Immunity.* 1 de julio de 2002;17(1):51-62.
 80. Chen C, Zhao S, Karnad A, Freeman JW. The biology and role of CD44 in cancer progression: therapeutic implications. *J Hematol Oncol J Hematol Oncol.* 10 de mayo de 2018;11:64.
 81. Dominguez PM, Ghamlouch H, Rosikiewicz W, Kumar P, Béguelin W, Fontán L, et al. TET2 deficiency causes germinal center hyperplasia, impairs plasma cell differentiation and promotes B-cell lymphomagenesis. *Cancer Discov.* diciembre de 2018;8(12):1632-53.
 82. Wright GW, Huang DW, Phelan JD, Coulibaly ZA, Roulland S, Young RM, et al. A Probabilistic Classification Tool for Genetic Subtypes of Diffuse Large B Cell Lymphoma with Therapeutic Implications. *Cancer Cell.* 13 de abril de 2020;37(4):551-568.e14.
 83. Meyer C, Larghero P, Almeida Lopes B, Burmeister T, Gröger D, Sutton R, et al. The KMT2A recombinome of acute leukemias in 2023. *Leukemia.* mayo de 2023;37(5):988-1005.
 84. Schommers P, Wyen C, Hentrich M, Gillor D, Zoufaly A, Jensen B, et al. Poor outcome of HIV-infected patients with plasmablastic lymphoma: results from the German AIDS-related lymphoma cohort study. *AIDS.* 13 de marzo de 2013;27(5):842.
 85. Castillo JJ, Guerrero-García T, Baldini F, Tchernonog E, Cartron G, Ninkovic S, et al. Bortezomib plus EPOCH is effective as frontline treatment in patients with plasmablastic lymphoma. *Br J Haematol.* 2019;184(4):679-82.
 86. Florindez JA, Alderuccio JP, Reis IM, Lossos IS. Survival analysis in treated plasmablastic lymphoma patients: a population-based study. *Am J Hematol.* 2020;95(11):1344-51.
 87. Di Ciaccio PR, Polizzotto MN, Cwynarski K, Burton C, Jiamsakul A, Bower M, et al. Survival Outcomes for Plasmablastic Lymphoma: An International, Multicentre Study By the Australasian Lymphoma Alliance. *Blood.* 5 de noviembre de 2020;136(Supplement 1):1-2.
 88. Hansen AR, Vardell VA, Fitzgerald LA. Epidemiologic Characteristics, Treatment Patterns, and Survival Analysis of Plasmablastic Lymphoma in the United States: A SEER and NCDB Analysis. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk [Internet].* 25 de diciembre de 2023 [citado 26 de marzo de 2024];0(0). Disponible en: [https://www.clinical-lymphoma-myeloma-leukemia.com/article/S2152-2650\(23\)02214-0/abstract](https://www.clinical-lymphoma-myeloma-leukemia.com/article/S2152-2650(23)02214-0/abstract)
 89. Castillo JJ, Winer ES, Stachurski D, Perez K, Jabbour M, Milani C, et al. Clinical and pathological differences between human immunodeficiency virus-positive and human immunodeficiency virus-negative patients with plasmablastic lymphoma. *Leuk Lymphoma.* noviembre de 2010;51(11):2047-53.
 90. Castillo JJ, Winer ES, Stachurski D, Perez K, Jabbour M, Milani C, et al. Prognostic Factors in Chemotherapy-Treated Patients with HIV-Associated Plasmablastic Lymphoma. *The Oncologist.* marzo de 2010;15(3):293-9.
 91. Castillo J, Pantanowitz L, Dezube BJ. HIV-associated plasmablastic lymphoma: Lessons learned from 112 published cases. *Am J Hematol.* 2008;83(10):804-9.
 92. Pinnix CC, Shah JJ, Chuang H, Costelloe CM, Medeiros LJ, Wogan CF, et al. Doxorubicin-Based Chemotherapy and Radiation Therapy Produces Favorable Outcomes in Limited-Stage

Bibliografía

- Plasmablastic Lymphoma: A Single-Institution Review. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* marzo de 2016;16(3):122-8.
93. Dittus C, Grover N, Ellsworth S, Tan X, Park SI. Bortezomib in combination with dose-adjusted EPOCH (etoposide, prednisone, vincristine, cyclophosphamide, and doxorubicin) induces long-term survival in patients with plasmablastic lymphoma: a retrospective analysis. *Leuk Lymphoma.* 2 de septiembre de 2018;59(9):2121-7.
 94. Castillo JJ, Reagan JL, Sikov WM, Winer ES. Bortezomib in combination with infusional dose-adjusted EPOCH for the treatment of plasmablastic lymphoma. *Br J Haematol.* mayo de 2015;169(3):352-5.
 95. Matsuki E, Miyakawa Y, Asakawa S, Tsukada Y, Yamada T, Yokoyama K, et al. Identification of Loss of p16 Expression and Upregulation of MDR-1 as Genetic Events Resulting from Two Novel Chromosomal Translocations Found in a Plasmablastic Lymphoma of the Uterus. *Clin Cancer Res.* 14 de abril de 2011;17(8):2101-9.
 96. Atallah-Yunes SA, Murphy D, Abdelmalak R, Mantle L, Ali SS. Plasmablastic lymphoma achieving sustained remission with antiretroviral therapy alone. *Eur J Haematol.* 2019;103(6):620-2.
 97. Mai B, Wang W, Lin M, Hu S, Wang XI, Chen L, et al. HIV-associated plasmablastic lymphoma in the era of HAART: a single-center experience of 21 patients. *AIDS.* 1 de octubre de 2020;34(12):1735.
 98. Koizumi Y, Uehira T, Ota Y, Ogawa Y, Yajima K, Tanuma J, et al. Clinical and pathological aspects of human immunodeficiency virus-associated plasmablastic lymphoma: analysis of 24 cases. *Int J Hematol.* diciembre de 2016;104(6):669-81.
 99. Noy A, Lensing SY, Moore PC, Gupta N, Aboulafia D, Ambinder R, et al. Plasmablastic Lymphoma is Treatable in the HAART Era. A 10 year Retrospective by the AIDS Malignancy Consortium (AMC). *Leuk Lymphoma.* julio de 2016;57(7):1731-4.
 100. Makady NF, Ramzy D, Ghaly R, Abdel-Malek RR, Shohdy KS. The Emerging Treatment Options of Plasmablastic Lymphoma: Analysis of 173 Individual Patient Outcomes. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 1 de marzo de 2021;21(3):e255-63.
 101. Patel K, Feng L, Oki Y, Qazilbash M, Muzzafar T, Weber DM, et al. Plasmablastic Lymphoma: 28 Patient Single Institution Experience. *Blood.* 15 de noviembre de 2013;122(21):4310.
 102. Dunleavy K, Fanale MA, Abramson JS, Noy A, Caimi PF, Pittaluga S, et al. A Prospective Multicenter Phase 2 Study of Dose-Adjusted-EPOCH-R in Untreated MYC-Rearranged Aggressive B-cell Lymphoma. *Lancet Haematol.* diciembre de 2018;5(12):e609-17.
 103. Chapuy B, Cheng H, Watahiki A, Ducar MD, Tan Y, Chen L, et al. Diffuse large B-cell lymphoma patient-derived xenograft models capture the molecular and biological heterogeneity of the disease. *Blood.* 5 de mayo de 2016;127(18):2203-13.
 104. Schmit JM, DeLaune J, Norkin M, Grosbach A. A Case of Plasmablastic Lymphoma Achieving Complete Response and Durable Remission after Lenalidomide-Based Therapy. *Oncol Res Treat.* 2017;40(1-2):46-8.
 105. Yanamandra U, Sahu KK, Jain N, Prakash G, Saikia U, Malhotra P. Plasmablastic lymphoma: successful management with CHOP and lenalidomide in resource constraint settings. *Ann Hematol.* octubre de 2016;95(10):1715-7.
 106. Ricker EC, Ryu YK, Amengual JE. Daratumumab Plus Chemotherapy Induces Complete Responses in a Consecutive Series of Four Patients with Plasmablastic Lymphoma. *Blood.* 23 de noviembre de 2021;138:4573.
 107. Damlaj M, Alzayed M, Alahmari B, Alhejazi A, Alaskar A, Alzahrani M. Therapeutic Potential of Checkpoint Inhibitors in Refractory Plasmablastic Lymphoma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* octubre de 2019;19(10):e559-63.
 108. Lurain K, Ramaswami R, Mangusan R, Widell A, Ekwede I, George J, et al. Use of pembrolizumab with or without pomalidomide in HIV-associated non-Hodgkin's lymphoma. *J Immunother Cancer.* 1 de febrero de 2021;9(2):e002097.

109. Chapman J, Gentles AJ, Sujoy V, Vega F, Dumur CI, Blevins TL, et al. Gene expression analysis of plasmablastic lymphoma identifies downregulation of B-cell receptor signaling and additional unique transcriptional programs. *Leukemia*. noviembre de 2015;29(11):2270-3.
110. Ramis-Zaldivar JE, Gonzalez-Farre B, Nicolae A, Pack S, Clot G, Nadeu F, et al. MAP-kinase and JAK-STAT pathways dysregulation in plasmablastic lymphoma. *Haematologica* [Internet]. 2020 [citado 13 de septiembre de 2021]; Disponible en: <https://haematologica.org/article/view/haematol.2020.271957>
111. Liu Z, Filip I, Gomez K, Engelbrecht D, Meer S, Lalloo PN, et al. Genomic Characterization of HIV-Associated Plasmablastic Lymphoma Identifies Pervasive Mutations in the JAK-STAT Pathway. *Blood Cancer Discov*. 1 de julio de 2020;1(1):112-25.
112. Witte HM, Künstner A, Hertel N, Bernd HW, Bernard V, Stölting S, et al. Integrative genomic and transcriptomic analysis in plasmablastic lymphoma identifies disruption of key regulatory pathways. *Blood Adv*. 21 de enero de 2022;6(2):637-51.
113. Tempera I, Leo AD, Kossenkov AV, Cesaroni M, Song H, Dawany N, et al. Identification of MEF2B, EBF1, and IL6R as Direct Gene Targets of Epstein-Barr Virus (EBV) Nuclear Antigen 1 Critical for EBV-Infected B-Lymphocyte Survival. *J Virol*. 1 de enero de 2016;90(1):345.
114. Cheng Y, He C, Wang M, Ma X, Mo F, Yang S, et al. Targeting epigenetic regulators for cancer therapy: mechanisms and advances in clinical trials. *Signal Transduct Target Ther*. 17 de diciembre de 2019;4(1):1-39.
115. Yang J, Xu J, Wang W, Zhang B, Yu X, Shi S. Epigenetic regulation in the tumor microenvironment: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Signal Transduct Target Ther*. 22 de mayo de 2023;8(1):1-26.
116. Jonas S, Izaurralde E. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat Rev Genet*. julio de 2015;16(7):421-33.
117. Peng Y, Croce CM. The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduct Target Ther*. 28 de enero de 2016;1(1):1-9.
118. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. agosto de 2014;15(8):509-24.
119. Kolhe R, Rojiani A, Jillella A, Kota V. miRNA Expression Profiling of Plasmablastic Lymphoma: Upregulation of mir-196a Shedding New Insight Into Disease Biology and aggressive Clinicopathologic Behavior. *Am J Clin Pathol*. 1 de noviembre de 2012;138(suppl_2):A214.
120. Xiao C, Calado DP, Galler G, Thai TH, Patterson HC, Wang J, et al. MiR-150 Controls B Cell Differentiation by Targeting the Transcription Factor c-Myb. *Cell*. 5 de octubre de 2007;131(1):146-59.
121. Zhou B, Wang S, Mayr C, Bartel DP, Lodish HF. miR-150, a microRNA expressed in mature B and T cells, blocks early B cell development when expressed prematurely. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 24 de abril de 2007;104(17):7080-5.
122. Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, Sewer A, Iovino N, Aravin A, et al. A Mammalian microRNA Expression Atlas Based on Small RNA Library Sequencing. *Cell*. 29 de junio de 2007;129(7):1401-14.
123. Musilova K, Devan J, Cerna K, Seda V, Pavlasova G, Sharma S, et al. miR-150 downregulation contributes to the high-grade transformation of follicular lymphoma by upregulating FOXP1 levels. *Blood*. 29 de noviembre de 2018;132(22):2389-400.
124. Liu F, Di Wang X. miR-150-5p represses TP53 tumor suppressor gene to promote proliferation of colon adenocarcinoma. *Sci Rep*. 1 de mayo de 2019;9:6740.
125. Sugita BM, Rodriguez Y, Fonseca AS, Nunes Souza E, Kallakury B, Cavalli IJ, et al. MiR-150-5p Overexpression in Triple-Negative Breast Cancer Contributes to the In Vitro Aggressiveness of This Breast Cancer Subtype. *Cancers*. 26 de abril de 2022;14(9):2156.
126. Suetsugu T, Koshizuka K, Seki N, Mizuno K, Okato A, Arai T, et al. Downregulation of matrix metalloproteinase 14 by the antitumor miRNA, miR-150-5p, inhibits the aggressiveness of lung squamous cell carcinoma cells. *Int J Oncol*. 1 de marzo de 2018;52(3):913-24.

Bibliografía

127. Dai FQ, Li CR, Fan XQ, Tan L, Wang RT, Jin H. miR-150-5p Inhibits Non-Small-Cell Lung Cancer Metastasis and Recurrence by Targeting HMGA2 and β -Catenin Signaling. *Mol Ther - Nucleic Acids*. 7 de junio de 2019;16:675-85.
128. Ameri A, Ahmed HM, Pecho RDC, Arabnozari H, Sarabadani H, Esbati R, et al. Diverse activity of miR-150 in Tumor development: shedding light on the potential mechanisms. *Cancer Cell Int*. 3 de noviembre de 2023;23(1):261.
129. Mizuno K, Tanigawa K, Misono S, Suetsugu T, Sanada H, Uchida A, et al. Regulation of Oncogenic Targets by Tumor-Suppressive miR-150-3p in Lung Squamous Cell Carcinoma. *Biomedicines*. diciembre de 2021;9(12):1883.
130. Chen X, Xu X, Pan B, Zeng K, Xu M, Liu X, et al. miR-150-5p suppresses tumor progression by targeting VEGFA in colorectal cancer. *Aging*. 26 de noviembre de 2018;10(11):3421-37.
131. Zhang Q, Zhou X, Wan M, Zeng X, Luo J, Xu Y, et al. FoxP3-miR-150-5p/3p suppresses ovarian tumorigenesis via an IGF1R/IRS1 pathway feedback loop. *Cell Death Dis*. 15 de marzo de 2021;12(3):1-16.
132. Lyko F. The DNA methyltransferase family: a versatile toolkit for epigenetic regulation. *Nat Rev Genet*. febrero de 2018;19(2):81-92.
133. Wu X, Zhang Y. TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. *Nat Rev Genet*. septiembre de 2017;18(9):517-34.
134. Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet*. julio de 2012;13(7):484-92.
135. Zhu H, Wang G, Qian J. Transcription factors as readers and effectors of DNA methylation. *Nat Rev Genet*. septiembre de 2016;17(9):551-65.
136. Holliday R, Pugh JE. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science*. 24 de enero de 1975;187(4173):226-32.
137. Grossmann V, Haferlach C, Weissmann S, Roller A, Schindela S, Poetzinger F, et al. The molecular profile of adult T-cell acute lymphoblastic leukemia: Mutations in RUNX1 and DNMT3A are associated with poor prognosis in T-ALL. *Genes Chromosomes Cancer*. 2013;52(4):410-22.
138. Leonard S, Wei W, Anderton J, Vockerodt M, Rowe M, Murray PG, et al. Epigenetic and Transcriptional Changes Which Follow Epstein-Barr Virus Infection of Germinal Center B Cells and Their Relevance to the Pathogenesis of Hodgkin's Lymphoma ∇ . *J Virol*. septiembre de 2011;85(18):9568-77.
139. Poole CJ, Zheng W, Lodh A, Yevtodiyenko A, Liefwalker D, Li H, et al. DNMT3B overexpression contributes to aberrant DNA methylation and MYC-driven tumor maintenance in T-ALL and Burkitt's lymphoma. *Oncotarget*. 10 de agosto de 2017;8(44):76898-920.
140. Robaina MC, Mazzoccoli L, Arruda VO, Reis FR de S, Apa AG, de Rezende LMM, et al. Dereglulation of DNMT1, DNMT3B and miR-29s in Burkitt lymphoma suggests novel contribution for disease pathogenesis. *Exp Mol Pathol*. 1 de abril de 2015;98(2):200-7.
141. Feng Y, Li X, Cassady K, Zou Z, Zhang X. TET2 Function in Hematopoietic Malignancies, Immune Regulation, and DNA Repair. *Front Oncol*. 2 de abril de 2019;9:210.
142. Joshi K, Zhang L, Breslin S.J. P, Kini AR, Zhang J. Role of TET dioxygenases in the regulation of both normal and pathological hematopoiesis. *J Exp Clin Cancer Res*. 7 de octubre de 2022;41(1):294.
143. Pandey S, Robertson ES. Oncogenic Epstein-Barr virus recruits Nm23-H1 to regulate chromatin modifiers. *Lab Invest J Tech Methods Pathol*. febrero de 2018;98(2):258-68.
144. Luo X, Hong L, Cheng C, Li N, Zhao X, Shi F, et al. DNMT1 mediates metabolic reprogramming induced by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 and reversed by grifolin in nasopharyngeal carcinoma. *Cell Death Dis*. 23 de mayo de 2018;9(6):619.
145. Shi F, Zhou M, Shang L, Du Q, Li Y, Xie L, et al. EBV(LMP1)-induced metabolic reprogramming inhibits necroptosis through the hypermethylation of the RIP3 promoter. *Theranostics*. 13 de abril de 2019;9(9):2424-38.

146. Guo R, Zhang Y, Teng M, Jiang C, Schineller M, Zhao B, et al. DNA Methylation Enzymes and PRC1 Restrict B-cell Epstein-Barr Virus Oncoprotein Expression. *Nat Microbiol.* agosto de 2020;5(8):1051-63.
147. Song H, Zhang Y, Liu J, Liu W, Luo B. Activation of DNA methyltransferase 3a by Epstein-Barr nuclear antigen 1 in gastric carcinoma. *Dig Liver Dis.* 1 de julio de 2022;54(7):973-83.
148. Zhang L, Wang R, Xie Z. The roles of DNA methylation on the promotor of the Epstein-Barr virus (EBV) gene and the genome in patients with EBV-associated diseases. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2022;106(12):4413-26.
149. Howard: andS. R. Pelc. 1953. Synthesis of desoxy-ribonucl... - Google Scholar [Internet]. [citado 4 de abril de 2024]. Disponible en: https://scholar.google.com/scholar_lookup?hl=en&volume=6&publication_year=1953&pages=261-273&journal=Heredity&author=Howard+A&author=Pelc+S&title=Synthesis+of+deoxyribonucleic+acid+in+normal+and+irradiated+cells+and+its+relation+to+chromosome+breakage
150. Howard A, Pelc SR. Synthesis of Nucleoprotein in Bean Root Cells. *Nature.* abril de 1951;167(4250):599-600.
151. Patt HM, Quastler H. Radiation Effects on Cell Renewal and Related Systems. *Physiol Rev.* julio de 1963;43(3):357-96.
152. Morgan DO. *The Cell Cycle: Principles of Control.* New Science Press; 2007. 328 p.
153. Paweletz N. Walther Flemming: pioneer of mitosis research. *Nat Rev Mol Cell Biol.* enero de 2001;2(1):72-5.
154. Voorhees JJ, Duell EA, Chambers DA, Marcelo CL. Regulation of Cell Cycles. *J Invest Dermatol.* 1 de julio de 1976;67(1):15-9.
155. Cheung TH, Rando TA. Molecular regulation of stem cell quiescence. *Nat Rev Mol Cell Biol.* junio de 2013;14(6):10.1038/nrm3591.
156. Peter M, Herskowitz I. Joining the complex: Cyclin-dependent kinase inhibitory proteins and the cell cycle. *Cell.* 21 de octubre de 1994;79(2):181-4.
157. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Extracellular Control of Cell Division, Cell Growth, and Apoptosis. En: *Molecular Biology of the Cell* 4th edition [Internet]. Garland Science; 2002 [citado 4 de abril de 2024]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26877/>
158. Pardee AB. A Restriction Point for Control of Normal Animal Cell Proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* abril de 1974;71(4):1286-90.
159. Yao G, Lee TJ, Mori S, Nevins JR, You L. A bistable Rb-E2F switch underlies the restriction point. *Nat Cell Biol.* abril de 2008;10(4):476-82.
160. Müller L, Gutschner T, Hatzfeld M. Going only half the way: cell cycle exit after the G1 restriction point. *Signal Transduct Target Ther.* 1 de diciembre de 2023;8(1):1-2.
161. Zetterberg A, Larsson O. Kinetic analysis of regulatory events in G1 leading to proliferation or quiescence of Swiss 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* agosto de 1985;82(16):5365-9.
162. Cornwell JA, Crncec A, Afifi MM, Tang K, Amin R, Cappell SD. Loss of CDK4/6 activity in S/G2 phase leads to cell cycle reversal. *Nature.* julio de 2023;619(7969):363-70.
163. Malumbres M, Harlow E, Hunt T, Hunter T, Lahti JM, Manning G, et al. Cyclin-dependent kinases: a family portrait. *Nat Cell Biol.* noviembre de 2009;11(11):1275-6.
164. Cao L, Chen F, Yang X, Xu W, Xie J, Yu L. Phylogenetic analysis of CDK and cyclin proteins in premetazoan lineages. *BMC Evol Biol.* 17 de enero de 2014;14(1):10.
165. Lew DJ, Dulić V, Reed SI. Isolation of three novel human cyclins by rescue of G1 cyclin (cln) function in yeast. *Cell.* 20 de septiembre de 1991;66(6):1197-206.
166. Malumbres M. Cyclin-dependent kinases. *Genome Biol.* 2014;15(6):122.
167. Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature.* diciembre de 1993;366(6456):701-4.

Bibliografía

168. Roussel MF. The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer. *Oncogene*. septiembre de 1999;18(38):5311-7.
169. Cánepa ET, Scassa ME, Ceruti JM, Marazita MC, Carcagno AL, Sirkin PF, et al. INK4 proteins, a family of mammalian CDK inhibitors with novel biological functions. *IUBMB Life*. 2007;59(7):419-26.
170. Nakayama K ichi, Nakayama K. Cip/Kip cyclin-dependent kinase inhibitors: brakes of the cell cycle engine during development. *BioEssays*. 1998;20(12):1020-9.
171. Vodermaier HC. APC/C and SCF: Controlling Each Other and the Cell Cycle. *Curr Biol*. 21 de septiembre de 2004;14(18):R787-96.
172. Matsumoto ML, Wickliffe KE, Dong KC, Yu C, Bosanac I, Bustos D, et al. K11-Linked Polyubiquitination in Cell Cycle Control Revealed by a K11 Linkage-Specific Antibody. *Mol Cell*. 13 de agosto de 2010;39(3):477-84.
173. Jang SM, Redon CE, Thakur BL, Bahta MK, Aladjem MI. Regulation of cell cycle drivers by Cullin-RING ubiquitin ligases. *Exp Mol Med*. 2 de octubre de 2020;52(10):1637-51.
174. DeGregori J, Kowalik T, Nevins JR. Cellular targets for activation by the E2F1 transcription factor include DNA synthesis- and G1/S-regulatory genes. *Mol Cell Biol*. agosto de 1995;15(8):4215-24.
175. Rubin SM, Sage J, Skotheim JM. Integrating Old and New Paradigms of G1/S Control. *Mol Cell*. 15 de octubre de 2020;80(2):183-92.
176. Silva Cascales H, Burdova K, Middleton A, Kuzin V, Müllers E, Stoy H, et al. Cyclin A2 localises in the cytoplasm at the S/G2 transition to activate PLK1. *Life Sci Alliance*. 5 de enero de 2021;4(3):e202000980.
177. Fu Z, Malureanu L, Huang J, Wang W, Li H, van Deursen JM, et al. Plk1-dependent phosphorylation of FoxM1 regulates a transcriptional programme required for mitotic progression. *Nat Cell Biol*. septiembre de 2008;10(9):1076-82.
178. Dephoure N, Zhou C, Villén J, Beausoleil SA, Bakalarski CE, Elledge SJ, et al. A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 5 de agosto de 2008;105(31):10762-7.
179. Rowland BD, Bernards R. Re-Evaluating Cell-Cycle Regulation by E2Fs. *Cell*. 1 de diciembre de 2006;127(5):871-4.
180. Kent LN, Bae S, Tsai SY, Tang X, Srivastava A, Koivisto C, et al. Dosage-dependent copy number gains in E2f1 and E2f3 drive hepatocellular carcinoma. *J Clin Invest*. 127(3):830-42.
181. Danielian PS, Friesenhahn LB, Faust AM, West JC, Caron AM, Bronson RT, et al. E2f3a and E2f3b make overlapping but different contributions to total E2f3 activity. *Oncogene*. 11 de noviembre de 2008;27(51):6561.
182. Di Stefano L, Jensen MR, Helin K. E2F7, a novel E2F featuring DP-independent repression of a subset of E2F-regulated genes. *EMBO J*. 1 de diciembre de 2003;22(23):6289-98.
183. Christensen J, Cloos P, Toftegaard U, Klinkenberg D, Bracken AP, Trinh E, et al. Characterization of E2F8, a novel E2F-like cell-cycle regulated repressor of E2F-activated transcription. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(17):5458.
184. Frolov MV, Huen DS, Stevaux O, Dimova D, Balczarek-Strang K, Elsdon M, et al. Functional antagonism between E2F family members. *Genes Dev*. 15 de agosto de 2001;15(16):2146-60.
185. Wu CL, Zukerberg LR, Ngwu C, Harlow E, Lees JA. In Vivo Association of E2F and DP Family Proteins. *Mol Cell Biol*. 1 de mayo de 1995;15(5):2536-46.
186. Morkel M, Wenkel J, Bannister AJ, Kouzarides T, Hagemeyer C. An E2F-like repressor of transcription. *Nature*. diciembre de 1997;390(6660):567-8.
187. Qiao H, Di Stefano L, Tian C, Li YY, Yin YH, Qian XP, et al. Human TFDP3, a Novel DP Protein, Inhibits DNA Binding and Transactivation by E2F*. *J Biol Chem*. 5 de enero de 2007;282(1):454-66.
188. Kent LN, Leone G. The broken cycle: E2F dysfunction in cancer. *Nat Rev Cancer*. junio de 2019;19(6):326-38.
189. Chen HZ, Tsai SY, Leone G. Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. *Nat Rev Cancer*. noviembre de 2009;9(11):785-97.

190. Johnson DG, Ohtani K, Nevins JR. Autoregulatory control of E2F1 expression in response to positive and negative regulators of cell cycle progression. *Genes Dev.* 7 de enero de 1994;8(13):1514-25.
191. Leone G, Sears R, Huang E, Rempel R, Nuckolls F, Park CH, et al. Myc Requires Distinct E2F Activities to Induce S Phase and Apoptosis. *Mol Cell.* 1 de julio de 2001;8(1):105-13.
192. Dong P, Maddali MV, Srimani JK, Thélot F, Nevins JR, Mathey-Prevot B, et al. Division of labour between Myc and G1 cyclins in cell cycle commitment and pace control. *Nat Commun.* 1 de septiembre de 2014;5(1):4750.
193. Clijsters L, Hoencamp C, Calis JJA, Marzio A, Handgraaf SM, Cuitino MC, et al. Cyclin F Controls Cell-Cycle Transcriptional Outputs by Directing the Degradation of the Three Activator E2Fs. *Mol Cell.* 20 de junio de 2019;74(6):1264-1277.e7.
194. Budhavarapu VN, White ED, Mahanic CS, Chen L, Lin FT, Lin WC. Regulation of E2F1 by APC/CCdh1 via K11 linkage-specific ubiquitin chain formation. *Cell Cycle.* 15 de mayo de 2012;11(10):2030-8.
195. Cuitiño MC, Pécot T, Sun D, Kladney R, Okano-Uchida T, Shinde N, et al. Two Distinct E2F Transcriptional Modules Drive Cell Cycles and Differentiation. *Cell Rep.* 18 de junio de 2019;27(12):3547-3560.e5.
196. Boekhout M, Yuan R, Wondergem AP, Segeren HA, van Liere EA, Awol N, et al. Feedback regulation between atypical E2Fs and APC/CC dh1 coordinates cell cycle progression. *EMBO Rep.* marzo de 2016;17(3):414-27.
197. Bracken AP, Ciro M, Cocito A, Helin K. E2F target genes: unraveling the biology. *Trends Biochem Sci.* agosto de 2004;29(8):409-17.
198. Martinez LA, Goluszko E, Chen HZ, Leone G, Post S, Lozano G, et al. E2F3 Is a Mediator of DNA Damage-Induced Apoptosis. *Mol Cell Biol.* enero de 2010;30(2):524-36.
199. Panagiotis Zalmas L, Zhao X, Graham AL, Fisher R, Reilly C, Coutts AS, et al. DNA-damage response control of E2F7 and E2F8. *EMBO Rep.* marzo de 2008;9(3):252-9.
200. Plesca D, Crosby ME, Gupta D, Almasan A. E2F4 Function in G2. *Cell Cycle Georget Tex.* 15 de mayo de 2007;6(10):1147-52.
201. Hong S, Paulson QX, Johnson DG. E2F1 and E2F3 activate ATM through distinct mechanisms to promote E1A-induced apoptosis. *Cell Cycle.* 1 de febrero de 2008;7(3):391-400.
202. Korotayev K, Ginsberg D. Many pathways to apoptosis: E2F1 regulates splicing of apoptotic genes. *Cell Death Differ.* diciembre de 2008;15(12):1813-4.
203. Kumari A, Iwasaki T, Pyndiah S, Cassimere EK, Palani CD, Sakamuro D. Regulation of E2F1-induced apoptosis by poly(ADP-ribosyl)ation. *Cell Death Differ.* febrero de 2015;22(2):311-22.
204. Saavedra HI, Maiti B, Timmers C, Altura R, Tokuyama Y, Fukasawa K, et al. Inactivation of E2F3 results in centrosome amplification. *Cancer Cell.* 1 de abril de 2003;3(4):333-46.
205. Li F, Ackermann EJ, Bennett CF, Rothermel AL, Plescia J, Tognin S, et al. Pleiotropic cell-division defects and apoptosis induced by interference with survivin function. *Nat Cell Biol.* diciembre de 1999;1(8):461-6.
206. Hernando E, Nahlé Z, Juan G, Diaz-Rodriguez E, Alaminos M, Hemann M, et al. Rb inactivation promotes genomic instability by uncoupling cell cycle progression from mitotic control. *Nature.* agosto de 2004;430(7001):797-802.
207. Lee MY, Moreno CS, Saavedra HI. E2F Activators Signal and Maintain Centrosome Amplification in Breast Cancer Cells. *Mol Cell Biol.* julio de 2014;34(14):2581-99.
208. Nath S, Chowdhury A, Dey S, Roychoudhury A, Ganguly A, Bhattacharyya D, et al. Dereglulation of Rb-E2F1 Axis Causes Chromosomal Instability by Engaging the Transactivation Function of Cdc20–Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome. *Mol Cell Biol.* enero de 2015;35(2):356-69.
209. Wang T, Chen X, Qiao W, Kong L, Sun D, Li Z. Transcription factor E2F1 promotes EMT by regulating ZEB2 in small cell lung cancer. *BMC Cancer.* 7 de noviembre de 2017;17:719.

Bibliografía

210. Lu Z, Nian Z, Jingjing Z, Tao L, Quan L. MicroRNA-424/E2F6 feedback loop modulates cell invasion, migration and EMT in endometrial carcinoma. *Oncotarget*. 13 de diciembre de 2017;8(69):114281-91.
211. Khan FM, Marquardt S, Gupta SK, Knoll S, Schmitz U, Spitschak A, et al. Unraveling a tumor type-specific regulatory core underlying E2F1-mediated epithelial-mesenchymal transition to predict receptor protein signatures. *Nat Commun*. 4 de agosto de 2017;8:198.
212. Kim LK, Park SA, Eoh KJ, Heo TH, Kim YT, Kim HJ. E2F8 regulates the proliferation and invasion through epithelial-mesenchymal transition in cervical cancer. *Int J Biol Sci*. 1 de enero de 2020;16(2):320-9.
213. Timmers C, Sharma N, Opavsky R, Maiti B, Wu L, Wu J, et al. E2f1, E2f2, and E2f3 Control E2F Target Expression and Cellular Proliferation via a p53-Dependent Negative Feedback Loop. *Mol Cell Biol*. enero de 2007;27(1):65-78.
214. Liu H, Tang X, Srivastava A, Pécot T, Daniel P, Hemmelgarn B, et al. Redeployment of Myc and E2f1-3 drives Rb deficient cell cycles. *Nat Cell Biol*. agosto de 2015;17(8):1036-48.
215. Pellicano F, Park L, Hopcroft LEM, Shah MM, Jackson L, Scott MT, et al. hsa-mir183/EGR1-mediated regulation of E2F1 is required for CML stem/progenitor cell survival. *Blood*. 5 de abril de 2018;131(14):1532-44.
216. Baudino TA, Maclean KH, Brennan J, Parganas E, Yang C, Aslanian A, et al. Myc-Mediated Proliferation and Lymphomagenesis, but Not Apoptosis, Are Compromised by E2f1 Loss. *Mol Cell*. 1 de abril de 2003;11(4):905-14.
217. Wikonkal NM, Remenyik E, Knezevic D, Zhang W, Liu M, Zhao H, et al. Inactivating E2f1 reverts apoptosis resistance and cancer sensitivity in Trp53-deficient mice. *Nat Cell Biol*. julio de 2003;5(7):655-60.
218. Wu L, de Bruin A, Wang H, Simmons T, Cleghorn W, Goldenberg LE, et al. Selective Roles of E2Fs for ErbB2- and Myc-mediated Mammary Tumorigenesis. *Oncogene*. 2 de enero de 2015;34(1):119-28.
219. Sangwan M, McCurdy SR, Livne-bar I, Ahmad M, Wrana JL, Chen D, et al. Established and New Mouse Models Reveal E2f1 and Cdk2 Dependency of Retinoblastoma and Expose Strategies to Block Tumor Initiation. *Oncogene*. 29 de noviembre de 2012;31(48):5019-28.
220. Parisi T, Yuan TL, Faust AM, Caron AM, Bronson R, Lees JA. Selective Requirements for E2f3 in the Development and Tumorigenicity of Rb-Deficient Chimeric Tissues. *Mol Cell Biol*. marzo de 2007;27(6):2283-93.
221. Segeren HA, Rijnberk LM van, Moreno E, Riemers FM, Liere EA van, Yuan R, et al. Excessive E2F Transcription in Single Cancer Cells Precludes Transient Cell-Cycle Exit after DNA Damage. *Cell Rep [Internet]*. 1 de diciembre de 2020 [citado 2 de marzo de 2024];33(9). Disponible en: [https://www.cell.com/cell-reports/abstract/S2211-1247\(20\)31438-8](https://www.cell.com/cell-reports/abstract/S2211-1247(20)31438-8)
222. Nakajima R, Zhao L, Zhou Y, Shirasawa M, Uchida A, Murakawa H, et al. Deregulated E2F Activity as a Cancer-Cell Specific Therapeutic Tool. *Genes*. febrero de 2023;14(2):393.
223. Teng F, Zhang JX, Chang QM, Wu XB, Tang WG, Wang JF, et al. LncRNA MYLK-AS1 facilitates tumor progression and angiogenesis by targeting miR-424-5p/E2F7 axis and activating VEGFR-2 signaling pathway in hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res CR*. 9 de noviembre de 2020;39:235.
224. Kent LN, Rakijas JB, Pandit SK, Westendorp B, Chen HZ, Huntington JT, et al. E2f8 mediates tumor suppression in postnatal liver development. *J Clin Invest*. 126(8):2955-69.
225. Thurlings I, Martínez-López LM, Westendorp B, Zijp M, Kuiper R, Tooten P, et al. Synergistic functions of E2F7 and E2F8 are critical to suppress stress-induced skin cancer. *Oncogene*. febrero de 2017;36(6):829-39.
226. Saenz-Ponce N, Pillay R, de Long LM, Kashyap T, Argueta C, Landesman Y, et al. Targeting the XPO1-dependent nuclear export of E2F7 reverses anthracycline resistance in head and neck squamous cell carcinomas. *Sci Transl Med*. 27 de junio de 2018;10(447):eaar7223.

227. Ohtani N, Brennan P, Gaubatz S, Sanij E, Hertzog P, Wolvetang E, et al. Epstein-Barr virus LMP1 blocks p16^{INK4a}–RB pathway by promoting nuclear export of E2F4/5. *J Cell Biol.* 21 de julio de 2003;162(2):173-83.
228. Ivanova IA, Vespa A, Dagnino L. A Novel Mechanism of E2F1 Regulation Via Nucleocytoplasmic Shuttling: Determinants of Nuclear Import and Export. *Cell Cycle.* 1 de septiembre de 2007;6(17):2186-95.
229. Chen D, Opavsky R, Pacal M, Tanimoto N, Wenzel P, Seeliger MW, et al. Rb-Mediated Neuronal Differentiation through Cell-Cycle–Independent Regulation of E2f3a. *PLOS Biol.* 3 de julio de 2007;5(7):e179.
230. McClellan KA, Slack RS. Specific In Vivo Roles for E2Fs in Differentiation and Development. *Cell Cycle.* 1 de diciembre de 2007;6(23):2917-27.
231. Julian LM, Liu Y, Pakenham CA, Dugal-Tessier D, Ruzhynsky V, Bae S, et al. Tissue-specific targeting of cell fate regulatory genes by E2f factors. *Cell Death Differ.* abril de 2016;23(4):565-75.
232. Fong BC, Chakroun I, Iqbal MA, Paul S, Bastasic J, O’Neil D, et al. The Rb/E2F axis is a key regulator of the molecular signatures instructing the quiescent and activated adult neural stem cell state. *Cell Rep.* 1 de noviembre de 2022;41(5):111578.
233. Asp P, Acosta-Alvear D, Tsikitis M, van Oevelen C, Dynlacht BD. E2f3b plays an essential role in myogenic differentiation through isoform-specific gene regulation. *Genes Dev.* 1 de enero de 2009;23(1):37-53.
234. Chong JL, Wenzel PL, Sáenz-Robles MT, Nair V, Ferrey A, Hagan JP, et al. E2F1-3 Switch from Activators in Progenitor Cells to Repressors in Differentiating Cells. *Nature.* 17 de diciembre de 2009;462(7275):930-4.
235. Gamper I, Burkhardt DL, Bywater MJ, Garcia D, Wilson CH, Kreuzaler PA, et al. Determination of the physiological and pathological roles of E2F3 in adult tissues. *Sci Rep.* 30 de agosto de 2017;7(1):9932.
236. Ciemerych MA, Sicinski P. Cell cycle in mouse development. *Oncogene.* abril de 2005;24(17):2877-98.
237. Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC, et al. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature.* diciembre de 1998;396(6711):580-4.
238. Altieri DC. Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery. *Nat Rev Cancer.* enero de 2008;8(1):61-70.
239. Beardmore VA, Ahonen LJ, Gorbsky GJ, Kallio MJ. Survivin dynamics increases at centromeres during G2/M phase transition and is regulated by microtubule-attachment and Aurora B kinase activity. *J Cell Sci.* 15 de agosto de 2004;117(18):4033-42.
240. Uren AG, Wong L, Pakusch M, Fowler KJ, Burrows FJ, Vaux DL, et al. Survivin and the inner centromere protein INCENP show similar cell-cycle localization and gene knockout phenotype. *Curr Biol.* 1 de noviembre de 2000;10(21):1319-28.
241. Wheatley SP, Henzing AJ, Dodson H, Khaled W, Earnshaw WC. Aurora-B Phosphorylation in Vitro Identifies a Residue of Survivin That Is Essential for Its Localization and Binding to Inner Centromere Protein (INCENP) in Vivo*. *J Biol Chem.* 13 de febrero de 2004;279(7):5655-60.
242. Carmena M, Wheelock M, Funabiki H, Earnshaw WC. The chromosomal passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* diciembre de 2012;13(12):789-803.
243. Wheatley SP, Carvalho A, Vagnarelli P, Earnshaw WC. INCENP is required for proper targeting of Survivin to the centromeres and the anaphase spindle during mitosis. *Curr Biol.* 1 de junio de 2001;11(11):886-90.
244. Lens SMA, Wolthuis RMF, Klomp maker R, Kauw J, Agami R, Brummelkamp T, et al. Survivin is required for a sustained spindle checkpoint arrest in response to lack of tension. *EMBO J.* 16 de junio de 2003;22(12):2934-47.

Bibliografía

245. Gassmann R, Carvalho A, Henzing AJ, Ruchaud S, Hudson DF, Honda R, et al. Borealin. *J Cell Biol.* 19 de julio de 2004;166(2):179-91.
246. Ruchaud S, Carmena M, Earnshaw WC. Chromosomal passengers: conducting cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol.* octubre de 2007;8(10):798-812.
247. Jiang Y, Saavedra HI, Holloway MP, Leone G, Altura RA. Aberrant regulation of survivin by the RB/E2F family of proteins. *J Biol Chem.* 24 de septiembre de 2004;279(39):40511-20.
248. Suzuki A, Ito T, Kawano H, Hayashida M, Hayasaki Y, Tsutomi Y, et al. Survivin initiates procaspase 3/p21 complex formation as a result of interaction with Cdk4 to resist Fas-mediated cell death. *Oncogene.* marzo de 2000;19(10):1346-53.
249. Suzuki A, Hayashida M, Ito T, Kawano H, Nakano T, Miura M, et al. Survivin initiates cell cycle entry by the competitive interaction with Cdk4/p16INK4a and Cdk2/Cyclin E complex activation. *Oncogene.* julio de 2000;19(29):3225-34.
250. Singh A, Spitzer MH, Joy JP, Kaileh M, Qiu X, Nolan GP, et al. Postmitotic G1 phase survivin drives mitogen-independent cell division of B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 3 de mayo de 2022;119(18):e2115567119.
251. Song J, Salek-Ardakani S, So T, Croft M. The kinases aurora B and mTOR regulate the G1-S cell cycle progression of T lymphocytes. *Nat Immunol.* enero de 2007;8(1):64-73.
252. Muchmore SW, Chen J, Jakob C, Zakula D, Matayoshi ED, Wu W, et al. Crystal Structure and Mutagenic Analysis of the Inhibitor-of-Apoptosis Protein Survivin. *Mol Cell.* 1 de julio de 2000;6(1):173-82.
253. Xu ZX, Zhao RX, Ding T, Tran TT, Zhang W, Pandolfi PP, et al. Promyelocytic Leukemia Protein 4 Induces Apoptosis by Inhibition of Survivin Expression *. *J Biol Chem.* 16 de enero de 2004;279(3):1838-44.
254. Semba S, Trapasso F, Fabbri M, McCorkell KA, Volinia S, Druck T, et al. Fhit modulation of the Akt-survivin pathway in lung cancer cells: Fhit-tyrosine 114 (Y114) is essential. *Oncogene.* mayo de 2006;25(20):2860-72.
255. Kang BH, Altieri DC. Regulation of Survivin Stability by the Aryl Hydrocarbon Receptor-interacting Protein *. *J Biol Chem.* 25 de agosto de 2006;281(34):24721-7.
256. Vaira V, Lee CW, Goel HL, Bosari S, Languino LR, Altieri DC. Regulation of survivin expression by IGF-1/mTOR signaling. *Oncogene.* abril de 2007;26(19):2678-84.
257. Gritsko T, Williams A, Turkson J, Kaneko S, Bowman T, Huang M, et al. Persistent Activation of Stat3 Signaling Induces Survivin Gene Expression and Confers Resistance to Apoptosis in Human Breast Cancer Cells. *Clin Cancer Res.* 5 de enero de 2006;12(1):11-9.
258. Kim PJ, Plescia J, Clevers H, Fearon ER, Altieri DC. Survivin and molecular pathogenesis of colorectal cancer. *The Lancet.* 19 de julio de 2003;362(9379):205-9.
259. Fortugno P, Beltrami E, Plescia J, Fontana J, Pradhan D, Marchisio PC, et al. Regulation of survivin function by Hsp90. *Proc Natl Acad Sci.* 25 de noviembre de 2003;100(24):13791-6.
260. Hoffman WH, Biade S, Zilfou JT, Chen J, Murphy M. Transcriptional Repression of the Anti-apoptoticsurvivin Gene by Wild Type p53 *. *J Biol Chem.* 1 de febrero de 2002;277(5):3247-57.
261. Okada H, Bakal C, Shahinian A, Elia A, Wakeham A, Suh WK, et al. Survivin Loss in Thymocytes Triggers p53-mediated Growth Arrest and p53-independent Cell Death. *J Exp Med.* 2 de febrero de 2004;199(3):399-410.
262. Chen X, Duan N, Zhang C, Zhang W. Survivin and Tumorigenesis: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies. *J Cancer.* 10 de enero de 2016;7(3):314-23.
263. Dohi T, Okada K, Xia F, Wilford CE, Samuel T, Welsh K, et al. An IAP-IAP Complex Inhibits Apoptosis *. *J Biol Chem.* 13 de agosto de 2004;279(33):34087-90.
264. Albadari N, Li W. Survivin Small Molecules Inhibitors: Recent Advances and Challenges. *Molecules.* 1 de febrero de 2023;28(3):1376.
265. Markovic O, Marisavljevic D, Cemerikic-Martinovic V, Martinovic T, Filipovic B, Stanisavljevic D, et al. Survivin expression in patients with newly diagnosed nodal diffuse large B cell lymphoma (DLBCL). *Med Oncol Northwood Lond Engl.* 2012;29(5):3515-21.

266. Ansell SM, Arendt BK, Grote DM, Jelinek DF, Novak AJ, Wellik LE, et al. Inhibition of survivin expression suppresses the growth of aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia*. marzo de 2004;18(3):616-23.
267. Liu Z, Xu-Monette ZY, Cao X, Manyam GC, Wang X, Tzankov A, et al. Prognostic and biological significance of survivin expression in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab-CHOP therapy. *Mod Pathol*. octubre de 2015;28(10):1297-314.
268. Tolcher AW, Mita A, Lewis LD, Garrett CR, Till E, Daud AI, et al. Phase I and Pharmacokinetic Study of YM155, a Small-Molecule Inhibitor of Survivin. *J Clin Oncol*. 10 de noviembre de 2008;26(32):5198-203.
269. Clemens MR, Gladkov OA, Gartner E, Vladimirov V, Crown J, Steinberg J, et al. Phase II, multicenter, open-label, randomized study of YM155 plus docetaxel as first-line treatment in patients with HER2-negative metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2015;149(1):171-9.
270. Kelly RJ, Thomas A, Rajan A, Chun G, Lopez-Chavez A, Szabo E, et al. A phase I/II study of sepantronium bromide (YM155, survivin suppressor) with paclitaxel and carboplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol*. octubre de 2013;24(10):2601-6.
271. Tibes R, McDonagh KT, Lekakis L, Bogenberger JM, Kim S, Frazer N, et al. Phase I study of the novel Cdc2/CDK1 and AKT inhibitor terameprocol in patients with advanced leukemias. *Invest New Drugs*. 1 de abril de 2015;33(2):389-96.
272. Grossman SA, Ye X, Peereboom D, Rosenfeld MR, Mikkelsen T, Supko JG, et al. Phase I study of terameprocol in patients with recurrent high-grade glioma. *Neuro-Oncol*. abril de 2012;14(4):511-7.
273. Yang J, Song K, Krebs TL, Jackson MW, Danielpour D. Rb/E2F4 and Smad2/3 Link Survivin to TGF- β -induced Apoptosis and Tumor Progression. *Oncogene*. 11 de septiembre de 2008;27(40):5326-38.
274. Aoki Y, Feldman GM, Tosato G. Inhibition of STAT3 signaling induces apoptosis and decreases survivin expression in primary effusion lymphoma. *Blood*. 15 de febrero de 2003;101(4):1535-42.
275. Fukuda S, Pelus LM. Activated H-Ras regulates hematopoietic cell survival by modulating Survivin. *Biochem Biophys Res Commun*. 15 de octubre de 2004;323(2):636-44.
276. Zhang Y, Chen H xuan, Zhou S yan, Wang S xiang, Zheng K, Xu D dan, et al. Sp1 and c-Myc modulate drug resistance of leukemia stem cells by regulating survivin expression through the ERK-MSK MAPK signaling pathway. *Mol Cancer*. 7 de marzo de 2015;14(1):56.
277. Chang WH, Liu Y, Hammes EA, Bryant KL, Cerione RA, Antonyak MA. Oncogenic RAS promotes MYC protein stability by upregulating the expression of the inhibitor of apoptosis protein family member Survivin. *J Biol Chem [Internet]*. 1 de febrero de 2023 [citado 16 de abril de 2024];299(2). Disponible en: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(22\)01285-6/abstract](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(22)01285-6/abstract)
278. Lu J, Murakami M, Verma SC, Cai Q, Haldar S, Kaul R, et al. Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 1 (EBNA1) Confers Resistance to Apoptosis in EBV positive B-lymphoma Cells through Up-regulation of Survivin. *Virology*. 5 de febrero de 2011;410(1):64-75.
279. Zhao S, Zhang Y, Gamini R, Zhang B, von Schack D. Evaluation of two main RNA-seq approaches for gene quantification in clinical RNA sequencing: polyA+ selection versus rRNA depletion. *Sci Rep*. 19 de marzo de 2018;8:4781.
280. Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data [Internet]. [citado 14 de abril de 2024]. Disponible en: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
281. Horn H, Ziepert M, Becher C, Barth TFE, Bernd HW, Feller AC, et al. MYC status in concert with BCL2 and BCL6 expression predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 21 de marzo de 2013;121(12):2253-63.
282. Verdu-Bou M, Tapia G, Hernandez-Rodriguez A, Navarro JT. Clinical and Therapeutic Implications of Epstein-Barr Virus in HIV-Related Lymphomas. *Cancers*. 4 de noviembre de 2021;13(21):5534.

Bibliografía

283. Meng X, Deng Y, He S, Niu L, Zhu H. m6A-Mediated Upregulation of LINC00857 Promotes Pancreatic Cancer Tumorigenesis by Regulating the miR-150-5p/E2F3 Axis. *Front Oncol.* 18 de febrero de 2021;11:629947.
284. Frontzek F, Staiger AM, Zapukhlyak M, Xu W, Bonzheim I, Borgmann V, et al. Molecular and functional profiling identifies therapeutically targetable vulnerabilities in plasmablastic lymphoma. *Nat Commun.* 31 de agosto de 2021;12(1):5183.
285. Chapman J, Gentles AJ, Sujoy V, Vega F, Dumur CI, Blevins TL, et al. Gene expression analysis of plasmablastic lymphoma identifies downregulation of B-cell receptor signaling and additional unique transcriptional programs. *Leukemia.* noviembre de 2015;29(11):2270-3.
286. Ambrosio MR, Mundo L, Gazaneo S, Picciolini M, Vara PS, Sayed S, et al. MicroRNAs sequencing unveils distinct molecular subgroups of plasmablastic lymphoma. *Oncotarget.* 31 de octubre de 2017;8(64):107356-73.
287. Jessa R, Chien N, Villa D, Freeman CL, Slack GW, Savage KJ, et al. Clinicopathological characteristics and long-term outcomes of plasmablastic lymphoma in British Columbia. *Br J Haematol.* 2022;199(2):230-8.
288. Delecluse HJ, Anagnostopoulos I, Dallenbach F, Hummel M, Marafioti T, Schneider U, et al. Plasmablastic Lymphomas of the Oral Cavity: A New Entity Associated With the Human Immunodeficiency Virus Infection. *Blood.* 15 de febrero de 1997;89(4):1413-20.
289. Li JW, Peng HL, Zhou XY, Wang JJ. Plasmablastic lymphoma: current knowledge and future directions. *Front Immunol [Internet].* 13 de febrero de 2024 [citado 9 de junio de 2024];15. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2024.1354604/full>
290. Palmieri C, Treibel T, Large O, Bower M. AIDS-related non-Hodgkin's lymphoma in the first decade of highly active antiretroviral therapy. *QJM Int J Med.* 1 de diciembre de 2006;99(12):811-26.
291. Ribera JM, Navarro JT. Human immunodeficiency virus-related non-Hodgkin's lymphoma. *Haematologica.* agosto de 2008;93(8):1129-32.
292. Pei Y, Banerjee S, Sun Z, Jha HC, Saha A, Robertson ES. EBV Nuclear Antigen 3C Mediates Regulation of E2F6 to Inhibit E2F1 Transcription and Promote Cell Proliferation. *PLoS Pathog.* 22 de agosto de 2016;12(8):e1005844.
293. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell.* 19 de marzo de 2010;140(6):883-99.
294. Kataoka K, Miyoshi H, Sakata S, Dobashi A, Couronné L, Kogure Y, et al. Frequent structural variations involving programmed death ligands in Epstein-Barr virus-associated lymphomas. *Leukemia.* 2019;33(7):1687-99.
295. Armand P. Immune checkpoint blockade in hematologic malignancies. *Blood.* 28 de mayo de 2015;125(22):3393-400.
296. Dolcetti R, Ghoghini A, Caruso A, Carbone A. A lymphomagenic role for HIV beyond immune suppression? *Blood.* 17 de marzo de 2016;127(11):1403-9.
297. Pusapati RV, Daemen A, Wilson C, Sandoval W, Gao M, Haley B, et al. mTORC1-Dependent Metabolic Reprogramming Underlies Escape from Glycolysis Addiction in Cancer Cells. *Cancer Cell.* 11 de abril de 2016;29(4):548-62.
298. Ricci JE, Chiche J. Metabolic Reprogramming of Non-Hodgkin's B-Cell Lymphomas and Potential Therapeutic Strategies. *Front Oncol [Internet].* 4 de diciembre de 2018 [citado 5 de junio de 2024];8. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2018.00556/full>
299. Pavlova NN, Zhu J, Thompson CB. The hallmarks of cancer metabolism: Still emerging. *Cell Metab.* 1 de marzo de 2022;34(3):355-77.
300. Vyas S, Zaganjor E, Haigis MC. Mitochondria and Cancer. *Cell.* 28 de julio de 2016;166(3):555-66.

301. Sebestyén A, Sticz TB, Márk Á, Hajdu M, Timár B, Nemes K, et al. Activity and complexes of mTOR in diffuse large B-cell lymphomas—a tissue microarray study. *Mod Pathol.* 1 de diciembre de 2012;25(12):1623-8.
302. Zhang L, Yao Y, Zhang S, Liu Y, Guo H, Ahmed M, et al. Metabolic reprogramming toward oxidative phosphorylation identifies a therapeutic target for mantle cell lymphoma. *Sci Transl Med.* 8 de mayo de 2019;11(491):eaau1167.
303. Stuani L, Sabatier M, Saland E, Cognet G, Poupin N, Bosc C, et al. Mitochondrial metabolism supports resistance to IDH mutant inhibitors in acute myeloid leukemia. *J Exp Med.* 24 de marzo de 2021;218(5):e20200924.
304. Guièze R, Liu VM, Rosebrock D, Jourdain AA, Hernández-Sánchez M, Zurita AM, et al. Mitochondrial reprogramming underlies resistance to BCL-2 inhibition in lymphoid Malignancies. *Cancer Cell.* 14 de octubre de 2019;36(4):369-384.e13.
305. Norberg E, Lako A, Chen PH, Stanley IA, Zhou F, Ficarro SB, et al. Differential contribution of the mitochondrial translation pathway to the survival of diffuse large B-cell lymphoma subsets. *Cell Death Differ.* febrero de 2017;24(2):251-62.
306. Ohi N, Okuno M, Tanaka H, Ohtani T. Combination Therapy Strategy for Lymphoma Based on Cancer Energy Metabolism of OPB-111077, a Novel Antitumor Agent Inhibiting Mitochondrial Oxidative Phosphorylation. *Blood.* 5 de noviembre de 2021;138(Supplement 1):4363.
307. Noble RA, Thomas H, Zhao Y, Herendi L, Howarth R, Dragoni I, et al. Simultaneous targeting of glycolysis and oxidative phosphorylation as a therapeutic strategy to treat diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Cancer.* septiembre de 2022;127(5):937-47.
308. Gaubatz S, Lindeman GJ, Ishida S, Jakoi L, Nevins JR, Livingston DM, et al. E2F4 and E2F5 Play an Essential Role in Pocket Protein–Mediated G1 Control. *Mol Cell.* 1 de septiembre de 2000;6(3):729-35.
309. Wu L, Timmers C, Maiti B, Saavedra HI, Sang L, Chong GT, et al. The E2F1–3 transcription factors are essential for cellular proliferation. *Nature.* noviembre de 2001;414(6862):457-62.
310. Li J, Ran C, Li E, Gordon F, Comstock G, Siddiqui H, et al. Synergistic Function of E2F7 and E2F8 is Essential for Cell Survival and Embryonic Development. *Dev Cell.* enero de 2008;14(1):62-75.
311. Xie D, Pei Q, Li J, Wan X, Ye T. Emerging Role of E2F Family in Cancer Stem Cells. *Front Oncol.* 12 de agosto de 2021;11:723137.
312. Feng Z, Peng C, Li D, Zhang D, Li X, Cui F, et al. E2F3 promotes cancer growth and is overexpressed through copy number variation in human melanoma. *OncoTargets Ther.* 30 de agosto de 2018;11:5303-13.
313. Oeggerli M, Tomovska S, Schraml P, Calvano-Forte D, Schafroth S, Simon R, et al. E2F3 amplification and overexpression is associated with invasive tumor growth and rapid tumor cell proliferation in urinary bladder cancer. *Oncogene.* julio de 2004;23(33):5616-23.
314. Wu L, de Bruin A, Wang H, Simmons T, Cleghorn W, Goldenberg LE, et al. Selective Roles of E2Fs for ErbB2- and Myc-mediated Mammary Tumorigenesis. *Oncogene.* 2 de enero de 2015;34(1):119-28.
315. Wu L, Wan S, Li J, Xu Y, Lou X, Sun M, et al. Expression and prognostic value of E2F3 transcription factor in non-small cell lung cancer. *Oncol Lett.* mayo de 2021;21(5):411.
316. Liu G, Ouyang X, Gong L, Yao L, Liu S, Li J, et al. E2F3 promotes liver cancer progression under the regulation of circ-PRKAR1B. *Mol Ther Nucleic Acids.* 16 de julio de 2021;26:104-13.
317. Huang YL, Ning G, Chen LB, Lian YF, Gu YR, Wang JL, et al. Promising diagnostic and prognostic value of E2Fs in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Manag Res.* 2019;11:1725.
318. Li J, Bi W, Lu F, Pan B, Xiong M, Nasifu L, et al. Prognostic role of E2F1 gene expression in human cancer: a meta-analysis. *BMC Cancer.* 5 de junio de 2023;23(1):509.
319. Chang TC, Yu D, Lee YS, Wentzel EA, Arking DE, West KM, et al. Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nat Genet.* enero de 2008;40(1):43-50.
320. Wang X, Zhao X, Gao P, Wu M. c-Myc modulates microRNA processing via the transcriptional regulation of Drosha. *Sci Rep.* 5 de junio de 2013;3(1):1942.

Bibliografía

321. Tao J, Zhao X, Tao J. c-MYC–miRNA circuitry. *Cell Cycle*. 15 de enero de 2014;13(2):191-8.
322. Robaina MC, Mazzocchi L, Esteves Klumb C. Germinal Centre B Cell Functions and Lymphomagenesis: Circuits Involving MYC and MicroRNAs. *Cells*. noviembre de 2019;8(11):1365.
323. Mihailovich M, Bremang M, Spadotto V, Musiani D, Vitale E, Varano G, et al. miR-17-92 fine-tunes MYC expression and function to ensure optimal B cell lymphoma growth. *Nat Commun*. 10 de noviembre de 2015;6(1):8725.
324. Izreig S, Samborska B, Johnson RM, Sergushichev A, Ma EH, Lussier C, et al. The miR-17~92 microRNA Cluster Is a Global Regulator of Tumor Metabolism. *Cell Rep*. 16 de agosto de 2016;16(7):1915-28.
325. Jiang X, Huang H, Li Z, Li Y, Wang X, Gurbuxani S, et al. Blockade of miR-150 maturation by MLL-fusion/MYC/LIN-28 is required for MLL-associated leukemia. *Cancer Cell*. 16 de octubre de 2012;22(4):524-35.
326. Fang ZH, Wang SL, Zhao JT, Lin ZJ, Chen LY, Su R, et al. miR-150 exerts antileukemia activity in vitro and in vivo through regulating genes in multiple pathways. *Cell Death Dis*. septiembre de 2016;7(9):e2371.
327. Srutova K, Curik N, Burda P, Savvulidi F, Silvestri G, Trotta R, et al. BCR-ABL1 mediated miR-150 downregulation through MYC contributed to myeloid differentiation block and drug resistance in chronic myeloid leukemia. *Haematologica*. diciembre de 2018;103(12):2016-25.
328. Li X, Liu F, Lin B, Luo H, Liu M, Wu J, et al. miR-150 inhibits proliferation and tumorigenicity via retarding G1/S phase transition in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Oncol*. 1 de abril de 2017;50(4):1097-108.
329. Fagundes R, Teixeira LK. Cyclin E/CDK2: DNA Replication, Replication Stress and Genomic Instability. *Front Cell Dev Biol*. 24 de noviembre de 2021;9:774845.
330. Lü J, Zhang C, Han J, Xu Z, Li Y, Zhen L, et al. Starvation stress attenuates the miRNA-target interaction in suppressing breast cancer cell proliferation. *BMC Cancer*. 6 de julio de 2020;20(1):627.
331. Sternburg EL, Estep JA, Nguyen DK, Li Y, Karginov FV. Antagonistic and cooperative AGO2-PUM interactions in regulating mRNAs. *Sci Rep*. 17 de octubre de 2018;8(1):15316.
332. Miles WO, Tschöp K, Herr A, Ji JY, Dyson NJ. Pumilio facilitates miRNA regulation of the E2F3 oncogene. *Genes Dev*. 15 de febrero de 2012;26(4):356-68.
333. Schwentner R, Papamarkou T, Kauer MO, Stathopoulos V, Yang F, Bilke S, et al. EWS-FLI1 employs an E2F switch to drive target gene expression. *Nucleic Acids Res*. 11 de marzo de 2015;43(5):2780-9.
334. Liu Z, Wang P, Yuan S, Wang Y, Cao P, Wen F, et al. LncRNA BC200/miR-150-5p/MYB positive feedback loop promotes the malignant proliferation of myelodysplastic syndrome. *Cell Death Dis*. 8 de febrero de 2022;13(2):1-14.
335. Gao Y, Feng B, Lu L, Han S, Chu X, Chen L, et al. MiRNAs and E2F3: a complex network of reciprocal regulations in human cancers. *Oncotarget*. 21 de abril de 2017;8(36):60624-39.
336. Shen ZG, Liu XZ, Chen CX, Lu JM. Knockdown of E2F3 Inhibits Proliferation, Migration, and Invasion and Increases Apoptosis in Glioma Cells. *Oncol Res*. 2 de noviembre de 2017;25(9):1555-66.
337. Gao Q, An K, Lv Z, Wang Y, Ding C, Huang W. E2F3 accelerates the stemness of colon cancer cells by activating the STAT3 pathway. *Front Oncol [Internet]*. 29 de junio de 2023 [citado 8 de junio de 2024];13. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2023.1203712/full>
338. Sun J, Du Y, Song Q, Nan J, Guan P, Guo J, et al. E2F is required for STAT3-mediated upregulation of cyclin B1 and Cdc2 expressions and contributes to G2–M phase transition. *Acta Biochim Biophys Sin*. 1 de marzo de 2019;51(3):313-22.
339. Liu H, Tang X, Srivastava A, Pécot T, Daniel P, Hemmelgarn B, et al. Redeployment of Myc and E2f1-3 drives Rb deficient cell cycles. *Nat Cell Biol*. agosto de 2015;17(8):1036-48.

340. Kim S, Armand J, Safonov A, Zhang M, Soni RK, Schwartz G, et al. Sequential activation of E2F via Rb degradation and c-Myc drives resistance to CDK4/6 inhibitors in breast cancer. *Cell Rep.* 28 de noviembre de 2023;42(11):113198.
341. Klingenberg M, Becker J, Eberth S, Kube D, Wilting J. The chick chorioallantoic membrane as an in vivo xenograft model for Burkitt lymphoma. *BMC Cancer.* 18 de mayo de 2014;14:339.
342. Xu L, Yu W, Xiao H, Lin K. BIRC5 is a prognostic biomarker associated with tumor immune cell infiltration. *Sci Rep.* 11 de enero de 2021;11:390.
343. Fäldt Beding A, Larsson P, Helou K, Einbeigi Z, Parris TZ. Pan-cancer analysis identifies BIRC5 as a prognostic biomarker. *BMC Cancer.* 25 de marzo de 2022;22(1):322.
344. Lan W, Bian B, Xia Y, Dou S, Gayet O, Bigonnet M, et al. E2F signature is predictive for the pancreatic adenocarcinoma clinical outcome and sensitivity to E2F inhibitors, but not for the response to cytotoxic-based treatments. *Sci Rep.* 29 de mayo de 2018;8(1):8330.
345. Wang H, Wang X, Xu L, Zhang J. Prognostic analysis of E2F transcription factors E2F1 and E2F3 in four independent pediatric neuroblastoma cohorts. *BMC Pediatr.* 29 de junio de 2022;22(1):376.
346. Li J, Shu XL, Shao Q, Luo Q, Diao QC, Zhang X, et al. Transcriptional E2F1/2/3/6 as potential prognostic biomarkers in cutaneous melanoma. *Am J Transl Res.* 15 de enero de 2021;13(1):420-33.
347. Ma Y, Kurtyka CA, Boyapalle S, Sung SS, Lawrence H, Guida W, et al. A Small-Molecule E2F Inhibitor Blocks Growth in a Melanoma Culture Model. *Cancer Res.* 1 de agosto de 2008;68(15):6292-9.
348. Kurtyka CA, Chen L, Cress WD. E2F Inhibition Synergizes with Paclitaxel in Lung Cancer Cell Lines. *PLOS ONE.* de maig de 2014;9(5):e96357.
349. Rouaud F, Hamouda-Tekaya N, Cerezo M, Abbe P, Zangari J, Hofman V, et al. E2F1 inhibition mediates cell death of metastatic melanoma. *Cell Death Dis.* 9 de mayo de 2018;9(5):1-12.
350. Ahluwalia MS, Reardon DA, Abad AP, Curry WT, Wong ET, Figel SA, et al. Phase IIa Study of SurVaxM Plus Adjuvant Temozolomide for Newly Diagnosed Glioblastoma. *J Clin Oncol.* marzo de 2023;41(7):1453-65.
351. Gupta M, Fenstermaker RA, Qiu JX, Iyer RV. A phase I study of safety and immunogenicity of survivin long peptide vaccine (SurVaxM) in patients (pts) with metastatic neuroendocrine tumors (NETs). *J Clin Oncol.* 20 de enero de 2021;39(3_suppl):TPS375-TPS375.
352. Brun SN, Markant SL, Esparza LA, Garcia G, Terry D, Huang JM, et al. Survivin as a therapeutic target in Sonic hedgehog-driven medulloblastoma. *Oncogene.* julio de 2015;34(29):3770-9.
353. Berezov A, Cai Z, Freudenberg J, Zhang H, Cheng X, Thompson T, et al. Disabling the mitotic spindle and tumor growth by targeting a cavity-induced allosteric site of survivin. *Oncogene.* 12 de abril de 2012;31(15):1938-48.
354. Chang CC, Heller JD, Kuo J, Huang RCC. Tetra-O-methyl nordihydroguaiaretic acid induces growth arrest and cellular apoptosis by inhibiting Cdc2 and survivin expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 7 de septiembre de 2004;101(36):13239-44.
355. Nakahara T, Takeuchi M, Kinoyama I, Minematsu T, Shirasuna K, Matsuhisa A, et al. YM155, a Novel Small-Molecule Survivin Suppressant, Induces Regression of Established Human Hormone-Refractory Prostate Tumor Xenografts. *Cancer Res.* 5 de septiembre de 2007;67(17):8014-21.
356. Mondal A, Jia D, Bhatt V, Akel M, Roberge J, Guo JY, et al. Ym155 localizes to the mitochondria leading to mitochondria dysfunction and activation of AMPK that inhibits BMP signaling in lung cancer cells. *Sci Rep.* 30 de julio de 2022;12(1):13135.
357. Chu PY, Koh APF, Antony J, Huang RYJ. Applications of the Chick Chorioallantoic Membrane as an Alternative Model for Cancer Studies. *Cells Tissues Organs.* 29 de marzo de 2021;211(2):222-37.
358. Smith LM, Greenwood HE, Tyrrell WE, Edwards RS, de Santis V, Baark F, et al. The chicken chorioallantoic membrane as a low-cost, high-throughput model for cancer imaging. *Npj Imaging.* 29 de noviembre de 2023;1(1):1-12.

Bibliografía

359. Vidal-Crespo A, Matas-Céspedes A, Rodriguez V, Rossi C, Valero JG, Serrat N, et al. Daratumumab displays in vitro and in vivo anti-tumor activity in models of B-cell non-Hodgkin lymphoma and improves responses to standard chemo-immunotherapy regimens. *Haematologica*. abril de 2020;105(4):1032-41.
360. Shah SB, Carlson CR, Lai K, Zhong Z, Marsico G, Lee KM, et al. Combinatorial treatment rescues tumour-microenvironment-mediated attenuation of MALT1 inhibitors in B-cell lymphomas. *Nat Mater*. abril de 2023;22(4):511-23.
361. de Barrios O, Meler A, Parra M. MYC's Fine Line Between B Cell Development and Malignancy. *Cells*. febrero de 2020;9(2):523.
362. Lin Y, Wong K kin, Calame K. Repression of c-myc Transcription by Blimp-1, an Inducer of Terminal B Cell Differentiation. *Science*. 25 de abril de 1997;276(5312):596-9.
363. Castillo JJ, Bibas M, Miranda RN. The biology and treatment of plasmablastic lymphoma. *Blood*. 4 de septiembre de 2015;125(15):2323-30.
364. Li Z, Van Calcar S, Qu C, Cavenee WK, Zhang MQ, Ren B. A global transcriptional regulatory role for c-Myc in Burkitt's lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 8 de julio de 2003;100(14):8164-9.
365. Chen Z, Stelekati E, Kurachi M, Yu S, Cai Z, Manne S, et al. MiR-150 regulates memory CD8 T cell differentiation via c-Myb. *Cell Rep*. 12 de septiembre de 2017;20(11):2584-97.
366. Liu N, Lucibello FC, Zwicker J, Engeland K, Müller R. Cell Cycle-Regulated Repression of B-myb Transcription: Cooperation of an E2F Site with a Contiguous Corepressor Element. *Nucleic Acids Res*. 1 de agosto de 1996;24(15):2905-10.
367. Catchpole S, Tavner F, Cam LL, Sardet C, Watson RJ. A B-myb Promoter Corepressor Site Facilitates in Vivo Occupation of the Adjacent E2F Site by p107-E2F and p130-E2F Complexes *. *J Biol Chem*. 11 de octubre de 2002;277(41):39015-24.
368. Mattei AL, Bailly N, Meissner A. DNA methylation: a historical perspective. *Trends Genet*. 1 de julio de 2022;38(7):676-707.
369. Orlanski S, Labi V, Reizel Y, Spiro A, Lichtenstein M, Levin-Klein R, et al. Tissue-specific DNA demethylation is required for proper B-cell differentiation and function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 3 de mayo de 2016;113(18):5018-23.
370. Martin-Subero JJ, Oakes CC. Charting the dynamic epigenome during B-cell development. *Semin Cancer Biol*. agosto de 2018;51:139-48.
371. Rosikiewicz W, Chen X, Dominguez PM, Ghamlouch H, Aoufouchi S, Bernard OA, et al. TET2 deficiency reprograms the germinal center B cell epigenome and silences genes linked to lymphomagenesis. *Sci Adv*. 17 de junio de 2020;6(25):eaay5872.
372. Shukla V, Samaniego-Castruita D, Dong Z, González-Avalos E, Yan Q, Sarma K, et al. TET deficiency perturbs mature B cell homeostasis and promotes oncogenesis associated with accumulation of G-quadruplex and R-loop structures. *Nat Immunol*. enero de 2022;23(1):99-108.
373. Leong MML, Lung ML. The Impact of Epstein-Barr Virus Infection on Epigenetic Regulation of Host Cell Gene Expression in Epithelial and Lymphocytic Malignancies. *Front Oncol*. 2021;11:629780.
374. Namba-Fukuyo H, Funata S, Matsusaka K, Fukuyo M, Rahmutulla B, Mano Y, et al. TET2 functions as a resistance factor against DNA methylation acquisition during Epstein-Barr virus infection. *Oncotarget*. 5 de noviembre de 2016;7(49):81512-26.
375. Peng H, Chen Y, Gong P, Cai L, Lyu X, Jiang Q, et al. Higher methylation intensity induced by EBV LMP1 via NF- κ B/DNMT3b signaling contributes to silencing of PTEN gene. *Oncotarget*. 19 de mayo de 2016;7(26):40025-37.
376. Tsai CL, Li HP, Lu YJ, Hsueh C, Liang Y, Chen CL, et al. Activation of DNA Methyltransferase 1 by EBV LMP1 Involves c-Jun NH2-Terminal Kinase Signaling. *Cancer Res*. 18 de diciembre de 2006;66(24):11668-76.

377. Kaplun DS, Kaluzhny DN, Prokhortchouk EB, Zhenilo SV. DNA Methylation: Genomewide Distribution, Regulatory Mechanism and Therapy Target. *Acta Naturae*. 2022;14(4):4-19.
378. Otani J, Nankumo T, Arita K, Inamoto S, Ariyoshi M, Shirakawa M. Structural basis for recognition of H3K4 methylation status by the DNA methyltransferase 3A ATRX–DNMT3–DNMT3L domain. *EMBO Rep*. noviembre de 2009;10(11):1235-41.
379. Li Y, Fan Z, Meng Y, Liu S, Zhan H. Blood-based DNA methylation signatures in cancer: A systematic review. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 1 de enero de 2023;1869(1):166583.
380. Schlaitz AL, Thompson J, Wong CCL, Yates JR, Heald R. REEP3/4 Ensure Endoplasmic Reticulum Clearance from Metaphase Chromatin and Proper Nuclear Envelope Architecture. *Dev Cell*. 12 de agosto de 2013;26(3):315-23.
381. Luo S, Liu Z, Chang H, Cheng X, Qian R, Gao Y, et al. Potential value of expression of receptor accessory protein 4 for evaluating the prognosis of lower-grade glioma patients. *Aging*. 28 de marzo de 2024;16(7):6188-211.
382. Liu K, Zheng M, Lu R, Du J, Zhao Q, Li Z, et al. The role of CDC25C in cell cycle regulation and clinical cancer therapy: a systematic review. *Cancer Cell Int*. 3 de junio de 2020;20(1):213.
383. Sur S, Agrawal DK. Phosphatases and kinases regulating CDC25 activity in the cell cycle: clinical implications of CDC25 overexpression and potential treatment strategies. *Mol Cell Biochem*. 1 de mayo de 2016;416(1):33-46.
384. Cui X, Peng Q, Li R, Lyu X, Zhu C, Qin X. Cell division cycle associated 8: A novel diagnostic and prognostic biomarker for hepatocellular carcinoma. *J Cell Mol Med*. diciembre de 2021;25(24):11097-112.
385. Wan S, He Y, Zhang B, Yang Z, Du FM, Zhang CP, et al. Overexpression of CDCA8 Predicts Poor Prognosis and Promotes Tumor Cell Growth in Prostate Cancer. *Front Oncol*. 5 de abril de 2022;12:784183.
386. Wu H, Liu S, Wu D, Zhou H, Sui G, Wu G. Cell division cycle-associated 8 is a prognostic biomarker related to immune invasion in hepatocellular carcinoma. *Cancer Med*. 2023;12(8):10138-55.
387. Wang X, Wang H, Xu J, Hou X, Zhan H, Zhen Y. Double-targeting CDCA8 and E2F1 inhibits the growth and migration of malignant glioma. *Cell Death Dis*. 1 de febrero de 2021;12(2):1-12.

10. ANEXO

El proyecto de investigación desarrollado durante la presente tesis doctoral ha sido llevado a cabo en el grupo de Neoplasias Linfoides del Instituto de Investigación contra la Leucemia Josep Carreras bajo la dirección de José Tomás Navarro Ferrando y Maria Joao Gomes Monteiro Lopes Baptista.

Mi contratación laboral durante la tesis doctoral ha sido efectuada a cargo del propio grupo de investigación, el grupo de Neoplasias Linfoides a través del Instituto contra la Leucemia Josep Carreras. El soporte económico para el desarrollo del proyecto ha sido gracias al proyecto FIS (PI19/01588) del Instituto de Salud Carlos III, al proyecto Gilead (GLD19/00121) y a la Fundación Josep Carreras.