



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Papel de la proteína lisosomal LAPT_{M4B} en Leucemia Mieloide Aguda

Jennifer Delgado Martínez

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación

Programa de Doctorado en Biomedicina

- Instituto de Investigación contra la Leucemia Josep Carreras -

Papel de la proteína lisosomal LAPT_{M4B} en Leucemia Mieloide Aguda

Memoria presentada por Jennifer Delgado Martínez para optar al título de doctor
por la Universidad de Barcelona

Ruth Muñoz Risueño
la directora

Jennifer Delgado Martínez
la doctoranda

Albert Tauler Girona
el tutor

Jennifer Delgado Martínez

Barcelona, 2023

Este estudio ha sido financiado por la Fundación de la Marató de TV3 (2018) y se ha llevado a cabo en el Instituto de Investigación contra la Leucemia Josep Carreras.

“Soy incapaz de creer en la infinidad, pero tampoco acepto lo finito.”

Simone de Beauvoir

Agradecimientos

Pese a que el camino no ha sido demasiado largo, hemos tenido que agarrarnos en algunas curvas, sortear bastantes piedras y escalar montañas sin arnés, pero lo importante es que hemos conseguido llegar a la cima y coronarla.

Quién le diría a mi yo de hace 3 años que iba a aprender tanto en este tiempo, que iba a descubrir a fondo lo que es la ciencia y que lo haría de la mejor forma posible, porque en época de pandemia e incertidumbres, el microambiente ha sido insuperable, gracias a todos los que me habéis acompañado, dado la mano o empujado a seguir en los vaivenes de este viaje. Os quiero.

En primer lugar, gracias por millonésima vez y seguro que no última a **Ruth**, por darme esta oportunidad que ha marcado mi vida profesional y por supuesto, personal. Gracias por ayudarme de cerca y de lejos, por darme la seguridad que yo no tenía, por confiar infinitamente en mí, por creer que este proyecto saldría cuando el pronóstico apuntaba lluvias torrenciales y peligro de ahogamiento. Pero especialmente, gracias por ser humana antes que jefa, algo que ha marcado la diferencia en todo momento.

No puedo separar este agradecimiento del resto del **Risueño Lab**, mis grandes maestros y compañeros. A todos vosotros, gracias por enseñarme lo que es el compañerismo sincero, por transmitirme vuestra pasión por la ciencia, cada uno en su estilo propio, por la paciencia y el cariño desde el momento en el que llegué con una gran mochila llena de miedo y timidez hasta hoy día, gracias por ayudarme a crecer.

Crec que ja va sent l'hora de posar-me a parlar català, més val tard que mai, espero que no em saqueu molts errors. Perquè per a això el **Pepe Cornet** té un talent especial. Gràcies Pepe per introduir-me al món dels lisosomes, per guiar-me i ensenyar-me a cada pas, per explicar-me tot mil vegades i pels moments de teories divertides els divendres a la vesprada. Però sobretot, per tu visió multidisciplinar de tot, per tu creativitat i la teva forma de ser. Al **Pepe Carbó** per saber buscar solució

als problemes, per interessar-se pel projecte i intentar donar-li voltes i voltes, per les seves recomanacions muntanyeres i de menjar, i en especial per transmetre la seva forma de viure la vida, amb una felicitat innata i com si fora tasca senzilla. A **Laia**, mil gracias por todos tus consejos de lab y de vida, por pelearte con mis datos cuando yo no podía más, por hacer más amenos los ratos con los ratolins, por los tips de cocina y plantitas (ojalá algún día alcanzar tu oasis vegetal), por tu serenidad y capacidad resolutive según el momento requiere, por ser más de lo que crees. To **Lise**, I have the dream of being as perfect as you are in the lab and out of it. Thank you for being so natural, sweet and humble, to transmit pace and to make easy those difficult things. A l'**Antònia**, mira que solament hem coincidit en comptades ocasions, però han sigut suficients per entendre l'afecte i el legat humorístic deixat al Risueño Lab.

Del mismo modo, gracias también a las chicas de prácticas, **Júlia** y **Anna Navarro**, por su esfuerzo y ganas de aprender y a **Ana Núñez**, por ser una trabajadora nata y facilitarnos la vida con la preparación de los buffers y las mil Maxis que realizó.

Sin irnos mucho más lejos, gracias a los **Buschbecks**, por vuestro carácter amable y social, y por acogerme como a una más en vuestra mesa durante mis últimos meses por allí. En especial, gracias a **Oli**, por los ratitos en cultivos, los dramas acompañados de canciones tristes y las quejas compartidas con una cerveza. Dudaba del idioma de este agradecimiento, pero después de verte hablar andaluz, no me cabe duda de que sirves para todo.

La expedición por el IJC también me ha permitido conocer más a fondo a **Margot**, a **Xabi** y a **Judith** del Graupera Lab. Gracias básicamente por hacerme reír, mantenerme al día de los cotilleos, compartir dudas, dramitas y chocolate.

También quería dejar por escrito un especial agradecimiento a **Kiko**, por estar al pie del cañón siempre y hacerme de escudo protector sigilosamente, así como por la buena acogida de su lab.

Cuando vives fuera de tu lugar de origen, valoras mucho más las relaciones sociales, porque como decía la canción, “*Only hate the road when you're missing home*” (*Passenger*). Por suerte, la presencia de mis biólogos de confianza ha cambiado por completo la experiencia barcelonesa. Mil gracias por haber creado una comuna valenciana en estas tierras, por haber descubierto Barcelona y alrededores (Budapest) juntos, por estos años tan bonitos. A **Tamara**, por ser de las primeras amigas de la carrera allá por el 2015 y mira por dónde vamos ya. Gracias por aportar intensidad a la vida, por sorprendernos con tus mega ensaladas en el pisito de Hospitalet, por ser un torbellino que llegará tan lejos como quiera. A **Cris**, un ser de luz rosa. Gracias por intentar que todos los que te rodean vean las cosas buenas de la vida, por aportar realismo y optimismo a partes iguales, por las experiencias vitales compartidas y la amistad sincera. Sin olvidar a **Manu**, por su preocupación por el bienestar de los demás, por compartir sus visitas a Barcelona y porque a las buenas personas hay que darles las gracias. A **Manuel**, la última incorporación del team bio, por dar sin esperar nada a cambio, por ser el alma de la fiesta, por ponerle chispa, risas, comida gourmet y coche a nuestras aventuras.

De camino a casa hago una parada en Valencity, para agradecer al resto de biólogos que compartieron esos años conmigo y por descubrirme la vida universitaria. En especial, al resto de las *biogirls*. Mi **Arantxi**, por aquellas prácticas de laboratorio tan divertidas y por sentir que no ha pasado el tiempo cada vez que nos vemos, a **Ali** por contagiar de energía y ritmo a todo el que está cerca. Por último, a la alegría de la huerta valenciana llegada desde Vitoria, **Saioa**.

En tierras villeneras, tengo que agradecer a mis amigas por su papel crucial en mi felicidad. A pesar de vernos menos de lo que nos gustaría, nos alegramos tanto de los logros de las demás que los ánimos recorren km y se sienten como abrazos reales. A **Lara, Carol, Cristina, Pilar, Andrea, Isabel, M^o José, Marías³, Inés y Elenas²**, por compartir la transición de la niñez/adolescencia hasta convertirnos en las grandes mujeres que somos hoy en día, llenas de orgullo las unas por las otras. Gracias por el apoyo, la diversidad aportada por cada una, las ganas de reencontrarnos a menudo, los mil momentos de diversión y el cariño.

Sin lugar a dudas, la base de todo reside en mi familia. Aunque nombrarlos a todos daría para escribir otra tesis, resumiré en un gran “gracias” el interés mostrado por todos ellos a lo largo de estos años. Con mención especial a mis cuatro **abuelitos (Aniceto, Elena, Fernando y Antonia)**, por haberme demostrado sin palabras el significado de humildad, por recordarme de dónde venimos, por los abrazos sinceros, las magdalenas, los palabrejos y las palabrotas, el amor por la naturaleza y el amor en todo su esplendor.

Muy especialmente, a **mi madre** y a **mi padre**, porque no conozco a personas más buenas que vosotros, por enseñarme que la educación no siempre está en los libros, por animarme a abrir las alas a pesar del miedo, por el cariño y la ayuda infinita. Gracias por ser ese arnés protector en ésta, y en todas las montañas escaladas en mi vida. Dentro de casa, a **María**, mi hermana, mi amiga, mi mitad. Por estar en cada paso que he dado desde los dos años, por ser mi ejemplo de libertad, por enseñarme mucho a pesar de ser la pequeña, por lo bonita que eres y porque siempre, siempre, hasta la raíz. Además, desde el edificio adyacente o a miles de km, gracias a mi “hermana” mayor, **Judit**, por sus miles de formas de cuidar-nos, por las metamorfosis sufridas, porque por lejos que estemos siempre estamos juntas y vemos la misma Luna.

Finalmente, pero no menos importante, a **Ignacio**. Por acompañarme desde el otro lado del sofá o desde la punta opuesta del país, con virus mortales en el ambiente o volcanes en erupción, por ayudarme a crecer y por crecer juntos. Gracias por ser mi campamento base en esta gran subida, por enseñarme a ver el Sol en los tramos de sombra, por curar con cariño los arañazos del viaje, por cuidar mi salud mental con chocolate, por las aventuras vividas y por supuesto, por el amor real.

Resumen

La leucemia mieloide aguda (LMA) es una enfermedad altamente heterogénea que hoy en día continúa demandando nuevos avances terapéuticos para hacer frente a su alta mortalidad. Este trabajo se ha centrado en explorar el papel de la proteína lisosomal LAPTM4B y en determinar su potencial como diana terapéutica en esta grave neoplasia hematológica.

LAPTM4B ha sido previamente estudiado en diversos tipos tumorales, denotando su implicación en la proliferación, migración, regulación de la autofagia o quimiorresistencia. No obstante, la función de LAPTM4B ha sido escuetamente abordada en tumores hematológicos. En este trabajo se demuestra la asociación entre una alta expresión de LAPTM4B y un pronóstico poco favorable en LMA. Asimismo, la caracterización de ambas isoformas de LAPTM4B nos ha permitido detectar por primera vez una mayor expresión de la isoforma corta en LMA, así como, su mayor implicación en procesos ligados al lisosoma, probablemente por las diferencias en la distribución celular de ambas isoformas. En cuanto a las capacidades leucemogénicas, se ha demostrado que ambas isoformas participarían de forma similar en la generación y progresión de la enfermedad. El incremento observado en la actividad de la vía de señalización de las MAPK en presencia de LAPTM4B podría ser el motor para el desarrollo de este fenotipo maligno. Por otro lado, la expresión de LAPTM4B se ha correlacionado positivamente con un incremento en la resistencia a citarabina, el tratamiento quimioterápico estándar de LMA. Aunque las causas de dicha resistencia todavía son desconocidas, los daños en el ADN, la modulación de la autofagia o alteraciones en la internalización o activación de la citarabina podrían ser algunos de los múltiples mecanismos de adquisición o mantenimiento de la resistencia.

En conjunto, su expresión aumentada en los subtipos de LMA con peor pronóstico, en las recaídas y durante la quimiorresistencia, convierten a LAPTM4B en un marcador pronóstico en LMA. Por todo lo anterior, modular génica o farmacológicamente la expresión y, por ende, la función de LAPTM4B podría resultar beneficioso para pacientes de LMA.

Abstract

Acute myeloid leukaemia (AML) is a highly heterogeneous disease that today continues to demand new therapeutic advances to deal with its high mortality. This project has focused on deciphering the role of the lysosomal protein LAPTM4B and determining its potential as a therapeutic target in this severe haematological neoplasm.

LAPTM4B has previously been studied in diverse tumour types, revealing its involvement in proliferation, migration, autophagy regulation or chemoresistance. Nevertheless, LAPTM4B function in haematological tumours has been tackled briefly. In this project, we demonstrate the association between high LAPTM4B expression and an adverse prognosis in AML. Furthermore, LAPTM4B isoforms characterization has allowed us to detect for the first time a higher expression of the short isoform in AML, in addition to its major implication in lysosomal processes, probably due to the different cellular distribution of both isoforms. Regarding the leukemogenic capabilities, it has been demonstrated that both isoforms have a similar role in the generation and progression of the disease. The increased activity observed in the MAPK signalling pathway in the presence of LAPTM4B could be the driven force for the development of this malignant phenotype. On the other hand, LAPTM4B expression has positively been correlated to cytarabine resistance, the standard chemotherapy in AML. Although, this resistance causes are yet unknown, DNA damage, autophagy modulation or alterations of the cytarabine internalization or activation could be some of the multiple mechanisms of acquisition or maintenance of the resistance.

In summary, an increased expression in AML subtypes with poor outcomes, in relapse and along chemoresistance, make LAPTM4B a prognostic marker in AML. For all the above, the genetic or pharmacological modulation of the expression and, therefore, the function of LAPTM4B could be beneficial for AML patients.

Índice

1. INTRODUCCIÓN.....	33
1.1. Introducción al cáncer	35
1.2. Neoplasias hematológicas	36
1.2.1. Leucemia mieloide aguda.....	36
1.2.2. Células madre leucémicas	38
1.2.2.1. Identificación de las células madre leucémicas	38
1.2.2.2. Modelos de heterogeneidad.....	40
1.2.3. Tratamientos.....	41
1.2.3.1. Inducción	42
1.2.3.2. Consolidación.....	42
1.2.3.3. Terapias dirigidas	43
1.2.4. Quimiorresistencia y recaídas.....	45
1.3. Lisosomas	47
1.3.1. Descubrimiento	47
1.3.2. Estructura y características	47
1.3.3. Composición	48
1.3.4. Formación.....	49
1.3.5. Función	50
1.3.6. Muerte celular.....	52
1.3.7. Lisosomas y cáncer.....	55
1.3.8. Lisosomas y neoplasias hematológicas	59
1.3.8.1. Quimiorresistencia y lisosomas.....	61
1.4. LPTM4B.....	64
1.4.1. Estructura e isoformas	64
1.4.1.1. Isoforma larga	65
1.4.1.2. Isoforma corta.....	65
1.4.2. Localización intracelular	66
1.4.3. Expresión.....	67
1.4.4. Función	69
1.4.5. LPTM4B en cáncer	73
1.4.5.1. Quimiorresistencia.....	76
1.4.6. Dianas frente a LPTM4B	77
2. OBJETIVOS	81
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	85
3.1. Materiales.....	87
3.1.1. Líneas y cultivos celulares.....	87

3.1.2. Muestras primarias.....	87
3.1.3. Compuestos.....	88
3.1.4. Anticuerpos acoplados a fluoróforo	89
3.1.5. Anticuerpos primarios.....	90
3.1.6. Cebadores utilizados para la RT-PCR semi-cuantitativa.....	90
3.2. Métodos	92
3.2.1. Generalidades y estadística	92
3.2.2. Contaje celular y viabilidad.....	92
3.2.3. Análisis de la expresión de proteínas en superficie	93
3.2.3.1. Análisis de la diferenciación mieloide	93
3.2.3.2. Análisis de marcadores de migración celular	93
3.2.3.3. Análisis de la expresión génica por PCR semi-cuantitativa en tiempo real	93
3.2.4. Microscopía de fluorescencia.....	94
3.2.4.1. Análisis de la expresión de LAPTM4B, LAMP1 o LC3B por microscopía de fluorescencia.....	94
3.2.4.2. Análisis del compartimento lisosomal mediante <i>LysoTracker</i>	95
3.2.5. Estudios de afectación lisosomal.....	95
3.2.5.1. Análisis del compartimento lisosomal mediante <i>LysoTracker</i>	95
3.2.5.2. Análisis del calcio intracelular	96
3.2.6. Clonaje y transducción.....	96
3.2.6.1. Clonaje en el plásmido intermediario pJET1.2.....	96
3.2.6.2. Clonaje en el vector intermediario m <i>Emerald-C1</i>	97
3.2.6.3. Clonaje en el vector lentiviral pCDH-EF1-FHC	97
3.2.6.4. Clonaje de ARNsg en el plásmido pLentiGuide-Puro	98
3.2.6.5. Transducción de vectores lentivirales en células leucémicas	100
3.2.6.6. Análisis de la señalización con vectores reporteros	100
3.2.7. Estudios de supervivencia y proliferación.....	101
3.2.7.1. Citotoxicidad	101
3.2.7.2. Cálculo de las concentraciones efectivas medias (EC50)	101
3.2.7.3. Ensayo de proliferación con DiI	102
3.2.7.4. Análisis del ciclo celular	102
3.2.7.5. Análisis de las reversiones de la citotoxicidad.....	102
3.2.8. Ensayo de clonogenicidad.....	103
3.2.9. Estudios <i>in vivo</i>	103
3.2.9.1. Xenotrasplante con líneas celulares.....	104
3.2.9.2. Ensayo de competición de xenotrasplante con líneas celulares	105
3.2.10. Western Blot.....	105
3.2.11. Generación de líneas resistentes a citarabina	106
3.2.12. Estudio de la senescencia	107
4. RESULTADOS.....	109
4.1. Resultados preliminares	111

4.2. Estudio de la familia LAPTM en LMA.....	113
4.2.1. Expresión de la familia LAPTM en células hematopoyéticas sanas y neoplasias	113
4.2.2. Expresión de la familia LAPTM en LMA asociada con mal pronóstico	114
4.3. Estudio de LAPTM4B en LMA.....	116
4.3.1. Expresión de LAPTM4B en células hematopoyéticas sanas y neoplasias	116
4.3.1.1. Generación de líneas celulares con sobreexpresión de LAPTM4B	120
4.4. Caracterización de LAPTM4B en LMA.....	127
4.4.1. Evaluación del compartimento lisosomal	127
4.4.2. Implicación de LAPTM4B en la función lisosomal.....	132
4.4.3. Estudio de la señalización basal de LAPTM4B.....	139
4.4.3.1. Estudio de la señalización mediante inhibidores.....	145
4.4.4. Efecto diferencial de LAPTM4B en LMA.....	149
4.5. Papel de LAPMT4B en leucemogénesis.....	160
4.6. Papel de LAPTM4B en quimiorresistencia	167
4.6.1. Sensibilidad a quimioterapia en células con sobreexpresión de LAPTM4B..	167
4.6.2. Implicación de LAPTM4B en la resistencia a citarabina.....	169
4.6.2.1. Hiperactivación de la vía MAPK.....	171
4.6.2.2. Aumento de autofagia	171
4.6.2.3. Implicación de ATR en quimiorresistencia.....	173
4.6.2.4. LAPTM4B y la activación/inhibición de la citarabina.....	177
4.7. Estudio de la pérdida de función de LAPTM4B en LMA.....	190
5. DISCUSIÓN.....	197
6. CONCLUSIONES	215
7. BIBLIOGRAFÍA.....	219
8. ANEXOS.....	263
I. Tabla de pacientes de LMA	265
II. Publicaciones.....	267

Lista de figuras

Figura 1. Modelo jerárquico de la hematopoyesis normal y la leucemogénesis en leucemia mieloide aguda.....	40
Figura 2. Modelo de adquisición de quimiorresistencia.	45
Figura 3. Esquema general de los procesos de endocitosis, fagocitosis y autofagia.	52
Figura 4. Esquema general de la ruta intracelular de la citarabina y de su activación	63
Figura 5. Estructura de las diferentes isoformas de LAPTM4B y su disposición en la membrana.	66
Figura 6. Mapa del plásmido mEmerald-C1.	97
Figura 7. Mapa del plásmido pCDH-EF1-FHC.....	98
Figura 8. Esquema del clonaje de LAPTM4B en pCDH-EF1-FHC.	98
Figura 9. Mapa de los plásmidos pLentiCas9-Blast y pLentiGuide-Puro.....	99
Figura 10. Las células HL-60 resistentes generadas tienen una menor sensibilidad a la citarabina e incrementan el valor de su EC50.	107
Figura 11. Lista de 17 genes con valor pronóstico y asociados a células madre leucémicas.	112
Figura 12. Expresión de la familia de genes <i>LAPTM</i> en muestras sanas o de pacientes de LMA.	114
Figura 13. Una alta expresión de <i>LAPTM4B</i> disminuye la supervivencia y se asocia con las recaídas en LMA.....	115
Figura 14. Una elevada expresión génica de <i>LAPTM4B</i> se asocia a LMA con cariotipo complejo y a células sanas poco diferenciadas.	117
Figura 15. Esquema de la posición y amplificación de los cebadores utilizados para analizar la expresión de LAPTM4B por RT-PCR semi-cuantitativa.	118
Figura 16. Las células de neoplasias hematológicas expresan niveles variables de <i>LAPTM4B</i> , aunque con cierta tendencia de aumento de la isoforma corta a nivel transcripcional respecto a células sanas.	119
Figura 17. Expresión de LAPTM4B en líneas celulares de neoplasias hematológicas.	120

Figura 18. Comprobación de las transducciones de Emerald-LAPTM4B mediante citometría de flujo.....	122
Figura 19. Validación de la expresión de las formas de LAPTM4B en las células transducidas.....	123
Figura 20. Validación de la transducción y localización de las isoformas de LAPTM4B.....	125
Figura 21. El tratamiento con cloroquina produce una concentración de LAPTM4B en puntos más discretos.	126
Figura 22. La cloroquina induce un aumento tanto de la masa lisosomal en líneas de LMA, así como de LAPTM4B cuando se encuentra expresado ectópicamente. ...	131
Figura 23. La expresión ectópica de LAPTM4B incrementa la actividad de TFEB en respuesta a cloroquina.	133
Figura 24. LAPTM4B no ejerce ningún efecto diferencial en la concentración de calcio intracelular.	135
Figura 25. Evaluación del marcador autofágico LC3B y su relación con LAPTM4B.	138
Figura 26. El tratamiento con cloroquina no induce cambios, en términos de muerte celular, en células con sobreexpresión de LAPTM4B respecto a las células control.....	139
Figura 27. Las isoformas LAPTM4B larga y corta activan mayoritariamente la vía de señalización mediada por el elemento SRE (MEK/Erk).....	142
Figura 28. LAPTM4B activa la vía de señalización de las MAP quinasas a través de un aumento en la proporción p-Erk/Erk.	145
Figura 29. La expresión de LAPTM4B en la línea de LMA HL-60, confiere una sensibilidad al inhibidor LY294-002 pero no a PD184352.....	147
Figura 30. Señalización regulada por LAPTM4B.....	149
Figura 31. La sobreexpresión de LAPTM4B no genera cambios en la respuesta al tratamiento con gilteritinib.	151
Figura 32. La expresión de las isoformas de LAPTM4B no induce cambios en los marcadores de diferenciación a nivel basal, aunque la vitamina D3 tiene un mayor efecto diferenciador en presencia de las isoformas de LAPTM4B.....	153
Figura 33. La sobreexpresión de LAPTM4B produce desajustes en el ciclo celular posiblemente a través de p21.	156

Figura 34. LAPTM4B no afecta la proliferación <i>in vitro</i> de las células de LMA transducidas.....	157
Figura 35. LAPTM4B no induce diferencialmente la expresión del receptor CD184 (CXCR4).	158
Figura 36. La capacidad clonogénica de las células transducidas con LAPTM4B varía según el contexto celular.	161
Figura 37. LAPTM4B incrementa la capacidad leucemogénica in vivo.	162
Figura 38. La presencia de LAPTM4B aumenta la capacidad leucemogénica de la LMA.	166
Figura 39. Las células HL-60, KG-1 y K-562 transducidas con LAPTM4B presentan una mayor resistencia al tratamiento con citarabina.	168
Figura 40. La línea celular HL-60 resistente a citarabina no presenta sobreexpresión de LAPTM4B.....	170
Figura 41. El tratamiento combinado de citarabina y Ly294-002 no restaura la sensibilidad a citarabina en las células HL-60 con sobreexpresión de LAPTM4B.	171
Figura 42. El tratamiento combinado de citarabina y cloroquina resensibiliza a las células HL-60 con sobreexpresión de LAPTM4B.	172
Figura 43. Modelo de señalización de ATR y ATM por daños en el ADN.	174
Figura 44. El inhibidor de ATR (elimusertib) sensibiliza las células a citarabina, especialmente, a aquellas células transducidas con LAPTM4B resistentes.	175
Figura 45. El estado senescente no varía en presencia de LAPTM4B ni se induce tras el tratamiento con citarabina..	177
Figura 46. La sobreexpresión de LAPTM4B en HL-60 ocasiona cambios en la expresión génica que favorecen la resistencia a citarabina.....	179
Figura 47. Modelo del metabolismo de la citarabina en las HL-60 con expresión ectópica de LAPTM4B.....	181
Figura 48. La sobreexpresión de LAPTM4B en LMA promueve la expresión génica de AKR1C3.....	182
Figura 49. La expresión proteica de CDA es limitada y variable en las células evaluadas... ..	183
Figura 50. Las células HL-60 transducidas con LAPTM4B incrementan la expresión de CDA a nivel proteico.	184

Figura 51. CDA está sobreexpresado en muestras primarias de LMA de forma independiente a la expresión de LAPTM4B en estas muestras.	185
Figura 52. El inhibidor de CDA (tetrahidrouridina) restaura la sensibilidad a citarabina en las células, especialmente en las células transducidas con LAPTM4B resistentes.	187
Figura 53. El tratamiento con AraC o vitamina D3 incrementa la expresión de <i>CDA</i> en HL-60.	189
Figura 54. Validación del silenciamiento por CRISPR-Cas9.	191
Figura 55. La represión de la expresión de LAPTM4B disminuye la resistencia y la capacidad clonogénica de las células MM-1.	193
Figura 56. La expresión de LAPTM4B silenciado mediante CRISPR-Cas9 se recuperó a lo largo del tiempo.	195
Figura 57. Papel de las isoformas de LAPTM4B en LMA.	202
Figura 58. Efecto de la señalización derivada de una alta expresión de LAPTM4B en LMA.	204
Figura 59. Modelo de las posibles vías de quimiorresistencia ligadas a LAPTM4B en LMA.	209
Figura 60. Posibles estrategias terapéuticas dirigidas a LAPTM4B y sus efectos en el contexto leucémico.	212

Lista de tablas

Tabla 1. Información de las líneas celulares.	87
Tabla 2. Compuestos utilizados.....	89
Tabla 3. Lista de anticuerpos acoplados a fluoróforo para citometría de flujo. Todos reconocen el marcador de superficie humano, excepto si se especifica.	89
Tabla 4. Lista de anticuerpos primarios.....	90
Tabla 5. Lista de cebadores utilizados para la RT-PCR semicuantitativa.	91
Tabla 6. Cebadores utilizados para amplificar LAPTM4B y delimitarlo con las dianas de restricción EcoRI-BamHI.	96
Tabla 7. Cebadores específicos para los ARNsg.	99
Tabla 8. Relación de plásmidos complementarios necesarios para la generación de lentivirus de tercera generación.....	100
Tabla 9. Relación de pacientes de LMA incluidos en los estudios.	266

Abreviaturas

- ADN:** ácido desoxirribonucleico
- ADNc:** ADN complementario
- AKR1C3:** miembro C3 de la familia de aldo-ceto reductasa 1
- AMPc:** adenosín monofosfato cíclico
- ANOVA:** análisis de la varianza
- AraC:** citarabina
- AraCDP:** citarabina difosfato
- AraCMP:** citarabina monofosfato
- AraC R:** resistente a citarabina
- AraCTP:** citarabina trifosfato
- AraU:** uracil-arabinósido (AraC inactiva)
- ARN:** ácido ribonucleico
- ARNm:** ácido ribonucleico mensajero
- ATG:** gen/proteína relacionada con autofagia
- ATM:** Ataxia-telangiectasia mutada
- ATP:** adenosín trifosfato
- ATR:** ataxia telangiectasia y relacionados con Rad3
- ATRA:** ácido holotransretinoico
- BCRP:** proteína de resistencia al cáncer de mama
- BIRC5:** survivina
- BSA:** albúmina de suero bovino
- CAD:** moléculas catiónicas anfífilas
- CBR1:** carbonil reductasa 1
- CDA:** citidina deaminasa
- CFU:** unidad formadora de colonias
- CLEAR:** red de expresión y regulación lisosomal coordinada
- CNT3:** transportador concentrador de nucleósidos 3
- CQ:** cloroquina
- CR:** remisión completa

CRE: elemento respuesta a AMPc

CRISPR: repeticiones palindrómicas cortas, agrupadas y regularmente interespaciadas

Ct: umbral de ciclo

dCK: deoxicitidina quinasa

DDR: respuesta al daño en el ADN

DiI: 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine

DFKZ: Centro Alemán de Investigación Oncológica

DMSO: dimetilsulfóxido

EC50: concentración media máxima eficaz

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EGF: factor de crecimiento epidérmico

EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico

Eli: elimusertib

Eme: *Emerald*

ENT1-3: transportadores de equilibrio de nucleósidos 1-3

ESCRT: complejos de clasificación endosomal necesarios para la maquinaria de transporte

FAB: francesa-americana-británica

FLT3: tirosina cinasa parecida a fms-3

FBS: suero fetal bovino

FSC: dispersión frontal de la luz

GARP: proteína retrógrada asociada a Golgi

GFP: proteína verde fluorescente

GMPc: guanosín monofosfato cíclico

ENT: transportador de equilibrio de nucleósidos

HBSS: solución salina equilibrada de Hanks

HSC: célula madre hematopoyética

IDH1/2: Isocitrato deshidrogenasa 1/2

IJC: Institut de Recerca contra la Leucèmia Josep Carreras

ITD: duplicaciones internas en tándem

LAMP: proteínas asociadas a membrana lisosomal
LAPTM: proteínas transmembrana asociadas a lisosoma
LC3: cadena corta 3 de las proteínas asociadas a microtúbulos 1A/1B
Leu: leucina
Lin-: linaje negativo
LMA: leucemia mieloide aguda
LMC: leucemia mieloide crónica
LMP: permeabilización de la membrana lisosomal
LPA: leucemia promielocítica aguda
LSC: célula madre leucémica
LSD: enfermedades de almacenamiento lisosómico
LTR: *Lysotracker*
LY: Ly294-002
MAPK: proteína quinasa mitogénica activadora
MCOLN1: proteína mucolipina-1
MDR: fenotipo de resistencia a multidrogas
MFI: intensidad media de fluorescencia
MM-1: MonoMac-1
MO: médula ósea
MRP7: proteína de resistencia a multidrogas 7
mTOR: diana mecanística de la rapamicina
mTORC1: complejo 1 de la diana mecanística de la rapamicina
N/D: sin datos
NaCl: suero fisiológico
NDK: quinasa nucleósido difosfato
NFAT: factor nuclear de las células T activadas
NIH: Instituto Nacional de la Salud
NOS: sin otra especificación
NPM1: nucleofosmina 1
ns: no significativo
NT: no transducido

NT5E: 5'-nucleotidasa
OMS: organización mundial de la salud
PARP: poli ADP ribosa polimerasa
P-gp: glicoproteína-P
PBS: tampón fosfato salino
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PD: PD184352
PI3K: fosfatidilinositol 3-quinasa
PIP2: fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato
PIP3: fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato
PN-I: pirimidina nucleosidasa I
QR: quimiorresistencia
ROS: especies reactivas del oxígeno
RT-PCR: PCR semicuantitativa en tiempo real
RTQ: receptor tirosina quinasa
SA- β -gal: beta galactosidasa
SEM: error estándar de la media
ARNsg: ARN monocatenario guía
SP: sangre periférica
SRE: elemento respuesta a suero
SSC: dispersión lateral de la luz
THU: tetrahidrouridina
TFEB: factor de transcripción EB
TGF- β 1: factor de crecimiento transformante beta 1
Vit D3: vitamina D3
wt: del inglés *wild type* (silvestre)

1. Introducción

1.1. Introducción al cáncer

La definición más reduccionista del cáncer contempla a esta enfermedad como la resultante del crecimiento incontrolado de un conjunto de células (*¿Qué Es El Cáncer?* - NCI, 2021). En cambio, gracias a la potencia de las nuevas tecnologías y a la evolución del conocimiento, las características definitorias de esta enfermedad se han ido modificando para englobar toda su complejidad genotípica y fenotípica en una serie de principios. Actualmente, la lista cuenta con las siguientes características: evasión de los supresores de crecimiento, mantenimiento de la señalización proliferativa, replicación ilimitada, invasión y metástasis, estimulación de la angiogénesis, resistencia a muerte celular (Hanahan & Weinberg, 2000), inestabilidad genómica, alteración del metabolismo celular, evasión del sistema inmune, inflamación pro-tumoral (Hanahan & Weinberg, 2011), senescencia, microbiomas polimórficos, reprogramación epigenética no mutacional y plasticidad fenotípica, que conceptualizan el desarrollo y la progresión del cáncer (Hanahan, 2022).

1.2. Neoplasias hematológicas

Las neoplasias hematológicas engloban un conjunto de enfermedades oncológicas que afectan a la sangre, la médula ósea o el sistema linfático. Según la región anatómica donde se describe por primera vez el tumor, recibirán diferentes nombres y presentarán diferentes características genéticas y fenotípicas entre ellas (Taylor et al., 2017). La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica estas enfermedades en: leucemias, linfomas, enfermedades mieloproliferativas, mielodisplasias y mielomas (Arber et al., 2016).

Para este trabajo, centraremos principalmente nuestra atención en la leucemia mieloide aguda (LMA), la cual presenta una incidencia en la población europea de unos 3,7 casos por cada 100.000, una prevalencia estimada en 11 de 100.000 (Sant et al., 2010; O. Visser et al., 2012), y la menor tasa de supervivencia dentro de las leucemias agudas (Shallis et al., 2019).

1.2.1. Leucemia mieloide aguda

La leucemia mieloide aguda es una enfermedad altamente heterogénea, tanto biológica como clínicamente (Ding et al., 2012; T. J. Ley et al., 2010; Welch et al., 2012). Esta neoplasia hematológica se caracteriza por la expansión clonal de precursores mieloides transformados, denominados blastos, en la médula ósea y sangre periférica (Vakiti & Mewawalla, 2022). Estos blastos presentan una diferenciación y proliferación anómala contribuyendo a la patogénesis de la LMA (De Kouchkovsky & Abdul-Hay, 2016).

Se calcula que la edad media del diagnóstico de LMA se encuentra en torno a los 64 años (Sant et al., 2010), siendo muy rara por debajo de los 45 (Döhner et al., 2017). Comúnmente, el requisito imprescindible para su diagnóstico había sido la presencia de más del 20% de blastos mieloides en la sangre o en la médula ósea (Döhner et al., 2010; S. M. Hwang, 2020). No obstante, recientemente se han incorporado novedades en su diagnóstico, estableciendo que este límite será del 10% en aquellos casos con anomalías genéticas definitorias (como podrían ser las fusiones

PML::RAR α , *RUNX1::RUNX1T1* o las mutaciones *KMT2A*, *NPM1*...), aunque con dos excepciones para los casos de LMA con el gen de fusión *BCR::ABL1* o con la mutación *CEBPA*, donde se mantiene el límite del 20% (Khoury et al., 2022).

A pesar de que ciertas alteraciones citogenéticas como las translocaciones t(8:21) o t(15:17) puedan estar relacionadas con eventos leucemogénicos, lo cierto es que estos procesos todavía son grandes desconocidos, y la realidad es que una gran proporción de los pacientes de LMA presenta un cariotipo normal (Padmakumar et al., 2021; Welch et al., 2012). En términos generales, los pacientes de LMA no se caracterizan por presentar un gran número de mutaciones recurrentes (T. Ley et al., 2013), pero más del 97% de ellos presentan alguna alteración genética (De Kouchkovsky & Abdul-Hay, 2016). Destacan algunas mutaciones en genes de señalización como *FLT3*, *KRAS*, *NRAS* y *KIT* por ser las más frecuentes en su conjunto, presentes en casi un 60% de casos de LMA (Roussel et al., 2020). Sin dejar de mencionar aquellas alteraciones en genes como *NPM1*, *CEBPA*, *MLL*, *TET2* o *RUNX1*, entre otras (Lagunas-Rangel et al., 2017; Roussel et al., 2020).

Recopilando toda la información clínico-patológica y genética surge la **clasificación de la OMS**, revisada por última vez en 2022 (Khoury et al., 2022). Dado que este trabajo se inició previamente a la publicación de esta última categorización, cabe mencionar que la clasificación prevalente durante la realización del trabajo fue la de 2016 (Arber et al., 2016). En este caso, se establecían seis tipos de LMA: LMA con alteraciones genéticas recurrentes, LMA con mielodisplasia, neoplasias relacionadas con la terapia, LMA sin otra especificación (NOS, *not otherwise specified*), sarcoma mielóide y proliferaciones mieloides relacionadas con síndrome de Down (S. M. Hwang, 2020). A diferencia de la versión del 2016, algunas de las modificaciones más significativas de la nueva clasificación serían la eliminación de la categoría de LMA NOS y la transformación del requisito de blastos del 20% al 10% para ciertos casos, como hemos comentado en el apartado del diagnóstico. Esta última versión instaaura dos amplios grupos de LMA: LMA con alteraciones genéticas definitorias, donde los tipos de LMA se especifican en base a ciertas mutaciones recurrentes, fusión de ciertos genes o reordenamientos; y el grupo de LMA definido por su

grado de diferenciación, con diferentes subcategorías según su linaje celular (Khoury et al., 2022).

Con un enfoque diferente, la **clasificación Francesa-Americana-Británica (FAB)** nacida en 1976 (Bennett et al., 1976), se basa mayoritariamente en el estado de diferenciación de los blastos. Sin embargo, hoy en día esta clasificación está en desuso y carece de relevancia clínica puesto que no está relacionada con el pronóstico ni con el tratamiento. Aunque en investigación sigue teniendo cierta utilidad por su relación con el estado de maduración, es meramente una descripción morfológica.

A pesar de ser una enfermedad poco común, y mucho menos frecuente en niños que en adultos, la LMA representa un gran problema de salud global debido a su alta mortalidad, ya que se estima que tan solo un 27% de los enfermos mayores de 19 años, sobrevivirá en un período de 5 años tras el diagnóstico (American Cancer Society, 2022). En líneas generales, cuanto mayor sea la proporción de blastos peor será la evolución de la enfermedad (DiNardo et al., 2016; Hasserjian et al., 2014), debido a que la falta de células sanguíneas sanas propicia la morbilidad (Thomas & Majeti, 2017). Pero pese a todo, el pronóstico de la LMA es muy variable y fluctuará en función de múltiples parámetros como la edad y el estado de salud del paciente, así como, según las características genéticas y moleculares observadas en el mismo (DiNardo & Cortes, 2016). Llegados a este punto, se debe enfatizar que la leucemia promielocítica aguda no se incluye en las tasas de mortalidad dadas sus características especiales y su alta tasa de curación gracias a un tratamiento específico (de Thé et al., 2017; Yilmaz et al., 2021), y por ello, no se considerará en este trabajo.

1.2.2. Células madre leucémicas

1.2.2.1. Identificación de las células madre leucémicas

El sistema hematopoyético sano se presenta como una estructura jerárquica, en la cual, las células madre hematopoyéticas (HSC, del inglés *Hematopoietic Stem Cells*)

estarían en la cima, dando lugar a células efectoras más diferenciadas a medida que bajamos peldaños (**Figura 1**).

Las células madre hematopoyéticas se definen como células indiferenciadas con un gran potencial de regeneración, el cual les permite generar células efectoras maduras de todos los linajes del sistema hematopoyético (Bryder et al., 2006; Hawley et al., 2006). Existen varios tipos de células englobadas en el término “células madre hematopoyéticas”, éstas son las long-term HSC y las short-term HSC (Carroll & St. Clair, 2018). Mientras que las long-term HSC tienen una capacidad ilimitada de autorrenovación, esta capacidad se limita a unas semanas en las short-term HSC (S. J. Morrison & Weissman, 1994; Weissman, 2000).

En lo que respecta a la leucemia, el origen de su alta heterogeneidad y de su capacidad proliferativa podría explicarse con la existencia de unas células transformadas, que poseen capacidades similares a las HSCs como la autorrenovación, alta capacidad de proliferación o la regulación de ciertas vías moleculares de importancia (Trumpp & Haas, 2022). Estas células corresponden con las células madre leucémicas (LSC, del inglés *Leukemic Stem Cells*), descritas por primera vez en los años 90 gracias a la demostración de cómo una subpoblación de células de LMA era capaz de reproducir la enfermedad *in vivo*, investigación liderada por Lapidot, Bonnet y Dick (Bonnet & Dick, 1997; Lapidot et al., 1994). Aunque en un inicio se identificaron las LSCs por sus marcadores en superficie CD34⁺/CD38⁻ y sus características principales de autorrenovación y proliferación indefinida (Jordan, 2002), actualmente, la definición de la LSC es únicamente funcional y se añaden particularidades como un aumento de plasticidad celular y de complejidad del sistema, en comparación con un sistema hematopoyético sano (Trumpp & Haas, 2022).

En líneas generales, defectos en células progenitoras de las HSCs conducirían a la generación de pre-LSC, que tras una serie de transformaciones se convertirán en LSC, y a su vez darán lugar a la patogénesis de neoplasias hematológicas como las leucemias (O'Brien & Rizzieri, 2013; Shin, 2022; Trumpp & Haas, 2022). Este

descubrimiento supuso un antes y después en el campo de la oncología, permitiendo el establecimiento de modelos de investigación en los que recapitular la enfermedad, con la finalidad de mejorar el conocimiento acerca de ella y de testar potenciales tratamientos con mayor fiabilidad (Trumpp & Haas, 2022).

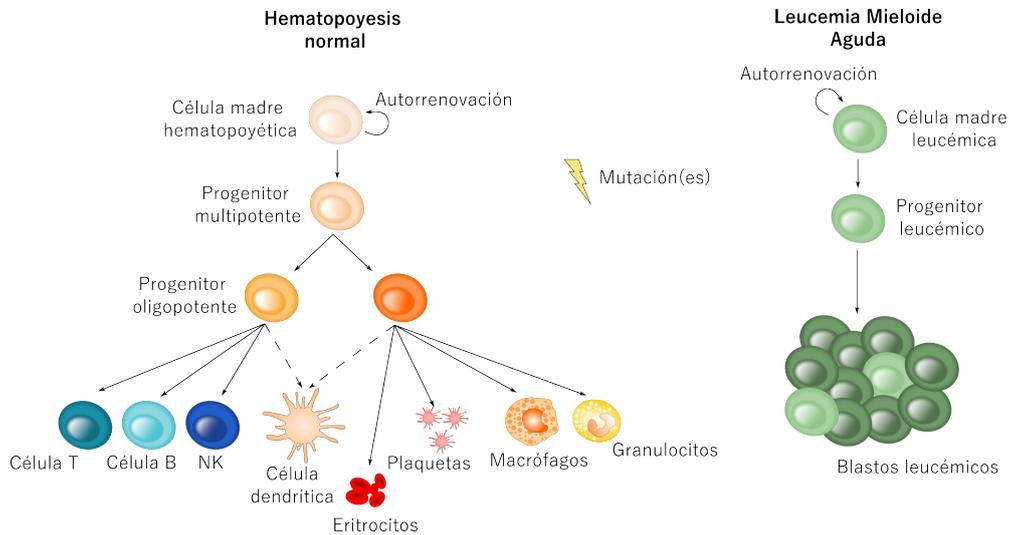


Figura 1. Modelo jerárquico de la hematopoyesis normal y la leucemogénesis en leucemia mieloide aguda. (Cuesta-Casanovas, 2022).

1.2.2.2. Modelos de heterogeneidad

Con la intención de explicar la heterogeneidad, tanto morfológica como funcional, encontrada en la leucemia, surgen tres modelos derivados de diferentes corrientes (Dick, 2008):

En paralelo con el sistema hematopoyético sano, las LSCs también seguirían un **modelo jerárquico o determinista**, compartiendo un fenotipo y unas características muy similares a las de las HSCs (Becker & Jordan, 2011; Dick, 2008; O'Brien & Rizzieri, 2013; Trumpp & Haas, 2022). En este caso, las LSCs estarían en lo más alto de la jerarquía y las células resultantes serían los blastos leucémicos, en lugar de todas las subpoblaciones celulares derivadas de un sistema hematopoyético sano (Lane & Gilliland, 2010) (**Figura 1**).

El **modelo** inicial para explicar el origen de la heterogeneidad tumoral fue el denominado **estocástico**. Este modelo no ha llegado a estar tan extendido, ya que el

jerárquico cobró peso tras la mejora de técnicas para el aislamiento de subpoblaciones celulares y el uso de la citometría de flujo para la detección de marcadores celulares (Becker & Jordan, 2011; B. T. Tan et al., 2006). En este modelo no hay lugar a la predeterminación, la aleatoriedad de eventos extrínsecos y/o intrínsecos serían los causantes de la heterogeneidad tumoral, partiendo de un conjunto de células sin diferencias entre ellas (Becker & Jordan, 2011; Lane & Gilliland, 2010).

Por último, las capacidades de adaptación y la ventaja evolutiva de algunas células madre cancerígenas respecto a otras, dentro de un mismo paciente, podrían ser explicadas por el **modelo de evolución clonal** (Lane & Gilliland, 2010). Este modelo, propuesto por Peter Nowell en 1976, pone sobre la mesa la relación entre el Darwinismo y el cáncer, partiendo de la teoría de la selección natural, donde aquellos seres vivos con rasgos beneficiosos para un determinado ambiente pasarán a la siguiente generación. En el caso del cáncer, las altas tasas de mutación, junto con las presiones del microambiente donde se encuentran las células, como podrían ser la ausencia de nutrientes o la ejercida por los fármacos, modificarán fortuitamente la capacidad de adaptación de las células, permitiendo únicamente que aquellas más resistentes perduren en el tiempo (Greaves & Maley, 2012).

A día de hoy, el modelo más extendido es el jerárquico en conjunto al de evolución clonal intrapaciente. Quizás su semejanza al sistema hematopoyético sano, del cual disponemos de un amplio conocimiento, y los conocimientos actuales sobre las células leucémicas, justifican en cierto modo su veracidad (Dick, 2008). Pese a todo, el verdadero interés clínico reside en detectarlas correctamente y conocer cómo eliminarlas a tiempo, ya que su alto potencial de regeneración haría infructuoso, a corto o largo plazo, el empleo de tratamientos no dirigidos a eliminar las LSCs.

1.2.3. Tratamientos

El tratamiento frente al cáncer tiene como objetivo curar o al menos alargar la supervivencia del paciente con la máxima calidad de vida posible. En el caso de la

LMA, la administración del tratamiento consta de dos fases principales, inducción y consolidación, que veremos a continuación en detalle.

1.2.3.1. Inducción

La terapia de inducción constituiría la primera línea de choque para eliminar las células leucémicas y en la mayoría de los casos se basa en la quimioterapia. La quimioterapia estándar más empleada hasta la fecha en LMA, es la combinación de citarabina (AraC) con antraciclinas (Döhner et al., 2015). Este tratamiento sigue el régimen conocido como 7+3 (Crowther et al., 1973), durante el cual los 7 primeros días se administra citarabina (Ellison et al., 1968), seguido de 3 días de antraciclina, como puede ser daunorrubicina (Bernard et al., 1973). La tasa de respuesta a esta terapia es superior al 60% y casi medio siglo después de su descripción (Yates et al., 1973), sigue siendo la más efectiva (Döhner et al., 2015). Sin embargo, el mayor problema de la LMA son las recaídas, ocurriendo en la mayoría de los pacientes por encima de 60 años, y del 10 hasta un 40% de pacientes jóvenes (Thol & Ganser, 2020). Aunque la terapia de inducción puede llegar a reducir muy significativamente las células leucémicas, es muy probable que un pequeño número de ellas persista, por ello, deberá complementarse con un bloque consolidación para intentar reducir al mínimo las recaídas o para poder abordarlas a tiempo.

1.2.3.2. Consolidación

El objetivo de la fase de consolidación será eliminar esas células reminiscentes que hayan sobrevivido a la quimioterapia. A menudo, estas células son difíciles de detectar, pero es altamente probable que vuelvan a regenerar la enfermedad si no se administra más tratamiento. En esta etapa, siempre que sea posible y los beneficios compensen el riesgo asociado, se procederá a un **trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos**. Estas células ayudarán a reforzar el incipiente sistema hematopoyético del paciente, tras su casi completa eliminación debido a la quimioterapia (Loke et al., 2021), y podrán favorecer la desaparición de células leucémicas residuales por un efecto injerto contra huésped (DeSantes & Sondel, 2009). Otras terapias de consolidación consisten en dar dosis intermedias de citarabina de forma intensiva, tratamiento que también puede preceder al trasplante

de progenitores hematopoyéticos para incrementar su éxito (Döhner et al., 2015; Estey & Döhner, 2006).

Cabe tener en cuenta que, dejando de lado las generalizaciones de los tratamientos estándar, elegir el tratamiento adecuado a cada paciente en clínica es mucho más complejo. Este procedimiento se verá afectado por la presencia de alteraciones genéticas, evolución clonal, resistencia a los fármacos, efectos secundarios y, en definitiva, el estado de salud del paciente.

1.2.3.3. Terapias dirigidas

A pesar de ser el subtipo más común de leucemia aguda, y de los esfuerzos por mejorar la supervivencia de estos pacientes, la terapia frente a LMA prácticamente no ha cambiado de forma significativa en las últimas décadas (Fernandez et al., 2013; Moarii & Papaemmanuil, 2017). Este hecho ha propiciado que hasta día de hoy se mantenga un pronóstico muy poco favorable, especialmente tras las recaídas, donde la esperanza de vida no supera los seis meses (Medeiros, 2018). Ante este problema, surge la necesidad de investigar y desarrollar nuevos compuestos terapéuticos específicos y efectivos frente a esta enfermedad.

Aquí surgen las terapias dirigidas, muchas de las cuales han sido aprobadas en los últimos años por la Agencia Europea del Medicamento (EMA) y la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) (Kayser & Levis, 2022; H. Liu, 2021; Molica & Perrone, 2022). Estas terapias se emplearán la mayoría de las ocasiones en recaídas, o en personas que por diferentes razones no hayan tenido acceso a la terapia habitual, pero rara vez como tratamiento de primer frente (Estey & Döhner, 2006). Como su nombre indica, estos compuestos están diseñados para atacar una característica concreta de las células cancerígenas, a diferencia de las terapias convencionales que actúan ampliamente y siendo, por ende, menos específicas y más agresivas para las células sanas.

Algunas de las terapias más destacadas a día de hoy:

- Gemtuzumab ozogamicina (Mylotarg): anticuerpo monoclonal ligado a un agente citotóxico derivado de la calicheamicina (antibiótico antitumoral)

(Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, 2019). Este compuesto se dirige a las células que expresan el antígeno de superficie CD33, el cual se halla en la mayoría de las células de LMA y en todas las células mieloides, pero no en células madre hematopoyéticas multipotentes (Ali et al., 2019; Fenton & Perry, 2005; McGavin & Spencer, 2001).

- Ivosidenib (IDH1) y Enasidenib (IDH2): aproximadamente un 20% de pacientes con LMA presentan mutaciones en los genes isocitrato deshidrogenasa (*IDH1* o *IDH2*), las cuales promueven la leucemogénesis debido a un bloqueo en el metabolismo celular (DiNardo et al., 2016). Por su parte, estos fármacos actúan como inhibidores específicos de las mutaciones en *IDH1* o *IDH2*, y su función será la de actuar como agentes diferenciadores (Martelli et al., 2020; Montesinos et al., 2022).
- Gilteritinib: la presencia de *FLT3* con duplicaciones internas en tándem (ITD, *internal tandem duplication*) está asociado con altas tasas de recaídas y un peor pronóstico (Dhillon, 2019). Este fármaco inhibe la actividad de *FLT3* mutado uniéndose al dominio de unión del ATP (Kiyoi et al., 2020).
- Venetoclax: inhibidor de la proteína anti-apoptótica BCL-2 (Guerra et al., 2019). La sobreexpresión de BCL-2 se relaciona directamente con un peor pronóstico. El uso de venetoclax en combinación con quimioterapia puede reestablecer la acción apoptótica de las células cancerígenas (Lasica & Anderson, 2021).

Aunque quizás las terapias dirigidas son las terapias alternativas o complementarias más conocidas, otro tipo de terapias como la inmunoterapia, la encapsulación de fármacos para aumentar su eficacia, el reposicionamiento de fármacos o las terapias centradas específicamente en las células madre leucémicas, están compitiendo en esta carrera llena de obstáculos con el mismo fin de mejorar el tratamiento de la LMA (Estey, 2020; W. Huang et al., 2022; Roloff et al., 2022).

1.2.4. Quimiorresistencia y recaídas

De manera general, se entiende que un paciente alcanza remisión completa (CR, *Complete Remission*) cuando el recuento de blastos leucémicos en médula ósea es inferior al 5% (Burke et al., 2013). A pesar de que la tasa de respuesta a la quimioterapia estándar es bastante alta (Yeung & Radich, 2017), la realidad sigue siendo que casi el 60% de los pacientes que alcanzan CR, sufren recaídas en un promedio de medio año (Ganzel et al., 2018) (**Figura 2**).

La quimiorresistencia es la causa principal de muerte entre los pacientes de LMA (Levin et al., 2021). Ésta puede ser **primaria**, derivada de los propios mecanismos celulares, como la LMA refractaria que designaría a aquellos pacientes (10-40%) que no consiguen llegar a remisión completa tras dos ciclos de quimioterapia (Begna et al., 2022; Thol et al., 2015). Por su parte, la quimiorresistencia **secundaria**, también llamada adquirida, se origina debido a la presión impuesta por la quimioterapia (Mirfakhraie et al., 2022; J. Zhang et al., 2019) que, entre otras cosas, altera el microambiente donde se encuentran las células leucémicas provocando que éstas modifiquen su comportamiento (Shlush & Mitchell, 2015).

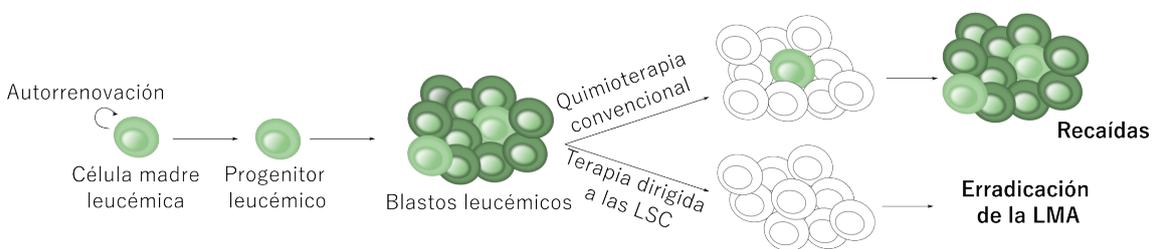


Figura 2. Modelo de adquisición de quimiorresistencia. (Cuesta-Casanovas, 2022).

Existen diversas teorías sobre el origen de las recaídas, hay quienes apuntan que éstas derivan de la selección clonal de un clon preexistente. Este clon podría ser dominante en el primer diagnóstico de LMA o ser uno minoritario que, por eliminación de los dominantes tras la quimioterapia, predomina en la recaída (Ding et al., 2012; Stauber et al., 2021). Además, esta heterogeneidad clonal también se da con anterioridad a la aparición de las LSCs, infiriendo que quizá las recaídas estén más asociadas a clones transformados, derivados de progenitores de HSCs, que a alteraciones genéticas causadas por la quimioterapia. Estos clones habrían sufrido

diferentes procesos de transformación hasta llegar a convertirse en células pre-leucémicas y eventualmente en LSCs, encargadas de generar la enfermedad (Stauber et al., 2021).

Independientemente del origen de la resistencia, la heterogeneidad tumoral intrapaciente es su contribuyente principal. Por tanto, explorar la diversidad de los mecanismos de resistencia es una cuestión a tener en cuenta en un futuro de terapias personalizadas (Saunders et al., 2012).

1.3. Lisosomas

1.3.1. Descubrimiento

Los lisosomas son orgánulos intracelulares descubiertos fortuitamente en 1949 por Christian de Duve cuando trataba de localizar una fosfatasa implicada en diabetes (de Duve, 1949). Al separar por centrifugación extractos celulares derivados del hígado de ratas, descubrieron una especie de estructuras aparentemente envueltas por una membrana, que poseían capacidad enzimática (Bainton, 1981; de Duve, 2005). Su estructura y localización subcelular fue determinada años más tarde por estudios de microscopía (Essner & Novikoff, 1961). Precisamente, estos “sacos” llenos de enzimas serían llamados lisosomas por su capacidad de lisis, y constituirían el sistema digestivo de la célula. Este descubrimiento le fue reconocido con un premio Nobel en Fisiología o Medicina en 1974 (Florkin, 1974).

1.3.2. Estructura y características

Los lisosomas son orgánulos prácticamente ubicuos, dado que se encuentran en todas las células eucariotas (Perera & Zoncu, 2016), exceptuando a los eritrocitos (Saftig, 2006). En plantas y hongos suelen estar limitados a una vacuola de gran tamaño, mientras que, en mamíferos podemos encontrar desde 50 a 1000 por célula (Dice, 2006).

Estructuralmente, estos orgánulos pueden ser muy variados dependiendo de sus funciones o de la cantidad de moléculas que estén procesando (Saftig, 2006). Su tamaño, cantidad y localización variarán adaptándose a las necesidades de la célula, y normalmente, presentan forma redondeada u ovalada en los últimos estadios de la vía endocítica. En general, el tamaño lisosomal ronda entre los 100-500nm (Hämälistö & Jäättelä, 2016) y estará determinado en gran medida por la tasa de reciclaje de membrana, así como, por los procesos de fusión y fisión llevados a cabo por el lisosoma (de Araujo et al., 2020). Pero, además, los lisosomas pueden aumentar de tamaño por diversas causas, como por la acumulación de agentes lisosomotrópicos, es decir, compuestos que atraviesan la membrana lisosomal por

difusión pasiva. Mientras que su localización podrá cambiar respondiendo a variaciones en el pH (Heuser, 1989; Seo et al., 2014), o debido a la presencia de nutrientes en el medio (Korolchuk et al., 2011).

1.3.3. Composición

La envoltura de los lisosomas consiste principalmente en una bicapa fosfolipídica, donde también se pueden encontrar otros lípidos como el colesterol o el dolicol (Winchester, 2001). Respecto a las proteínas de membrana, más de la mitad de ellas son las conocidas como proteínas de membrana asociadas a lisosoma, LAMP1 y LAMP2 (*Lysosomal-Associated Membrane Protein*). Esta familia de proteínas, caracterizadas por su localización transmembrana y por su estado de glicosilación, realizan un papel muy importante en el mantenimiento de la estructura lisosomal. Por estas razones, defectos en ellas resultan en determinadas patologías como la enfermedad de Danon (Eskelinen, 2006; Perera & Zoncu, 2016; Winchester, 2001).

En cuanto a su interior, una de las características más destacables de los lisosomas es su lumen ácido. En él se encuentran más de 60 hidrolasas, como pueden ser: lipasas, fosfatasas ácidas, nucleasas, sulfatasas, glucosidasas o proteasas, que rompen macromoléculas en sus componentes más pequeños (Perera & Zoncu, 2016; Saftig, 2006; H. Xu & Ren, 2015). Conseguir un pH alrededor de 4.5 y 5 es esencial para la correcta activación de las enzimas hidrolíticas, y un desequilibrio de este gradiente también puede llegar a originar enfermedades (Mindell, 2012). La acidificación lisosomal se produce principalmente por la acción de bombas vacuolares de protones que hidrolizan el ATP. Estas bombas provocan un gradiente de protones entre el interior y exterior del orgánulo, facilitando tanto mecanismos de transporte de moléculas, así como la regulación del pH intracelular (Van Dyke, 1996).

1.3.4. Formación

El proceso de formación de estos orgánulos se da a partir de endosomas originados en el aparato de Golgi, que seguirán la vía endocítica para pasar de endosomas tempranos, a tardíos y finalmente, a lisosomas. Durante este recorrido, irán adquiriendo material por endocitosis, acidificándose y cambiando la composición de su membrana (Perera & Zoncu, 2016). Paralelamente, la formación de hidrolasas ocurre en el retículo endoplasmático donde son fosforiladas y posteriormente, reconocidas por el complejo manosa-6-fosfato y recubiertas por clatrina. Una vez encapsuladas, serán liberadas hacia los endosomas tempranos, desde donde pasarán a los tardíos y, finalmente, formarán los lisosomas tras sufrir las transformaciones mencionadas con anterioridad. Estos procesos de biogénesis y degradación de sustancias son altamente energéticos, por lo que además de fabricar de *novoo* lisosomas, también pueden resultar en la degradación y remodelación de lisosomas preexistentes (Luzio et al., 2007; C. Yang & Wang, 2021).

Molecularmente, en la biogénesis de lisosomas encontramos dos actores principales, éstos son mTORC1, responsable del equilibrio entre anabolismo y catabolismo respondiendo a la disponibilidad de nutrientes, y TFEB, factor de transcripción regulador por excelencia de la síntesis de lisosomas. En presencia de nutrientes, mTORC1 permanecerá activo, se trasladará a la membrana lisosomal y fosforilará a TFEB, evitando la transcripción de genes lisosomales y autofágicos. En cambio, en carencia de nutrientes, TFEB entrará al núcleo y estos genes se transcribirán para poder dar lugar a nuevos lisosomas y activar procesos de autofagia. Esta red de expresión y regulación lisosomal recibe el nombre de CLEAR (por sus siglas en inglés, *Coordinated Lysosomal Expression and Regulation*). Mediante estos procesos, se establece un balance entre el número y el tamaño de lisosomas, en función de las condiciones y necesidades celulares (Cao et al., 2021; Saftig, 2006; Sardiello et al., 2009; C. Yang & Wang, 2021).

1.3.5. Función

Partiendo desde el momento de su descubrimiento, la función principal asociada al lisosoma ha sido la del reciclaje y digestión, ya sea de macromoléculas, orgánulos dañados, sustancias dañinas o microorganismos (Inpanathan & Botelho, 2019). Esta función se llevaría a cabo como etapa final de los procesos de endocitosis, fagocitosis y autofagia, que veremos en detalle a continuación (**Figura 3**).

- **Endocitosis**

El primer paso de la vía endocítica consiste en la invaginación de sustancias externas a la célula, mediante la fusión de la membrana plasmática y dichas sustancias. Una vez en el citoplasma, dichas vesículas serán reconocidas por endosomas tempranos que se encargarán de llevar su contenido hasta los lisosomas, creando endolisosomas, para la digestión de sustancias o para la obtención de fuentes de energía (Schneider et al., 1985). Por otro lado, esta vía también puede ser un medio de transferencia de material intracelular, siguiendo el camino desde el retículo endoplasmático hasta el aparato de Golgi y finalmente, llegando a los lisosomas (Inpanathan & Botelho, 2019).

- **Fagocitosis**

En el caso de la fagocitosis, una molécula exterior será reconocida por receptores de membrana y posteriormente, fagocitada. De este tipo de fusión, se obtiene un fagosoma. Entendemos por fagosoma a la estructura resultante de la fagocitosis y que se encuentra en el citoplasma rodeada de membrana. Igual que ocurría en la vía endocítica, el fagosoma se fusionará con endosomas tempranos adquiriendo nuevas propiedades de degradación hasta llegar a convertirse en fagolisosoma, caracterizado por su alta capacidad de hidrólisis (Inpanathan & Botelho, 2019).

- **Autofagia**

A diferencia de los procesos previamente explicados, la autofagia es la digestión de material intracelular dañado o perjudicial para la célula (Inpanathan & Botelho, 2019). La autofagia se puede clasificar en tres procesos: microautofagia, autofagia

mediada por chaperonas y macroautofagia, ésta última es a la que comúnmente nos referimos por autofagia.

La microautofagia se basa en la encapsulación de moléculas pequeñas por parte del lisosoma y su posterior degradación (Mahapatra et al., 2021). Por otro lado, la autofagia mediada por chaperonas consiste en la eliminación de proteínas citosólicas marcadas con una secuencia específica llamada KFERQ (Dice, 2007). No obstante, la macroautofagia es la forma más conocida de autofagia. La estructura resultante en este caso es el autofagosoma, que posee una bicapa doble, procedente de su procesamiento en el retículo endoplasmático (Inpanathan & Botelho, 2019). Para que se dé este proceso, se debe activar un conjunto de proteínas relacionadas con autofagia (ATG) y producirse la disociación de mTORC1 de los lisosomas, con la finalidad de iniciar una cascada de fosforilación de diferentes proteínas como ULK-1 y Beclina-1 (Mahapatra et al., 2021). A continuación, el autofagosoma se fusionará con lisosomas terminales formando el autolisosoma, que a su vez podrá servir como punto de partida de nuevos lisosomas (Inpanathan & Botelho, 2019) o para la digestión de su contenido por las hidrolasas lisosomales (Mahapatra et al., 2021).

Hoy en día, el concepto de lisosoma poco tiene que ver con esa visión simplista de orgánulo digestivo y la lista de funciones atribuidas a lisosomas ha incrementado exponencialmente. Entre ellas, se encontraría el control de la homeostasis, la reparación de membranas, el almacenaje de iones y metabolitos, la capacidad de recibir y procesar respuestas celulares, su papel en proliferación y diferenciación celular o como mecanismo de defensa y efectores de la respuesta inmune (Cao et al., 2021; Inpanathan & Botelho, 2019; Perera & Zoncu, 2016).

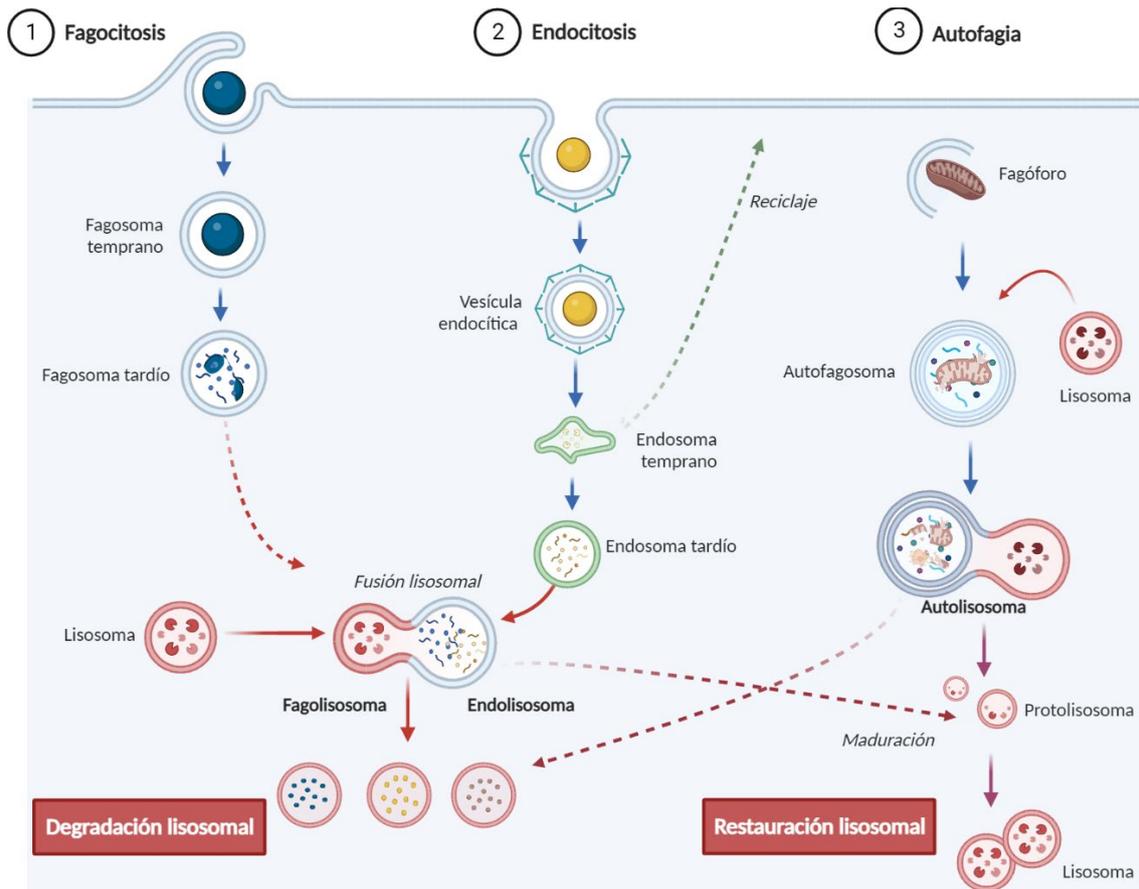


Figura 3. Esquema general de los procesos de endocitosis, fagocitosis y autofagia. Basado en: (Inpanathan & Botelho, 2019; C. Yang & Wang, 2021).

1.3.6. Muerte celular

La definición de muerte celular implica el estado en el que la célula alcanza un punto de no retorno a su estado de homeostasis natural. Debido a la dificultad para definir cuál es realmente ese hecho o momento en el que se inicia, Kroemer et al. establecieron unos estamentos que la célula debe cumplir para indicar que se ha producido muerte celular. Estos puntos serían: la pérdida de la integridad de la membrana celular, la fragmentación celular y nuclear y/o que las diferentes partes de la célula hayan sido engullidas por otra célula (Kroemer et al., 2009).

El proceso de muerte celular puede producirse de forma accidental o programada (X.-M. Hu et al., 2021). En el caso de muerte celular accidental (ACD), no existe la opción de ser regulada ya que ocurre de forma instantánea, como consecuencia de fenómenos mecánicos, físicos o químicos. En cambio, la muerte celular regulada

(RCD) es un proceso que requiere un nivel de complejidad evolutiva superior, por lo que no está presente en los organismos más simples y está modulada por múltiples mecanismos (Galluzzi et al., 2018).

En 2018 se publicó por última vez la guía de clasificación de muerte celular según sus bases moleculares, describiendo 12 tipos diferentes de muerte celular regulada (Galluzzi et al., 2018). A continuación, explicaremos los más relevantes para nuestro proyecto, dado que en la mayoría de ellos se produce una permeabilización de membrana lisosomal y liberación del contenido lisosomal, como parte del proceso de muerte celular (Kavčič et al., 2017).

- **Apoptosis**

Es la forma más conocida de muerte celular, este término fue acuñado en 1972 por Kerr et. al (Kerr et al., 1972). En resumidas cuentas, es una muerte celular programada descrita morfológicamente como la fragmentación de la célula en cuerpos apoptóticos (Mahapatra et al., 2021). Molecularmente, se caracteriza por una gran acción proteolítica liderada por caspasas (Chen et al., 2020).

Existen dos tipos principales de apoptosis, intrínseca, sería aquella detectada por sensores intracelulares (D'Arcy, 2019) y dependiente de permeabilización de membrana mitocondrial (MOMP, *Mitochondrial outer membrane permeabilization*) (Berg et al., 2022) y la extrínseca, producida como consecuencia del reconocimiento de células dañadas por parte de células del sistema inmune (D'Arcy, 2019).

- **Autofagia**

La autofagia no es un proceso exclusivo de transporte intracelular, también es un mecanismo de muerte celular cuando las condiciones de estrés se mantienen a lo largo del tiempo o el daño celular es severo (D'Arcy, 2019). La muerte celular por autofagia se basa principalmente en el mecanismo por el cual una célula muere mediante el uso de la maquinaria de autofagia (Galluzzi et al., 2018). La importancia de los lisosomas en la encapsulación producida durante la autofagia conlleva a que estos procesos se encuentren sumamente relacionados.

Cabe señalar que, para que este proceso sea dependiente de autofagia, el uso de inhibidores de autofagia debe prevenir la muerte celular. De la misma manera, la autofagia puede cursar de forma independiente o en conjunto con otros tipos de muerte celular, especialmente junto con apoptosis (Denton & Kumar, 2019).

- **Muerte celular dependiente de lisosomas**

Con los años se ha descrito que los lisosomas intervienen en diversos tipos de muerte celular, ya sea como principales efectores de la misma, participación activa, o como consecuencia de ella, participación pasiva (Mrschtik & Ryan, 2015), como por ejemplo se ha expuesto en el caso de la encapsulación durante la autofagia o por su acción enzimática en la apoptosis.

En particular, destaca la intervención activa de estos orgánulos en el proceso de muerte celular dependiente de lisosomas (Galluzzi et al., 2018). Dentro de este tipo de muerte celular causada por lisosomas, las catepsinas y la permeabilización de la membrana lisosomal (LMP, *Lysosomal Membrane Permeabilization*) juegan un papel imprescindible (Galluzzi et al., 2018; Mrschtik & Ryan, 2015). La desestabilización de la membrana lisosomal conllevará a una acidificación del citosol, al liberar todo su contenido en él. Este acontecimiento actuará como señal de alarma provocando que la célula active diferentes mecanismos de muerte celular dependiendo de la gravedad de los hechos (Y.-H. Wang et al., 2018). Por ejemplo, ante una gran concentración de material lisosomal en el citoplasma, como podría ser de esfingosina, se producirá necrosis (Mrschtik & Ryan, 2015). En cambio, cuando la liberación de catepsinas sea más controlada, la muerte celular activada será la apoptosis (Berg et al., 2022).

Los desencadenantes de este tipo de muerte pueden ser diversos, en la mayoría de las ocasiones el daño oxidativo producido por especies reactivas del oxígeno (ROS) será uno de ellos, pero agentes lisosomotrópicos o incluso infecciones víricas pueden llegar a originarla (Galluzzi et al., 2018). Dentro de las consecuencias, además de la acidificación y acción hidrolítica en el citoplasma (Serrano-Puebla & Boya, 2018), las mitocondrias se verán afectadas, principalmente por la ausencia de

lisosomas como mecanismo de reciclaje y de renovación de orgánulos (Galluzzi et al., 2018). Asimismo, la permeabilización de la membrana mitocondrial puede estar presente en este fenómeno de muerte celular, ya sea precediendo a LMP en apoptosis, o tras ella (Berg et al., 2022).

Puesto que los lisosomas son el punto final de diversas vías de degradación, no sorprende que estén implicados en otros tipos de muerte celular como la piroptosis, relacionada con procesos inflamatorios (Berg et al., 2022), la ferroptosis, causada por ROS y asociada a la disponibilidad de hierro o incluso a la entosis, una especie de muerte celular en la que una célula es absorbida por otra no fagocítica (F. Wang et al., 2018).

1.3.7. Lisosomas y cáncer

Como hemos ido comentando a lo largo de estas páginas, alteraciones en los lisosomas a diferentes niveles pueden ocasionar desajustes que en ciertos casos acontecen como enfermedades. Desde la identificación de lisosomas, y a pesar de ser poco frecuentes si se consideran por tipos, las enfermedades de almacenamiento lisosómico (*LSDs*, *Lysosomal Storage Disorders*) han estado presentes. Estas enfermedades están causadas por mutaciones en genes *LSDs*, que producen un mal funcionamiento enzimático y una acumulación de sustancias en el lumen lisosomal, impidiendo su correcto funcionamiento. Muchos de estos desórdenes, cursan con defectos neurodegenerativos, como en el caso del Alzheimer o la enfermedad de Huntington (Platt et al., 2018).

Sin embargo, a medida que se han ido conociendo en detalle las funciones de los lisosomas, se han ido asociando los mismos a muy diversas enfermedades, en particular y dado nuestro campo de estudio, nos centraremos en la relación entre lisosomas y cáncer. En primer lugar, exploraremos los cambios que dichos orgánulos sufren en el contexto del cáncer, y posteriormente, caracterizaremos el rol ejercido por los lisosomas durante la adquisición de ciertas capacidades propias de

las células cancerígenas, como podrían ser la proliferación, la invasión tumoral, el escape inmunológico o la angiogénesis.

- **Cambios morfológicos**

Si bien es cierto que los lisosomas participan en múltiples procesos pro-oncogénicos, también es importante recalcar los cambios que sufren estos orgánulos como consecuencia de la alta tasa metabólica derivada de los mismos. Algunas de las transformaciones que se han observado en células tumorales comprenden un aumento en el número y volumen lisosomal, así como, un aumento de la secreción de enzimas lisosomales (Hämälistö & Jäättelä, 2016; Kirkegaard & Jäättelä, 2009; Paunovic et al., 2021; T. Tang et al., 2020) y cambios en su posición intracelular, pasando de la zona perinuclear a la zona periférica de la célula para ejercer funciones de invasión, entre otras (Hämälistö & Jäättelä, 2016; T. Tang et al., 2020).

Estos cambios fisiológicos y morfológicos confieren a las células tumorales ventajas en términos de invasión, angiogénesis o resistencia a fármacos (Iulianna et al., 2022), pero a su vez, conducen a una desestabilización de la membrana lisosomal, haciendo más vulnerables a estos orgánulos respecto a los encontrados en células sanas (Fehrenbacher et al., 2008; Hämälistö & Jäättelä, 2016; Kirkegaard & Jäättelä, 2009).

- **Hiperactivación del metabolismo y aumento de autofagia**

Los cambios producidos en los lisosomas durante los procesos cancerígenos responden a la necesidad, por parte de las células cancerígenas, de una fuente continua de nutrientes. La alta demanda energética necesaria para la supervivencia de las células cancerígenas y, por tanto, para la progresión de la enfermedad, conlleva a la activación de mecanismos diferentes a los de las células sanas con el fin de obtener un extra de energía, un ejemplo de ello es un incremento en la fosforilación oxidativa (Nepstad et al., 2020).

Estudiando el metaboloma desde diferentes aproximaciones, y tras el aislamiento de los orgánulos que forman parte de los procesos metabólicos, se ha comprobado que es necesaria una hiperactivación del metabolismo, para sostener los requerimientos de crecimiento y proliferación de las células tumorales (Ruiz-Rodado et al., 2022;

Zhu et al., 2021). Los lisosomas estarían implicados en esta regulación del metabolismo, aumentando el reciclaje de macromoléculas para obtener aminoácidos esenciales (Ruiz-Rodado et al., 2022; T. Tang et al., 2020). Junto con este proceso de hidrólisis de macromoléculas, la captura de sustratos extracelulares por las vías de fagocitosis, endocitosis y macropinocitosis, y la activación de la autofagia en respuesta a estímulos nutritivos detectados por mTORC1, las células tumorales obtienen la energía requerida para su crecimiento incontrolado (T. Tang et al., 2020).

- **Proliferación**

El potencial de proliferación de las células cancerígenas les concede un gran beneficio respecto a las células sanas, cuyo potencial de dividirse es mucho más limitado debido a su alta regulación. Numerosos procesos relacionados con lisosomas pueden estar implicados con esta elevada proliferación.

En primer lugar, la entrada en senescencia puede actuar como efecto anti-proliferativo en las células cancerígenas (Ivanov et al., 2013). Este fenómeno, inducido en algunos casos por oncogenes, podría incrementar la expresión genética lisosomal, así como la cantidad y el volumen de los mismos (T. Tang et al., 2020). Sin embargo, también puede conducir a muerte celular dependiente de lisosomas (Ivanov et al., 2013). Es por ello, que las células tumorales tratan de evitar los mecanismos de senescencia para lograr mantener una alta tasa de proliferación (T. Tang et al., 2020).

Asimismo, dado que la función de mTOR es esencial en el proceso de crecimiento celular y proliferación (Cargnello et al., 2015), defectos su vía de señalización pueden afectar esta función. Principalmente, la formación de complejos mTOR es clave para su correcto funcionamiento, y para ello se requiere la participación de los lisosomas (Sironi et al., 2019).

Por último, la autofagia está íntimamente relacionada con los procesos de proliferación y la supervivencia tumoral. Estudios como el llevado a cabo por Lin et al. en cáncer de vejiga demuestran que, inhibiendo la autofagia farmacológica o genéticamente, las células cancerígenas presentan un mayor nivel de apoptosis y, por

tanto, un descenso en su proliferación (Lin et al., 2016). Asimismo, la deficiencia de ciertas proteínas autofágicas, como Atg7, reducirían el inicio y desarrollo de ciertos tumores como el colorrectal (T. Tang et al., 2020).

- **Invasión tumoral**

Otra de las cualidades que caracterizan a las células cancerígenas, es su capacidad de migración e invasión de otros tejidos. Para cumplir este objetivo, estas células malignas tendrán que desengancharse de sus células vecinas con las que forman la masa tumoral, en tumores sólidos, para poder pasar a la sangre o alcanzar otros tejidos (Allison, 1974).

Esta función está mediada en gran parte por enzimas lisosomales como las hidrolasas, para la separación de sus células adyacentes, o las catepsinas, las cuales poseen la capacidad de romper tejido conectivo y membranas una vez han colonizado un nuevo tejido (Allison, 1974). Para la degradación de la matriz extracelular, la acción enzimática ocurrirá de forma interna (intracelular) y externa (extracelular), e irá acompañada de fenómenos de exocitosis para la internalización de materiales.

Obviamente, cada uno de estos procesos no son hechos aislados, más bien son procesos interconectados y dependientes unos de otros. Es por ello que la complejidad subyacente es mayor de lo relatada aquí, ejemplificando, un ambiente ácido será necesario para que las enzimas funcionen, y muchos de los procesos de degradación conllevarán un aumento en la liberación de nutrientes, activando la acción de mTORC1 (Hämälistö & Jäättelä, 2016).

- **Escape inmunológico**

Hoy en día sabemos que los lisosomas también intervienen en la regulación de la respuesta inmune, especialmente, se les atribuye un papel clave en la presentación de antígenos. Fallos en la autofagia producen una acumulación de p62 y la consiguiente liberación de ROS, generando un ambiente oxidativo que impide la activación de la respuesta inmune (Davidson & Vander Heiden, 2017). Es por ello que, la inhibición de la autofagia podría provocar un aumento de la presentación antigénica y de la

respuesta antitumoral de células T, provocando un decrecimiento tumoral como en el caso del cáncer de páncreas (Yamamoto et al., 2020).

Por otro lado, muchos otros factores lisosomales intervienen en la respuesta inmune en cáncer. Por ejemplo, los lisosomas pueden transportar, almacenar y degradar moléculas implicadas en el control del sistema inmune (*immune checkpoints*) como CTLA-4. Mientras que, los lisosomas secretorios pueden conducir granzimas y perforinas a células diana tumorales o a aquellas infectadas por virus (Davidson & Vander Heiden, 2017; T. Tang et al., 2020), los canales de calcio TRPML pueden liberar citoquinas para activar a macrófagos asociados a tumores (T. Tang et al., 2020).

- **Angiogénesis tumoral**

La gran irrigación sanguínea, es uno de los mecanismos por el cual los tumores mantienen un crecimiento ilimitado. Este aumento de la vasculatura les permite una vez más, cumplir con sus altos requerimientos nutricionales y de oxígeno. Un tipo de catepsinas llamadas cisteínas, son las responsables de iniciar cascadas intracelulares que incrementan la progresión del tumor, incluido el proceso de angiogénesis (Kirkegaard & Jäättelä, 2009).

La participación de los lisosomas en este proceso se pone de manifiesto tratando con cloroquina, agente lisosomotrópico que se acumula en los lisosomas y produce un aumento de pH, interrumpiendo su correcto funcionamiento. Este tratamiento conduciría a una reducción del número de vasos sanguíneos y a una mayor estabilidad de los mismos (Schaaf et al., 2019).

1.3.8. Lisosomas y neoplasias hematológicas

Hace tan solo 10 años, el uso de compuestos antileucémicos cuyo mecanismo de acción principal implicara disrupción lisosomal era un terreno sin explorar. En cambio, estudios como el de Sukhai et al. proporcionaron un nuevo paradigma respecto a las aproximaciones terapéuticas contra la leucemia. Concretamente se

centraron en LMA, donde observaron que el antimalárico mefloquina atacaba específicamente a los lisosomas de las células cancerígenas, sin afectación de las sanas. Además, aunque no detectaron un aumento en el número de lisosomas, sí que confirmaron un incremento del tamaño lisosomal en las células de LMA, junto con una sobreexpresión relacionada con genes de síntesis de lisosomas y de sus catepsinas (Sukhai et al., 2013). Por otro lado, la cloroquina, de la misma familia que la mefloquina, ha sido probada en ensayos clínicos frente a la LMA y otros tumores, aunque sin el resultado positivo esperado (Grønningsæter et al., 2021; Varisli et al., 2020).

La íntima relación entre los lisosomas y mTORC1, así como, su papel de degradación de moléculas mediante autofagia, les confiere un papel central como moduladores de la hematopoyesis, la cual requiere de grandes cantidades de energía y de complejos procesos de transformación celular. Un aumento de tamaño lisosomal en HSCs senescentes, así como una hiperactivación de la autofagia, podrían asegurar una correcta división celular de las HSCs y un correcto funcionamiento metabólico en condiciones de estrés (Rafiq et al., 2021).

Asimismo, el buen funcionamiento de las vías de señalización intracelular está comprometido por la acidificación del medio, y de este mantenimiento se encargan las bombas de protones V-ATPasas, presentes en la membrana lisosomal (Aasebø et al., 2018). Una de las vías de señalización activa en más del 50% de los pacientes de LMA es la vía de PI3K-Akt-mTOR, en la cual FLT3, con alta tasa de mutación en pacientes de LMA, es el principal responsable de su desestabilización. Aunque la regulación de esta vía metabólica es un proceso multifactorial y complejo, vinculado con otras vías como la de las MAP quinasas, MAPK (Ras-Raf-MEK-Erk) (Nepstad et al., 2020), cabe destacar el compartimento lisosomal como lugar de activación de mTORC1 por PI3K (Dibble & Cantley, 2015).

La participación de los lisosomas en la leucemogénesis y su papel determinante del destino celular en HSC (Rafiq et al., 2021), junto con su función en el correcto funcionamiento de ciertas vías moleculares (Dibble & Cantley, 2015), hace que su

estudio sea relevante como posible diana terapéutica en LMA. Dada la inestabilidad lisosomal, se produce un aumento en la vulnerabilidad de la célula que puede ser aprovechada atacando a estos orgánulos (Jain et al., 2022; Rafiq et al., 2021).

1.3.8.1. Quimiorresistencia y lisosomas

A pesar de los esfuerzos por mejorar los tratamientos de la LMA, la investigación de terapias frente a células quimiorresistentes todavía no ha sido fructífera y muchos de los pacientes siguen muriendo como consecuencia de dicha resistencia. La relación entre la quimiorresistencia y los lisosomas, deriva principalmente de la acumulación de los compuestos quimioterapéuticos en ellos (Jain et al., 2022; Rafiq et al., 2021), pero, además, su papel en la señalización intracelular y en la regulación de la expresión genética son elementos clave en la resistencia a fármacos (Cuesta-Casanovas et al., 2022).

El secuestro de estos compuestos por parte del lisosoma dificultará la acción de los compuestos citotóxicos, previniendo que puedan alcanzar sus dianas de acción y reduciendo su eficacia (Zhitomirsky & Assaraf, 2016). Fisiológicamente, este aumento de la concentración del fármaco cursará con un incremento del tamaño lisosomal, así como, de la actividad degradativa llevada a cabo por enzimas lisosomales (Allison, 1974), haciendo necesarias mayores dosis del tratamiento para producir efecto, y con el subsecuente aumento de efectos secundarios (Cuesta-Casanovas et al., 2022).

Por sus propiedades físico-químicas, algunos compuestos pueden atravesar las bicapas lipídicas por difusión pasiva. Además, gracias al proceso de *ion-trapping*, se puede producir una acumulación de moléculas en este compartimento subcelular debido a las diferencias de pH entre el interior y exterior lisosomal que afecta a la ionización de los compuestos en base a su pKa, evitando así que las moléculas atrapadas salgan por difusión pasiva (Halaby, 2019; Hraběta et al., 2020). Esto ocurre en moléculas catiónicas-anfifílicas (CADs) como algunos antihistamínicos, que atraviesan la membrana lisosomal sin el requerimiento de un reconocimiento molecular activo (Cornet-Masana et al., 2019). Otros tipos de difusión pasiva se da

en los compuestos lipofílicos como las antraciclinas, los cuales penetran fácilmente en orgánulos con membranas lipídicas (Cuesta-Casanovas et al., 2022). Por el contrario, muchas moléculas pueden acceder a los lisosomas por difusión activa mediante transportadores de membrana, como los transportadores ABC (transportadores dependientes de ATP), que permiten la introducción de agentes quimioterapéuticos como la daunorrubicina (Halaby, 2019; Hraběta et al., 2020; Zhitomirsky & Assaraf, 2016).

Otro de los mecanismos asociados a lisosomas que contribuyen a la quimiorresistencia sería la exocitosis. Este proceso, dependiente de Ca^{2+} y regulado por TFEB, produce la salida de los compuestos acumulados en los lisosomas al espacio extracelular mediante fusión de los lisosomas con la membrana plasmática (Hraběta et al., 2020; Zhitomirsky & Assaraf, 2017).

En LMA, la resistencia a citarabina es uno de los mayores obstáculos a los que los clínicos se enfrentan, dado que es el fármaco por excelencia. Este agente anticancerígeno penetra en las células por difusión pasiva o a través de transportadores de membrana, donde se irá transformando de AraC monofosfato a trifosfato, por eventos de fosforilación mediados por diferentes enzimas. La forma activa de AraC se insertará en el ADN y bloqueará su replicación haciendo que la célula entre en apoptosis. En este proceso, jugarán un papel relevante la cantidad de enzimas y la sobre- o inactivación de los transportadores de entrada y salida, modulando minuciosamente la acción final del fármaco (Fajardo-Orduña et al., 2021) (**Figura 4**). Una de las soluciones más recurrentes frente a la resistencia a los fármacos, y en concreto a AraC, es la terapia combinada de AraC con algún otro agente que alargue su efecto y evite lo posible la resistencia (Cros et al., 2004; Fajardo-Orduña et al., 2021).

Reuniendo todos los procesos comentados en los apartados anteriores, podríamos establecer una lista de posibles dianas farmacológicas contra la leucemia basadas en lisosomas: desencadenar la desintegración completa lisosomal atacando su membrana mediante CADs (Zhu et al., 2021), usar inhibidores de las vías de

señalización (Nepstad et al., 2020), inhibir las catepsinas, bloquear la bomba V-ATPasa (Jain et al., 2022), el transporte de lisosomas o de moléculas intracelulares (Kirkegaard & Jäättelä, 2009), podrían contribuir a la muerte de las células cancerígenas. Mientras que, acciones que atenten contra la introducción de moléculas en los lisosomas, o contra el proceso de exocitosis, podrían ayudar a evitar las recaídas por resistencia a fármacos (Cuesta-Casanovas et al., 2022).

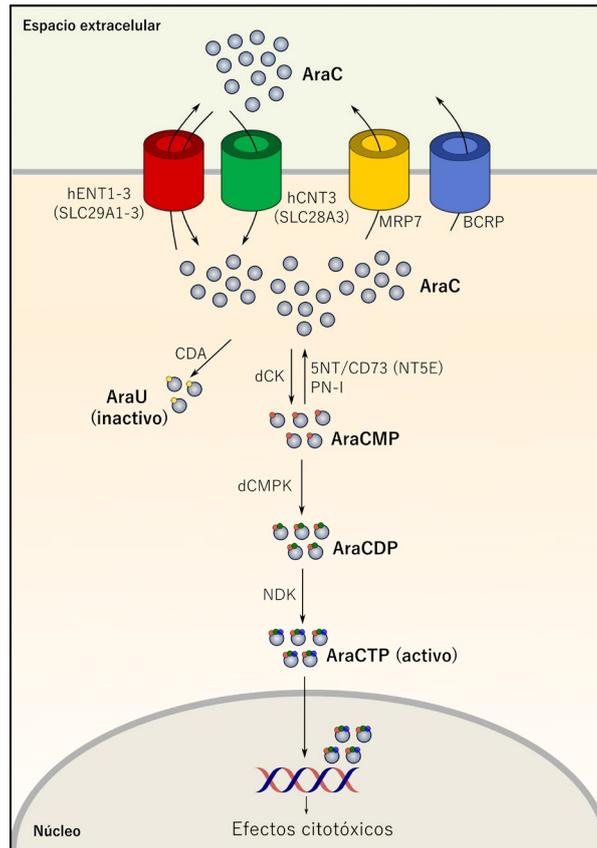


Figura 4. Esquema general de la ruta intracelular de la citarabina y de su activación. Basado en (Cuesta-Casanovas, 2022).

1.4. LPTM4B

Dentro de las proteínas lisosomales más notorias por su cantidad y conocimiento acerca de ellas, encontramos las proteínas LAMP (proteínas asociadas a membrana lisosomal) y LIMP (proteínas integrales de membrana lisosomal) (R. J. Milkereit, 2014). Sin embargo, lo que realmente nos atañe en este trabajo es la familia de proteínas transmembrana asociadas a lisosoma LPTM (por sus siglas en inglés, *Lysosome Associated Protein Transmembrane*). Este conjunto de proteínas se encuentra altamente conservado, sobre todo en las secuencias responsables de las regiones de la hélice- α y el C-terminal (R. Milkereit & Rotin, 2011), y comprende dos tipos diferentes de proteínas, denominadas LPTM4 (A y B) y LPTM5, según el número de dominios transmembrana que presenten (Ndiaye et al., 2015).

Mientras que LPTM5 sería un regulador negativo de la expresión en superficie de receptores para células B y T, y se encuentra regulado a la baja en mieloma múltiple y neuroblastoma, LPTM4A está relacionado con resistencia a fármacos (R. J. Milkereit, 2014; R. Milkereit & Rotin, 2011).

Concretamente, en esta tesis nos centraremos en descifrar el papel de LPTM4B, también conocido como LC27.

1.4.1. Estructura e isoformas

Gracias a la clonación de *LPTM4B*, hoy en día tenemos información de cómo es su secuencia y de qué elementos lo conforman. *LPTM4B* se localiza en el brazo largo del cromosoma 8 (8q22.1) y abarca unas 50kb, entre las que encontramos 7 exones y 6 intrones (X. R. Liu et al., 2004; Shao et al., 2003).

Continuando su estudio a través del dogma de la biología molecular, el siguiente nivel sería el ARNm. En base a diferentes codones de inicio, los transcritos descritos para *LPTM4B* convencionalmente serían tres, dos asociados a la isoforma 1 o larga y uno asociado a la isoforma 2 o corta (LPTM4B ENSG00000104341

Ensembl). Además, se ha descrito otro transcrito de menor tamaño, aunque la información disponible es muy limitada (Huygens et al., 2015).

En el último escalón de complejidad tenemos a la proteína LAPTM4B, compuesta por 4 regiones transmembrana altamente hidrofóbicas, dos dominios extracelulares en forma de bucle y las dos colas amino y carboxilo (N y C) terminales (X. R. Liu et al., 2004; Shao et al., 2003). Asimismo, LAPTM4B presenta 8 regiones de fosforilación, algunas para proteínas quinasas dependientes de AMPc/GMPc, otras para proteínas quinasas C y un sitio de fosforilación de residuos tirosina en el C-terminal (X. R. Liu et al., 2004; Shao et al., 2003). Tanto el C como el N-terminal presentan un motivo rico en prolina (PXXP) (Shao et al., 2003) y todas las isoformas presentan dominios PY (aa: 295-298, 311-314), a los que se podrá unir la proteína ubiquitinadora Nedd4 (K. Zhou et al., 2020).

Aunque en términos generales la proteína LAPTM4B cumple la descripción dada anteriormente, la realidad es que tras el proceso de transducción se han descrito dos proteínas diferentes, la isoforma larga (LAPTM4-35) y la corta (LAPTM4-24) (**Figura 5**). Las diferencias estructurales entre ambas, las conducirá a realizar diferentes funciones y a estar localizadas en diferentes estructuras celulares como veremos a continuación.

1.4.1.1. Isoforma larga

La isoforma larga corresponde al transcrito codificante de la proteína LAPTM4B de 35 kDa (317 aa)(X. R. Liu et al., 2004). Particularmente, la N-terminal de esta isoforma es una región rica en prolina que se caracteriza por su carácter hidrofóbico (Shao et al., 2003), con una zona de unión a dominios SH3 (aa 12-15) que podrían interactuar con la subunidad p85 α de PI3K, y con un dominio rico en arginina (aa 52-67).

1.4.1.2. Isoforma corta

En el caso de la isoforma corta, nos estamos refiriendo a aquella que tras la transducción genera una proteína de 24 kDa (226 aa) (X. R. Liu et al., 2004). La mayor diferencia de esta proteína respecto a la larga se halla en la ausencia de gran

parte del N-terminal, en concreto, 91 aminoácidos (Shao et al., 2003) correspondiendo con una secuencia rica en prolina (PPRP) (Y. Meng et al., 2016). Además, esta proteína presenta una tasa de renovación muy elevada, llevada a cabo por lisosomas y por el proteasoma, posiblemente debida a mecanismos post-transduccionales. A diferencia de LAPTM4B-35, parece que esta isoforma es esencial para el desarrollo, ya que su silenciamiento causa letalidad temprana en ratones (K. Zhou et al., 2020).

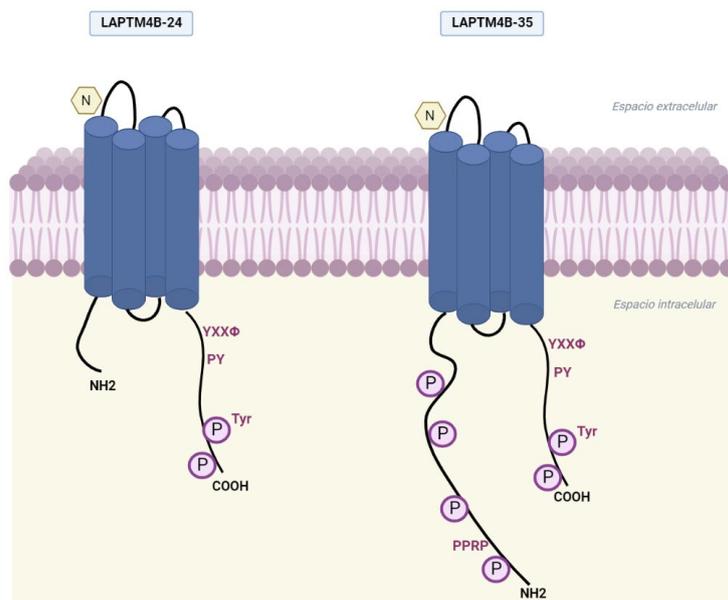


Figura 5. Estructura de las diferentes isoformas de LAPTM4B y su disposición en la membrana. Basado en (Y. Meng et al., 2016).

1.4.2. Localización intracelular

Como se ha mencionado en la introducción de este trabajo, LAPTM4B es una proteína integral de membrana que posee cuatro dominios transmembrana (117–133, 163–179, 200–216 y 243–259) (Ndiaye et al., 2015), y cuyos dos extremos terminales se encuentran en el citoplasma (Y. Meng et al., 2016). LAPTM4B se localiza tanto en membranas celulares o de ciertos orgánulos, como de forma soluble (R. L. Zhou et al., 2015).

En primer lugar, Ruth Milkereit y su equipo demostraron que LAPTM4B es el único miembro de esta familia que se puede encontrar en membrana celular y en protuberancias asociadas a ella, y que además, la localización intracelular de LAPTM4B estará mediada, en parte, por Nedd4 como consecuencia de su interacción con los dominios PY (R. Milkereit & Rotin, 2011).

Asimismo, en su C-terminal presenta motivos que sirven como secuencias de localización lisosomal o hacia las vías de transporte intracelular desde el aparato del Golgi hasta los lisosomas (Y. Meng et al., 2016; R. Milkereit & Rotin, 2011; Ndiaye et al., 2015). Por ello, no es de extrañar que en la mayoría de trabajos se detecte LAPTM4B en endosomas tardíos y en lisosomas (Vergarajauregui et al., 2011). Aunque también se ha descrito, con menor frecuencia, en endosomas tempranos (X. Tan et al., 2015), y debido a sus funciones en la homeostasis de los esfingolípidos, se sugiere su localización en el aparato de Golgi (Dichlberger et al., 2021).

A pesar del conocimiento limitado acerca de ambas isoformas por separado, el estudio más detallado de ambas hasta la fecha, pone de manifiesto que la isoforma larga posee una mayor capacidad de migración respecto a la isoforma corta, y por ello, aparece tanto en estructuras endocíticas, como en membrana plasmática. En cambio, en el caso de la corta, su localización parece estar relegada exclusivamente a los orgánulos de la vía endocítica posiblemente a causa de sus diferencias estructurales (K. Zhou et al., 2020).

1.4.3. Expresión

Una alta expresión de LAPTM4B es común en muchos tejidos adultos sanos, destacando el útero, el corazón, los testículos o el músculo esquelético, así como, en etapas fetales en hígado o corazón (Kasper et al., 2005; X. R. Liu et al., 2004).

Específicamente, la expresión de LAPTM4B se correlaciona **negativamente con el estado de maduración celular** (Rapin et al., 2014), es decir, en procesos tumorales se encuentra más expresado en aquellas células menos diferenciadas, como ocurre

en el caso del hepatocarcinoma o en cáncer de vesícula biliar (Y. Meng et al., 2016; Shao et al., 2003). Por ende, resulta interesante destacar la conexión entre LAPTM4B y su **regulación positiva** tanto en **células madre** sanas, embriónicas (Abeyta et al., 2004), neuronales y hematopoyéticas (Ivanova et al., 2002; Jaatinen et al., 2006), así como, en **leucémicas** (Ng et al., 2016). Prestando atención a las células madre leucémicas, LAPTM4B forma parte de un conjunto de 17 genes definido por su alto valor pronóstico en LMA y asociado con una respuesta disminuida frente a tratamientos convencionales, alta tasa de recaídas (Ng et al., 2016) o mayor incidencia de mutaciones FLT3-ITD, predichas como desfavorables (Bullinger et al., 2008; L. Huang et al., 2012; Ng et al., 2016).

El papel de LAPTM4B como marcador de mal pronóstico también se pone de manifiesto en otros casos. Por ejemplo, LAPTM4B está presente en una de las principales firmas génicas asociadas a **baja supervivencia** en LMA (Metzeler et al., 2008) y en síndromes mielodisplásicos (Y.-H. Wang et al., 2018). No obstante, LAPTM4B *per se* se ha considerado un factor pronóstico independiente en diversos tipos tumorales como en cáncer de pulmón (H. Tang et al., 2014), cáncer gástrico (H. Zhang et al., 2014), cáncer de ovario (Y. Yang et al., 2008), cáncer de mama (M. Xiao et al., 2013) o cáncer de endometrio (F. Meng, Yin, et al., 2010).

Su alta expresión también es notoria en **recaídas** de leucemia linfoblástica aguda pediátrica (Chow et al., 2017; Hogan et al., 2011). Como sabemos, una de las principales causas de las recaídas es la quimiorresistencia y en línea con lo anterior, se ha asociado un incremento de expresión del gen con una **mayor resistencia a fármacos** (Y. Li et al., 2010; Y. Meng et al., 2016; Rehman et al., 2019; M. Yin et al., 2011). Inversamente, algunos estudios afirman que una baja expresión también estaría asociada con el mismo efecto (Blom et al., 2015).

Finalmente, un amplio estudio exploratorio de genes asociados a autofagia detectó que LAPTM4B se encontraba tanto sobreexpresado a nivel de ARNm, como regulado a la baja en ciertos casos (Lebovitz et al., 2015).

Dichas discrepancias observadas en la expresión de LAPTM4B en el contexto de quimiorresistencia podrían estar asociadas a un tamaño poblacional bajo o a los diferentes modos de acción de los tratamientos anticáncer empleados en cada estudio (de Ronde et al., 2013). Mientras que, en el caso de la autofagia, la menor expresión de LAPTM4B en tumor frente a controles podría ser debida a ciertas alteraciones clínicas o a efectos tumor-específicos (Lebovitz et al., 2015). Aunque en líneas generales parece que una mayor expresión de LAPTM4B se correlaciona con un peor pronóstico, todavía quedan muchas incógnitas por explorar en la relación entre la expresión de LAPTM4B y diversos eventos anómalos.

1.4.4. Función

El conocimiento acerca de la función de LAPTM4B es todavía limitado, este problema deriva en muchos casos de la falta de estudios funcionales y caracterización de las dos isoformas por separado. Uno de los factores limitantes, ha sido la ausencia, en el pasado, de anticuerpos específicos frente cada isoforma. Es por ello que, en muchas de las publicaciones se habla indistintamente de este gen o proteína a nivel general, y comúnmente se sobreexpresa o silencia la expresión de una de las isoformas (K. Zhou et al., 2020), contribuyendo a que el aumento del conocimiento sea unidireccional y a que, globalmente escasee la información para definir en detalle las funciones específicas de cada isoforma.

A pesar de ello, desde su descubrimiento se le han ido atribuyendo diversas funciones, sobre todo, asociadas a procesos cancerígenos. En los siguientes apartados realizaremos un recorrido por los entresijos de la funcionalidad asociada a esta proteína.

- **Estabilidad de membranas**

El mantenimiento de la membrana lisosomal es esencial para el correcto funcionamiento de la célula. Una disminución en la expresión de LAPTM4B, se ha correlacionado con un aumento de la permeabilización de la membrana lisosomal, que a su vez conduce a un aumento del pH lisosomal, a una mayor liberación de

catepsinas B y D y, en definitiva, a muerte celular dependiente de lisosomas (Y. Li et al., 2011).

Por otro lado, resulta evidente el papel regulador que ejerce LAPTM4B sobre la cantidad de ciertos lípidos en los endosomas. En el caso de la ceramida, su biogénesis ocurre en los endosomas tardíos por el catabolismo del esfingolípido llamado esfingomielina. Posteriormente, la ceramida puede dar lugar a un ácido graso y una esfingosina. Esta última, podrá transformarse en ceramida en el retículo endoplasmático y pasar de nuevo a formar esfingomielina en el aparato de Golgi (Blom et al., 2015). La función de LAPTM4B en este proceso sería la de unirse a la ceramida, facilitar su salida de los endosomas tardíos (Yuyama et al., 2020) y finalmente, regular el contenido de esfingomielina, con la supeditada afectación de la membrana endosomal e incluso la desregulación de la apoptosis (Blom et al., 2015). Dentro de este marco, LAPTM4B también influye en la regulación de esfingolípidos y lípidos éter asociados a vesículas extracelulares pequeñas. Lo más novedoso de este trabajo, además de reafirmar el papel de LAPTM4B en la regulación de la composición lipídica, consiste en añadir a nuestra proteína de interés el rol de mantener el orden en las membranas de estas vesículas (Dichlberger et al., 2021).

- **Metabolismo celular y señalización nutricional**

Nuevamente, no podemos hablar de metabolismo sin mencionar a mTORC1. Este complejo proteico es un importante regulador del crecimiento celular y animal, y se ha asociado tanto con múltiples procesos fundamentales, como sensor nutritivo (V. P. Tan & Miyamoto, 2016), mediador de la transducción proteica o supresor de la autofagia, así como, en diversos tipos de enfermedades (R. Milkereit et al., 2015).

Uno de los puntos de interés en la relación entre LAPTM4B con mTORC1, se encuentra en el interior del tercer dominio transmembrana (aa 208-216) de LAPTM4B, donde se halla un motivo esfingolípido importante para la señalización de mTORC1. Diversas evidencias indican la capacidad de ambas isoformas de LAPTM4B para fosforilar a mTORC1 e interactuar con moléculas transportadoras de aminoácidos (K. Zhou et al., 2020).

Además, LAPTM4B participa en la entrada al lisosoma de aminoácidos esenciales. Concretamente, el mecanismo mediante el cual el aminoácido leucina (Leu) entra en los lisosomas, parece estar regulado por la interacción entre LAPTM4B-24 y el transportador LAT1-4F2hc. LAT1-4F2hc se encontraría en la membrana plasmática, intercambiando la entrada de Leu, con la salida de otros aminoácidos no esenciales. Para conseguir una activación de mTORC1, la leucina debe llegar a los lisosomas y la translocación del transportador hasta los lisosomas por parte de LAPTM4B, es el proceso que lo permite. Una vez se encuentren físicamente todos estos integrantes en los lisosomas, LAPTM4B podrá activar a mTORC1 mediante la V-ATPasa (R. Milkereit et al., 2015).

Estos datos ponen de manifiesto el papel de LAPTM4B como regulador de la disponibilidad de nutrientes (K. Zhou et al., 2020).

- **Regulación negativa del catabolismo de proteínas**

Adicionalmente, Tan et al. demostraron la intervención de LAPTM4B en el tráfico del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). LAPTM4B es uno de los efectores del lípido PtdIns(4,5)P₂, que aumentaría la señalización de EGFR potenciando la ubiquitinación por Nedd4 de Hrs, subunidad del complejo ESCRT. Este proceso impide la salida del complejo EGF-EGFR de las vesículas que se encuentran en el lumen de los endosomas, inhibiendo el proceso de degradación del mismo en los lisosomas. La degradación de este complejo, resulta indispensable para que EGFR pueda desarrollar su función de señalización, relevante para muchos procesos fisiológicos y asociada a numerosos estados patológicos como el cáncer (X. Tan et al., 2015).

- **Papel en el sistema inmune**

En el año 2015 se describió por primera vez la implicación de LAPTM4B en el sistema inmune. Aunque no se ha podido confirmar por la falta de anticuerpos específicos frente a todas las isoformas, se cree que LAPTM4B-24 y LAPTM4B-20 (no descrita hasta la fecha), actuarían como regulador negativo de la producción de TGF- β 1 (por sus siglas en inglés, *Tumor Growth Factor*) en las células T reguladoras.

La formación del TGF- β 1 se da en linfocitos T reguladores, un tipo de células T CD4⁺, y para su formación y activación se requieren moléculas como GARP (proteína retrógrada asociada a Golgi). GARP es el principal regulador de la producción de TGF- β 1, LAPTM4B se une a esta glicoproteína, impidiendo la maduración de TGF- β 1 desde su estado precursor, su secreción y finalmente, su presentación en la superficie celular (Huygens et al., 2015).

- **Fomento de la autofagia**

LAPTM4B es el primer gen descrito con un rol esencial en la maduración del autofagosoma y en los últimos eventos de la autofagia (Y. Li et al., 2011; Vergarajauregui et al., 2011). Esta capacidad la veremos en detalle en el caso del cáncer, explicada en el próximo apartado.

Finalmente, además de los defectos en la autofagia, la sobreexpresión de LAPTM4B, se asocia con un incremento del tamaño lisosomal y de los endosomas tardíos, y con acumulación de proteínas ubiquitinadas (Vergarajauregui et al., 2011). Por tales motivos, alteraciones en LAPTM4B podrían participar en la causalidad o progresión de muchas enfermedades como la mucopolisidosis tipo IV. Particularmente, LAPTM4B interacciona físicamente y funcionalmente con la proteína mucopolisidina-1 (MCOLN1), cuya pérdida de función origina dicha enfermedad (Vergarajauregui et al., 2011). Otro ejemplo de ello, sería la asociación de variaciones en LAPTM4B con la demencia con cuerpos de Lewy (Kun-Rodrigues et al., 2019), o como veremos a continuación con más detalle, su implicación en cáncer.

Estas evidencias, junto con las expuestas anteriormente, esbozan una idea sobre la función que ejercería LAPTM4B en el correcto funcionamiento del lisosoma a diferentes niveles.

1.4.5. LPTM4B en cáncer

Entender la función fisiológica de LPTM4B, resulta fundamental para comprender cómo su desestabilización o diferencias en su expresión, se relacionan con procesos cancerígenos. A principios de los años 2000, una sobreexpresión de este gen y su derivada actividad proteica, fueron descritos por primera vez asociados con hepatocarcinoma (J. Liu et al., 2000; Shao et al., 2003; F. Wang et al., 2019; H. Yang et al., 2010). A partir de ese momento, numerosos estudios lo han correlacionado con diferentes tipos de tumores como cáncer de mama (Y. Li et al., 2010; Tao et al., 2019; M. Xiao et al., 2017), ovario (M. Yin et al., 2012), pulmón (L. Wang et al., 2019), colon (X.-J. Cheng et al., 2008; Kasper et al., 2005), osteosarcoma (Z.-X. Wang et al., 2020), cáncer nasofaríngeo (Q. Su et al., 2020), cáncer de vejiga (Y. Yin et al., 2021), cáncer gástrico (H. Zhang et al., 2014) o glioblastoma (Dong et al., 2017).

Sobre todo, ha sido la isoforma larga (LPTM4B-35) la más estudiada, y detectada, en los diferentes tumores. Opuestamente, Zhou y colaboradores recientemente afirman que, en realidad, la mayormente expresada tanto en tejidos sanos como en tumores, sería la isoforma-24 (K. Zhou et al., 2020), por lo que todavía se requieren más estudios para dilucidar la implicación y la expresión particular de cada una de estas isoformas en cáncer.

El mecanismo por el cual se produce un cambio de la expresión de LPTM4B en cáncer, podría explicarse por diferentes factores implicados en la regulación de la transcripción del gen. Hasta la fecha, se han realizado estudios de diferentes **factores de transcripción** como SP1, CREB1 o el *homeobox* que podrían influir en la expresión de LPTM4B (Y. Meng et al., 2016). Así bien, **polimorfismos** en el gen (Y. Meng et al., 2016) o diferencias en la ratio LPTM4-35/-24, también pueden influir en la susceptibilidad o en el desarrollo de ciertos tumores (X. R. Liu et al., 2004; Y. Meng et al., 2016).

Respecto a las funciones en las que LPTM4B podría participar en procesos cancerígenos, destacan su capacidad de migración, invasión o proliferación, así

como, su intervención en procesos de muerte celular. A continuación, se ponen de manifiesto algunas de las más relevantes o de las que existe conocimiento hasta la fecha.

- **Migración celular, invasión y metástasis**

En los primeros estudios de caracterización de LAPTM4B-35 ya se describió un potencial poder de invasión y metástasis en relación a cáncer hepático (X. R. Liu et al., 2004). Prestando atención a la estructura proteica de LAPTM4B, se puede inferir que el motivo PPRP de la isoforma 35, junto con un aumento en la fosforilación de Akt (Ser 473) asociado a la misma, parece jugar un papel importante en la migración celular en cáncer (Y. Meng et al., 2016; K. Zhou et al., 2020). Del mismo modo, un descenso de la expresión de LAPTM4B reduce la capacidad migratoria y de invasión de proteínas relacionadas (Y. Meng et al., 2016).

- **Proliferación**

Un aumento en la capacidad de crecimiento tumoral se ha asociado principalmente a la isoforma larga en hepatocarcinoma o cáncer de vesícula biliar, pero también en la isoforma corta en células HeLa. Una vez más, la vía de señalización de Akt podría activarse y moléculas aguas abajo, como GSK3B (glucógeno sintasa quinasa 3 β) o p27, pueden ser fosforiladas y disminuir la actividad de c-Myc o FOXO4, respectivamente (Y. Meng et al., 2016).

En condiciones de estrés metabólico, como ausencia de nutrientes o hipoxia, LAPTM4B potencia el crecimiento y la supervivencia celular. Al mismo tiempo, experimentos *in vivo* demuestran un mayor crecimiento tumoral en aquellos ratones xenotransplantados con células que sobreexpresan LAPTM4B (Y. Li et al., 2011).

- **Inhibición de apoptosis**

Una de las características más conocidas asociadas a cáncer es la resistencia a estímulos proapoptóticos (Hanahan & Weinberg, 2000). Según diversos estudios, alteraciones en la expresión de LAPTM4B producirían un descenso de proteínas apoptóticas como la caspasa 3 o PARP (Poli ADP ribosa polimerasa) (Y. Meng et

al., 2016). Contrariamente, su silenciamiento produce la liberación de catepsinas B y D, correspondiendo a una desestabilización de la membrana lisosomal, la activación de caspasa 3, y destrucción de Bid y PARP, que podrían iniciar la apoptosis (Y. Li et al., 2011).

Las explicaciones atribuidas a este fenómeno de muerte celular irían en relación con la cantidad de ceramida disponible, que a su vez se encuentra sujeta a la mayor o menor expresión de LPTM4B (Y. Meng et al., 2016). La ceramida es un supresor de tumores muy potente y, además, presenta capacidad proapoptótica. Es por ello que, oscilaciones en la cantidad de ceramida pueden producir LMP y desencadenar apoptosis (Blom et al., 2015).

Conviene señalar que, este fenómeno preventivo de la apoptosis estaría mediado por LPTM4B más patentemente cuando la célula está sometida a otros factores de estrés, como en el tratamiento con quimioterapia (Y. Li et al., 2011).

- **Fomento de la autofagia**

En la misma línea de muerte celular, el proceso de autofagia es clave para el control de la homeostasis y defectos en este proceso pueden promover enfermedades como el cáncer. Aunque la autofagia puede servir como inductor de tumorigénesis, o causar un aumento de la resistencia a quimioterapéuticos, una disminución de la misma también puede potenciar la formación de tumores por acumulación de material intracelular (Lebovitz et al., 2015). Igualmente, en situaciones de estrés metabólico, donde la demanda de nutrientes es muy elevada, las células cancerígenas tendrán una mayor tasa de supervivencia si el mecanismo de autofagia está hiperactivado (Y. Li et al., 2011).

En tal sentido, se ha observado una relación entre la sobreexpresión de LPTM4B y un aumento de la autofagia, sobre todo asociada a condiciones de estrés nutricional. Este hecho se evidencia, por ejemplo, en hepatocarcinoma, donde la sobreexpresión de LPTM4B conlleva un aumento en la regulación positiva de *ATG3*, gen autofágico esencial en la formación del autofagosoma. En este estudio se concluyó que LPTM4B aumentaba la supervivencia tumoral mediante la

hiperactivación de la autofagia a través de ATG3, entre otros mecanismos (F. Wang et al., 2019). En el caso del cáncer de mama, también encontramos pruebas de que una mayor tolerancia al estrés y una mayor supervivencia tumoral, pueden ser consecuencia de un aumento de la actividad autofágica impuesta por sobreexpresión de LAPTM4B (Y. Li et al., 2011).

Estos estudios otorgan gran importancia al fomento de la autofagia promovido por LAPTM4B como mecanismo de tolerancia al estrés impuesto en el contexto tumoral.

1.4.5.1. Quimiorresistencia

Poniendo el foco de nuevo en la quimiorresistencia, la región cromosómica 8q22, donde se encuentra LAPTM4B, se ha asociado con alteraciones tales como, amplificación génica mediante polimorfismos de nucleótido único (SNP) o sobreexpresión, que proporcionan un peor pronóstico a aquellos pacientes de cáncer que las presentan (Y. Li et al., 2010).

Uno de los mecanismos que podrían aumentar esta resistencia consistiría en el aumento del eflujo de los fármacos, este incremento en la tasa de salida de moléculas estaría mediada por bombas de transporte como la glicoproteína-P (P-gp). A diferencia de LAPTM4A, que parece actuar como proteína transportadora, LAPTM4B no tiene sitios de unión a ATP, por lo que por sí mismo no podría expulsar moléculas. En concreto, se ha observado que P-gp colocaliza con LAPTM4B-35, en tumores donde hay un aumento en la expresión de LAPTM4B (L. Li et al., 2010; Y. Meng et al., 2016). Este proceso conlleva una disminución en la cantidad de fármaco que llega al núcleo y, por tanto, la acción del mismo se ve reducida (Y. Li et al., 2011). Por otro lado, LAPTM4B promueve la resistencia a fármacos como doxorubicina, paclitaxel o cisplatino, evadiendo la vía apoptótica mediada por caspasas (L. Li et al., 2010).

Igualmente, la activación de cascadas de señalización como PI3K/Akt mediante la interacción entre el motivo PPRP del amino terminal de LAPTM4B con la subunidad reguladora de PI3K, p85 α , podría ser clave en la quimiorresistencia

mediada por LAPTM4B-35 (L. Li et al., 2010). Tanto la participación de PI3K, como de su efector Akt en quimiorresistencia se ha puesto de manifiesto en numerosas ocasiones debido a su función reguladora de múltiples procesos tumorales como la inhibición de la apoptosis. Aunque por sí misma, la activación de la vía PI3K/Akt no es el mecanismo común de origen de la quimiorresistencia, esta activación en conjunto con otros desajustes, habitualmente propician la resistencia a los fármacos (R. Liu et al., 2020). En este estudio se puso de manifiesto la activación de Akt a través de la interacción entre LAPTM4B y la subunidad p85 α , y con hiperactivación de la vía PI3K/Akt como resultado (X. Li et al., 2010).

Recientemente, se ha insinuado que la interacción entre LAPTM4B y EGFR podría estar implicada en quimiorresistencia. EGFR puede regular la autofagia mediante cinco vías de señalización, una de las cuales implica la intervención de LAPTM4B. En condiciones de estrés metabólico, LAPTM4B se asociará con EGFR en los endosomas y disociará RUBICON de Beclina-1, aumentando la autofagia y por tanto, pudiendo provocar un aumento de resistencia a fármacos (Wu & Zhang, 2020).

Aunque diversas evidencias apuntan a LAPTM4B como promotor de quimiorresistencia, los múltiples mecanismos de resistencia existentes y la falta de caracterización funcional de esta proteína, hacen necesario un extenso estudio exploratorio de LAPTM4B en este ámbito.

1.4.6. Dianas frente a LAPTM4B

Recopilando toda la información respecto a su sobreexpresión en muchos tumores junto con las múltiples funciones asociadas a LAPMT4B, se ha propuesto que dicha proteína podría ser una buena diana terapéutica frente al cáncer.

Diferentes enfoques como impedir la activación de Akt, perturbar la interacción entre LAPTM4B con la glicoproteína-P (Y. Meng et al., 2016), o inhibir la autofagia vía LAPTM4B, podrían ser empleados como terapias anticáncer (X.-C. Xu et al.,

2021). Asimismo, el empleo de tratamientos conjuntos frente a LAPTM4B y algunos de sus efectores, puede impedir la resistencia o la progresión del cáncer. Ejemplos de ello serían, el co-tratamiento frente a LAPTM4B y EGFR para reducir la resistencia a inhibidores de tirosina quinasa (Y. Meng et al., 2016), atacar simultáneamente la vía PI3K/Akt y LAPTM4B, o el uso de inhibidores de factores de angiogénesis y LAPTM4B para limitar la progresión tumoral (X.-C. Xu et al., 2021).

2. Objetivos

Debido a la alta tasa de recaídas descrita en LMA, surge la imperante necesidad de desarrollar nuevas terapias capaces de disminuir la mortalidad asociada a dicha enfermedad. En estudios previos del grupo de investigación, se ha observado que el desarrollo de tratamientos alternativos, planteando ciertos orgánulos celulares como diana terapéutica inespecífica en LMA, podría resultar de interés en clínica por sus características particulares en este contexto (Cornet-Masana et al., 2019). En base a esto, focalizamos la atención en los lisosomas como potenciales orgánulos diana y, en concreto, en una proteína importante para su biogénesis y funcionalidad, LAPTM4B. A continuación, datos derivados de bases de datos públicas, junto a la literatura disponible, apoyaron la relación entre su alta expresión y un peor pronóstico (Metzeler et al., 2008; Mosquera Orgueira et al., 2021) o una mayor resistencia farmacológica en diversos tumores (Y. Li et al., 2010; Y. Meng et al., 2016; Rehman et al., 2019; M. Yin et al., 2011).

Por lo tanto, el objetivo principal de este proyecto consiste en la identificación del papel de LAPTM4B en los eventos asociados con el inicio y mantenimiento de la LMA. Para poder conseguir este objetivo, se han propuesto objetivos secundarios:

- 1) Caracterización de la expresión, localización y función de LAPTM4B en LMA.
- 2) Evaluación de la relevancia fisiopatológica de LAPTM4B en LMA.
- 3) Evaluación del uso de la expresión del LAPTM4B como biomarcador para el diagnóstico y pronóstico de la LMA.

3. Material y métodos

3.1. Materiales

3.1.1. Líneas y cultivos celulares

En este trabajo, la totalidad de las líneas celulares empleadas se cultivaron en medio suplementado con 5-10% de suero fetal bovino (FBS) (Biowest), 2mM de L-Glutamina (Gibco) y 1mM de aminoácidos no esenciales de MEM (Biowest), a 37°C y al 5% de CO₂. La línea celular HEK-293T se cultivó en medio DMEM (Biowest) y las líneas celulares derivadas de neoplasias hematológicas en medio RPMI1640 (Biowest). La información de las líneas celulares se encuentra recogida en la **Tabla 1**.

Línea celular	Patología	Procedencia	Referencia
HL-60	LMA	DSMZ	(Gallagher et al., 1979)
MonoMac-1			(Steube et al., 1997)
KG-1			(Koeffler & Golde, 1978)
Kasumi-1			(Asou et al., 1991)
U-937		IJC (Dr. Buschbeck)	(Ralph et al., 1976)
SKM-1			(Nakagawa et al., 2008)
Molm-13			(Matsuo et al., 1997)
HL-60 AraC R			Producción propia
K-562	LMC	ATCC	(Lozzio & Lozzio, 2016)
HEK-293T	Epitelio de riñón embrionario	ATCC	(DuBridge et al., 1987)

Tabla 1. Información de las líneas celulares. AraC R, resistentes a citarabina; LMA, leucemia mieloide aguda; LMC, leucemia mieloide crónica; IJC, Institut de Recerca contra la Leucèmia Josep Carreras; ATCC, colección americana de cultivos celulares; DSMZ, colección alemana de microorganismos y cultivos celulares.

3.1.2. Muestras primarias

Las muestras de pacientes de LMA pertenecen a las colecciones de muestras del Hospital Clínic de Barcelona (C.0000397) y del Institut de Recerca contra la Leucèmia Josep Carreras, Campus ICO-GRiP (C.0002922). El diagnóstico y clasificación fue realizado siguiendo los criterios de la OMS (Arber et al., 2016). Los comités éticos de investigación clínica de los hospitales correspondientes aprobaron

el estudio y se obtuvo el consentimiento informado de los pacientes de acuerdo con la Declaración de Helsinki. Las muestras de cordón umbilical y las capas leucocitarias de donantes sanos se obtuvieron del Banc de Sang i Teixits con la aprobación del comité ético del Hospital universitario Vall d'Hebron.

La sangre de médula ósea, la sangre periférica, la sangre de cordón umbilical y los concentrados leucocitarios derivados de leucoaféresis terapéuticas se diluyeron en PBS y las células mononucleadas fueron aisladas mediante centrifugación en gradiente con Ficoll (Ficoll-Paque, GE Healthcare). En las muestras de cordón umbilical se practicó una depleción por linaje. Dicha depleción se basa en la selección positiva de células que expresan marcadores relacionados con linajes maduros, y se llevó a cabo en columna usando el cocktail de anticuerpos contenido en el Lineage cell Depletion kit (Miltenyi Biotec). Posteriormente, los estudios se efectuaron exclusivamente en la fracción negativa (lin-), enriquecida en la población primitiva.

3.1.3. Compuestos

Todos los compuestos empleados en este estudio se resuspendieron en H₂O (Thermo Fisher Scientific) o DMSO (Sigma-Aldrich) según las instrucciones del proveedor. Se almacenaron a -80°C a la concentración determinada por el fabricante para su óptima conservación dependiendo de las características de solubilidad del compuesto. Los compuestos utilizados se recogen en la **Tabla 2**.

Nombre	Abrev.	Prov.	Acción	Referencia	Núm. CAS	Solv.
PD184352	PD	SA	Inh MEK	(Sebolt-Leopold et al., 1999)	212631-79-3	DMSO
Ly294-002 (hidrocloruro)	LY	SA	Inh PI3K	(Guo et al., 2000)	934389-88-5	DMSO
Doxorrubicina (hidrocloruro)	Doxo	EPRS	Anti-leucémico	(Sonneveld et al., 1981)	25316-40-9	DMSO

Daunorrubicina (hidrocloruro)	Dauno	SCBT	Anti-leucémico	(Murphy & Yee, 2017)	23541-50-6	H ₂ O
Citosina β-D-arabinofuranósido	AraC, citarabina	SA			147-94-4	H ₂ O
Ácido holotransretinoico	ATRA	SA	Dif.	(Degos, 1992)	302-79-4	DMSO
1α,25-Dihidroxi-vitamina D3	Vitamina D3, vit D3	SA	Dif. monocítica	(Napoli et al., 1991)	32222-06-3	DMSO
Cloroquina	CQ	Enzo	Lisosomotrópico	(De Duve et al., 1974; Djehiche et al., 1996; Suzuki et al., 2002)	54-05-7	H ₂ O
Gilteritinib (ASP2215)	Gilt	QG	Inh FLT3/AXL	(Mori et al., 2017)	1254053-43-4	DMSO
Elimusertib (hidrocloruro)	Eli	SC	Inh ATR	(Lücking et al., 2020)	1876467-74	DMSO
Tetrahidouridina	THU	SA	Inh CDA	(Riva et al., 1992)	18771-50-1	H ₂ O
Ionomicina	Io	SCBT	Ionóforo de calcio	(Kuznetsov et al., 1992)	56092-82-1	DMSO

Tabla 2. Compuestos utilizados. Abrev, abreviatura; Solv, solvente; SA, Sigma-Aldrich; EPRS, European Pharmacopeia Reference Standard; SCBT, Santa Cruz Biotechnology; Enzo, Enzo Life Science; QG, QuimiGen; SC, SelleckChem; Inh, inhibidor; Dif, diferenciación.

3.1.4. Anticuerpos acoplados a fluoróforo

Los anticuerpos acoplados a fluoróforo empleados en citometría de flujo se encuentran recogidos en la **Tabla 3**.

Anticuerpo	Clon	Proveedor	Fluorocromo
CD11b/Mac-1	ICRF44	BD	PE
CD14	M5E2	BD	APC
CD184	12G5	BD	APC
CD45	HI30	BD	V450 (PB)
CD45 ratón	30-F11	BD	PE

Tabla 3. Lista de anticuerpos acoplados a fluoróforo para citometría de flujo. Todos reconocen el marcador de superficie humano, excepto si se indica.

3.1.5. Anticuerpos primarios

Los anticuerpos primarios se emplearon para detectar específicamente proteínas totales procedentes de lisados de células por Western blot y proteínas en superficie por citometría de flujo (**Tabla 4**).

Anticuerpos	Clon	Casa comercial
LAPTM4B	CL5289	ATLAS
GAPDH	6C5	Thermo Fischer Scientific
α -TUBULINA	sc-23948	Santa Cruz Biotechnology
GFP	4B10	Cell Signaling
LAMP1	H4A3	Abcam
TFEB	D2O7D	Cell Signaling
p-Stat3	3E2	Cell Signaling
Stat3	79D7	Cell Signaling
p-mTOR	Policlonal (2972)	Cell Signaling
mTOR	Policlonal (2972)	Cell Signaling
p-Akt	Policlonal (9271)	Cell Signaling
Akt	C67E7	Cell Signaling
p-Erk	E10	Cell Signaling
Erk	Policlonal (9102)	Santa Cruz Biotechnology
LC3B	Policlonal (51520)	Abcam
CDA	sc-365292	Santa Cruz Biotechnology

Tabla 4. Lista de anticuerpos primarios.

3.1.6. Cebadores utilizados para la RT-PCR semi-cuantitativa

Los cebadores empleados para el análisis de la expresión génica por RT-PCR semi-cuantitativa están recogidos en la **Tabla 5**.

Gen amplificado	Sentido	Secuencia	Referencia
GAPDH	<i>Forward</i>	GTGGACCTGACCTGCCGTCT	(Pan et al., 2007)
	<i>Reverse</i>	GGAGGAGTGGGTGTCGCTGT	
LAPTM4B (Isoforma larga)	<i>Forward</i>	CGACGCTCCTGAAAACCTTG	Diseño propio
	<i>Reverse</i>	TGATCAGATACCAGACGCC	

LAPTM4B (Isoforma corta+larga)	<i>Forward</i>	GGAAGTGGTACCGATACATCAA	(Xie et al., 2017)
	<i>Reverse</i>	TCACAGTGGCATCATCATACG	
p21 (CDKN1A)	<i>Forward</i>	TGGAGACTCTCAGGGTCGAAA	Diseño propio
	<i>Reverse</i>	GGCGTTTGGAGTGGTAGAAATC	
ENT1	<i>Forward</i>	GGGCAGCCTGTTTGGTCT	(Levin et al., 2021)
	<i>Reverse</i>	CCACTGGCAATAGCGCAG	
ENT2	<i>Forward</i>	CTCCTGTCCATGGCCAGTG	
	<i>Reverse</i>	GGGCCTGGGATGATTTATTG	
ENT3	<i>Forward</i>	TCAGCGGTGCCTCCACTGT	
	<i>Reverse</i>	GCAGCCAAGTCCACCAATGA	
CNT3	<i>Forward</i>	ACATTTCTTTTGGGGTTCAT	
	<i>Reverse</i>	GCAATCAGATTCACAGCGATG	
BCRP	<i>Forward</i>	GGATGAGCCTACAAGTGGCTT	
	<i>Reverse</i>	CTTCCTGAGGCCAATAAGGTG	
dCK	<i>Forward</i>	GCCGCCACAAGACTAAGGAA	
	<i>Reverse</i>	GACTTCCCTGCAGCGATGTT	
NDK	<i>Forward</i>	ATTCGCCTTGTGGTCTGA	
	<i>Reverse</i>	TTGGAGTCTGCAGGGTTGGT	
PN-I	<i>Forward</i>	AACAACATAGCATCCCCGTGT	
	<i>Reverse</i>	TTCTCAAGGCACCATCATGT	
CDA	<i>Forward</i>	TGTGCTGAACGGACCGCTA	
	<i>Reverse</i>	GCAGGTCCTCAGGCCCAA	
NT5E	<i>Forward</i>	TCTTCTAAACAGCAGCATTCC	(McBride et al., 2009)
	<i>Reverse</i>	CATTTTCATCCGTGTGTCTCAG	
MRP7	<i>Forward</i>	TCCAGCAGACCATCTGCAAACG	
	<i>Reverse</i>	GAGGTAGAGCCCCAGAGGAGAATGT	
BIRC5 (survivina)	<i>Forward</i>	CACCGCATCTCTACATTCAAGA	(Y. Zhang et al., 2015)
	<i>Reverse</i>	AAGTCTGGCTCGTTCTCAGTG	
CBR1	<i>Forward</i>	ATACGGGGTGACGAAGATTG	(Matsunaga et al., 2015)
	<i>Reverse</i>	CACCTTCTTCTGGGCTCTTG	
AKR1C3	<i>Forward</i>	TGGAAAACACTCACTGAAAAAAGC	
	<i>Reverse</i>	CATTTTCATCTGTTGGTGAAAG	

Tabla 5. Lista de cebadores utilizados para la RT-PCR semicuantitativa.

3.2. Métodos

3.2.1. Generalidades y estadística

La totalidad de los experimentos de citometría de flujo mostrados en esta tesis han sido adquiridos con el citómetro FACSCantoII (Becton Dickinson) y para el análisis de los resultados se ha utilizado el software FlowJo (Tristar). En todos los experimentos de citometría de flujo el negativo de tinción fue fijado con un control sin teñir y los distintos canales de emisión fueron compensados con controles unitarios de tinción con el fin de subsanar el *spillover* de fluorescencia entre ellos.

Las pruebas estadísticas se han efectuado con el programa GraphPad Prism® 8.0 (GraphPad software). En el caso de los experimentos de líneas celulares se aplicó un test de normalidad para determinar la distribución gaussiana y se realizaron pruebas *t Student* no emparejadas bilaterales con un nivel de confianza del 95%. En algunos casos, se han aplicado test ANOVA de medidas repetidas de dos factores. En las comparaciones entre grupos de muestras primarias, no fue posible asumir una distribución gaussiana y se realizaron test no paramétricos de Mann-Whitney no emparejados bilaterales con un nivel de confianza del 95%. Todas las barras de error indicadas en las gráficas de barras corresponden al error estándar de la mediana (SEM). En el grupo de investigación se ha adoptado esta medida como estándar al tener en cuenta la variabilidad y el tamaño muestral, consiguientemente, el error estándar de la mediana reproduce la certeza relativa sobre ese valor. Se ha considerado estadísticamente significativos valores de $p < 0,05$.

3.2.2. Contaje celular y viabilidad

Para el conteo de células vivas durante los experimentos se ha empleado un hemocitómetro (cámara de Neubauer, VWR) junto a la tinción de azul tripán (Sigma-Aldrich) con la finalidad de discriminar la viabilidad celular. En los experimentos de citometría de flujo, los análisis se han efectuado dentro de la población de células vivas con un patrón de tinción negativa para 7-AAD (eBioscience) y positivo para Hoechst33342 (Sigma-Aldrich), con ello es posible discernir las partículas nucleadas y descartar células unidas. Asimismo, se ha

comprobado el perfil de FSC-SSC. En ciertos experimentos y por cuestiones de solapamiento con otras tinciones, se ha realizado solamente una de las dos medidas de viabilidad.

3.2.3. Análisis de la expresión de proteínas en superficie

3.2.3.1. Análisis de la diferenciación mieloide

Los efectos sobre la diferenciación de las células leucémicas se analizaron mediante la evaluación de la expresión en superficie de marcadores de diferenciación terminal mieloide CD11b y CD14. Se cultivaron 3×10^5 células/mL y fueron tratadas con los compuestos a la concentración indicada durante 72h. Las células se tiñeron con los anticuerpos específicos para los marcadores indicados junto a los de viabilidad y se analizaron por citometría de flujo. Dependiendo del experimento, se analizaron el porcentaje de células correspondiente a la expresión de los marcadores o la MFI (intensidad media de fluorescencia, del inglés *Mean Fluorescence Intensity*), dentro de la población de células vivas.

3.2.3.2. Análisis de marcadores de migración celular

La capacidad migratoria de las células leucémicas se ha evaluado mediante la determinación de la expresión de CD184 o CXCR4 en superficie. 3×10^5 células/mL se cultivaron en estado basal durante 72h, posteriormente, las células se tiñeron con el anticuerpo específico de CD184 (**Tabla 3**) y los de viabilidad, y se adquirieron por citometría de flujo. Se analizó el porcentaje de células con la expresión de los marcadores y la MFI, dependiendo del experimento, dentro de la población de células vivas.

3.2.3.3. Análisis de la expresión génica por PCR semi-cuantitativa en tiempo real

Para el análisis de la expresión génica a nivel de ARN mensajero, se extrajo el ARN total de las células en las condiciones indicadas en cada caso, mediante el *Total RNA Purification Kit* (Norgen Biotek) siguiendo las instrucciones del proveedor. El *qScript cDNA Synthesis Kit* (Quanta Bioscience) fue empleado para la retrotranscripción a

ADNc, el cual usa cebadores hexámeros al azar. Con el ADNc obtenido se realizaron RT-PCRs semi-cuantitativas con *Power Up SYBR Green PCR Mastermix* (Applied Biosystems) y cebadores diseñados específicamente para determinar la expresión de los genes de interés (**Tabla 5**). La reacción se llevó a cabo en el termociclador QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) y únicamente se tuvo en cuenta la expresión de los genes cuando los perfiles de *melting curve* eran adecuados y las Cts (ciclo umbral, del inglés *threshold cycle*) inferiores a 35.

Para analizar los resultados se empleó el software específico de QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR System, se obtuvieron los Ct y los valores del gen de referencia GAPDH se restaron a los valores derivados del resto de cebadores (Δ Ct). En ciertas ocasiones, posteriormente se extrajeron los Cts de la condición control a los de las otras condiciones ($\Delta\Delta$ Ct) y se calculó el *fold change* como $FC=2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

3.2.4. Microscopía de fluorescencia

3.2.4.1. Análisis de la expresión de LAPTM4B, LAMP1 o LC3B por microscopía de fluorescencia

Para analizar el patrón de expresión de LAPMT4B, LAMP1 y LC3B se realizó un ensayo de inmunofluorescencia. Con este objetivo, un total de 3×10^5 células fueron adheridas a cubreobjetos previamente tratados 2 horas a 37°C con 50µg/ml de poli-L-lisina (Sigma-Aldrich). Las células se fijaron con formaldehído (FA) al 4% (Sigma-Aldrich) y se lavaron con suero salino tamponado con Tris (TBS). A continuación, se permeabilizaron con el detergente Tritón-X100 al 0,2% durante 10 minutos, y se realizó un bloqueo con 10µg/ml de γ -globulina (Sigma-Aldrich) diluido en tampón TNB (1M Tris-HCl pH 7,4, 0,15M NaCl, 2% BSA). Posteriormente, se tiñeron con el anticuerpo de LAPTM4B (ATLAS, 91356), LAMP1 (Abcam, 25630) o LC3B (Abcam, 51520) incubados durante 1h a temperatura ambiente. Como anticuerpo secundario se utilizó el Alexa Fluor 568 Goat Anti-Mouse/-Rabbit IgG (H+L) (Life

Technologies), según el caso, y además, se tiñeron los núcleos con Hoechst33342. Para el montaje se usó Mowiol 4-88 (VWR) con el *quencher* Dabco (1,4-diazabicyclo-2.2.2-octane) (Sigma-Aldrich). Las imágenes se adquirieron con el microscopio de fluorescencia Zeiss AxioObserver Z1 acoplado al módulo confocal Zeiss LSM 710 y con el objetivo de 63x con apertura numérica 1,4 y se analizaron con el software Fiji (Schindelin et al., 2012).

3.2.4.2. Análisis del compartimento lisosomal mediante *LysoTracker*

Para el estudio microscópico del compartimento lisosomal, se empleó la sonda fluorescente *LysoTracker Deep Red* (Thermo Fisher). Esta sonda consiste en un fluoróforo vinculado a una base débil parcialmente protonada a pH neutro. Esto permite que estas sondas crucen membranas con facilidad y se localicen con alta sensibilidad en orgánulos ácidos en células vivas. Para el análisis microscópico, se trataron $2,5 \times 10^5$ células de líneas celulares de LMA por condición con los compuestos indicados a 24h, se lavaron con medio completo y se incubaron 1h con 100nM *LysoTracker Deep Red* y Hoechst33342 a 37°C. Posteriormente, se realizó un segundo lavado con medio y se adhirieron a cubreobjetos compartimentados de 8 pocillos μ -Slide (Ibidi) previamente tratados con 50 μ g/ml de poli-L-lisina antes de la observación microscópica. Las células se observaron en vivo, a lo largo de todos los pasos se mantuvieron las condiciones óptimas para la viabilidad de las células. Se usó un microscopio de fluorescencia Zeiss AxioObserver Z1 acoplado al módulo confocal Zeiss LSM 710 y con el objetivo de 63x con apertura numérica 1,4 y se analizaron con el software Fiji (Schindelin et al., 2012).

3.2.5. Estudios de afectación lisosomal

3.2.5.1. Análisis del compartimento lisosomal mediante *LysoTracker*

Para el análisis del compartimento lisosomal por citometría de flujo, se sembraron en placas de 96 pocillos 7×10^5 células/mL de LMA y se trataron con en las condiciones indicadas durante 24h. Posteriormente, las células se lavaron con solución salina equilibrada de Hanks (HBSS), se incubaron con 50nM *LysoTracker Deep Red* (Thermo Fisher) y el marcador nuclear *Hoechst 30'* a 37°C. Las células se

lavaron con HBSS y se evaluaron por citometría de flujo. Se analizó la MFI obtenida del canal APC dentro de la población de células vivas.

3.2.5.2. Análisis del calcio intracelular

Con el fin de determinar cambios en la concentración de calcio intracelular, se empleó la prueba radiométrica fluorescente sensible a calcio, Fura2-AM (Martínez et al., 2017). Para ello, las líneas celulares de LMA se incubaron con Fura2-AM 2 μ M en HBSS+BSA sin Ca²⁺ ni Mg²⁺ durante 30' a 37°C y en oscuridad. A continuación, las células se lavaron con el mismo medio y se resuspendieron en HBSS+BSA en presencia de Ca²⁺ y Mg²⁺. Posteriormente, se trataron con ionomicina 1 μ M, un ionóforo que aumenta el calcio intracelular y, por tanto, el control positivo de esta prueba. La fluorescencia se midió a diferentes tiempos a los longitudes de onda 340nm y 380nm en un lector de placas y se analizó según la ratio (340/508)/(380/508). Las placas empleadas en este ensayo fueron negras con fondo transparente.

3.2.6. Clonaje y transducción

3.2.6.1. Clonaje en el plásmido intermediario pJET1.2

Para el posterior clonaje en otros plásmidos capaces de infectar células hematopoyéticas humanas, en primer lugar, se introdujo en el vector pJET1.2 (Fermentas) el inserto de LPTM4B silvestre (wt) amplificado previamente por PCR a partir del ADNc de LPTM4B cedido amablemente por el laboratorio Anderson (Wisconsin) en un plásmido de segunda generación pWPT. Los cebadores utilizados para la amplificación contenían *overhangs* que permitieron delimitar el gen LPTM4B con dianas de restricción de EcoRI y BamHI (**Tabla 6**). Los resultados se secuenciaron por Sanger.

5' EcoRI - LPTM4B Iso Larga	GGGAAGAATTCCATGACGTCACGGACTCGG
5' EcoRI - LPTM4B Iso Corta	GGGAAGAATTCCATGAAGATGGTCGCGCCC
3' BamHI - LPTM4B	GGAAAGGATCCGGCAGACACGTAAGG

Tabla 6. Cebadores utilizados para amplificar LPTM4B y delimitarlo con las dianas de restricción EcoRI-BamHI.

3.2.6.2. Clonaje en el vector intermediario mEmerald-C1

Una vez con nuestros insertos de interés amplificados en el plásmido pJet1.2, pasamos a subclonar LAPTM4B en el vector de tercera generación mEmerald-C1 (Addgene #53975) (**Figura 6**), esta vez con la finalidad de insertar el fluoróforo *Emerald* (variante de GFP) y así obtener una proteína de fusión *Emerald-LAPTM4B*. Los insertos LAPTM4B correspondientes a la Isoforma Larga o a la Isoforma corta se extrajeron mediante digestión con EcoRI y BamHI del vector pJET para insertarlo en el vector mEmerald, el cual se digirió con las mismas enzimas de digestión. El inserto se insertó en el N-terminal de *Emerald* y se comprobó que el sentido del inserto en el vector mEmerald era el adecuado, dado que comparten las mismas dianas de restricción. Esta comprobación se realizó por secuenciación Sanger.

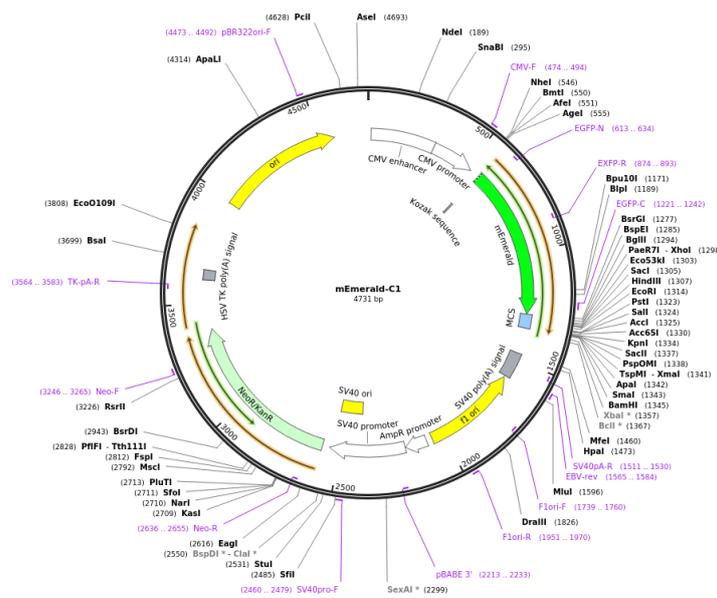


Figura 6. Mapa del plásmido mEmerald-C1. Obtenido por el laboratorio de Richard Wood (Addgene #53975).

3.2.6.3. Clonaje en el vector lentiviral pCDH-EF1-FHC

Por último, con el objetivo de expresar la secuencia *Emerald-LAPTM4B* (Isoforma larga o corta) en células mieloides se usó el vector lentiviral de tercera generación pCDH-EF1-FHC (Addgene #64874) (**Figura 7**). El clonaje se realizó a partir de las

construcciones derivadas del plásmido intermediario *mEmerald-C1*, de *Emerald* fusionado a las formas silvestres LAPTM4B isoforma larga o isoforma corta, que se cortaron y transfirieron al plásmido pCDH-EF1-FHC mediante la digestión con las enzimas NheI y BamHI. El inserto *Emerald-LAPTM4B* largo o corto se clonó fusionado con los marcadores FLAG y HA (**Figura 8**), y tras la ligación al vector se comprobaron los resultados por secuenciación Sanger.

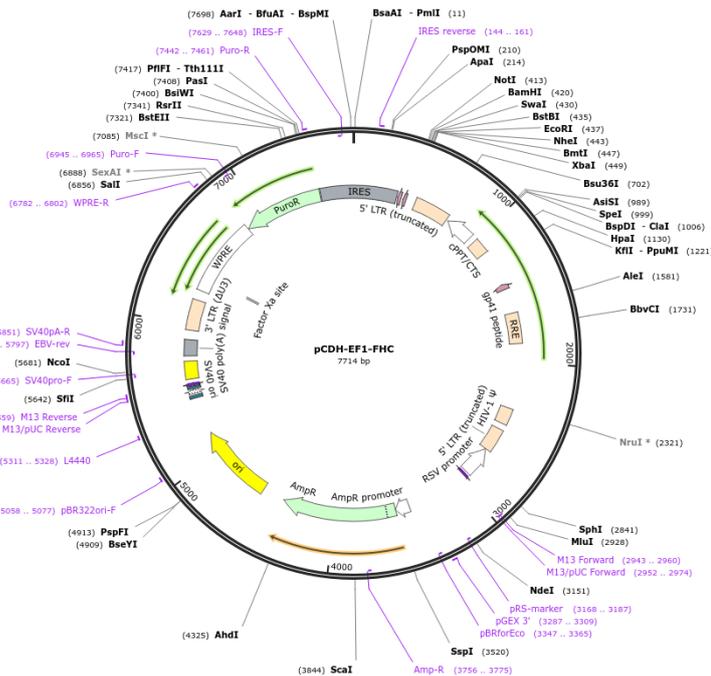


Figura 7. Mapa del plásmido pCDH-EF1-FHC. Obtenido por el laboratorio de Michael Davidson (Addgene #64874).



Figura 8. Esquema del clonaje de LAPTM4B en pCDH-EF1-FHC.

3.2.6.4. Clonaje de ARNsg en el plásmido pLentiGuide-Puro

Para conseguir una disminución eficaz en la expresión de LAPTM4B, se utilizó la tecnología CRISPR-Cas9 con un sistema de dos vectores. El plásmido de partida no incluye la expresión de Cas9, por tal razón, es preciso transducirlo previamente a las

3.2.6.5. Transducción de vectores lentivirales en células leucémicas

2,5x10⁵ células HEK-293T se sembraron en placas de 6 pocillos en un volumen de 2mL y se transfectaron con los plásmidos de interés y con plásmidos complementarios precisos para la generación de virus lentivirales de tercera generación (Dull et al., 1998) (**Tabla 8**). La transfección fue realizada mediante liposomas con el kit *JetPei DNA transfection reagent* (Polyplus transfection) según las indicaciones del proveedor y empleando la proporción recomendada de plásmidos (6:4:4:3; plásmido de interés: pMDLg/pRRE : pRSV-Rev : pMD2.G).

Nombre	Procedencia	Elemento codificado
<i>pMDL/pRRE</i>	Addgene #12251	<i>gag, pol</i>
<i>pRSV-Rev</i>	Addgene #12253	<i>Rev</i>
<i>pMD2.G</i>	Addgene #12259	VSV-g (<i>env</i>)

Tabla 8. Relación de plásmidos complementarios necesarios para la generación de lentivirus de tercera generación.

48h después de la transfección, se infectaron 5x10⁵ células mieloides/mL con el sobrenadante lentiviral filtrado. Para ayudar a la infección se realizó una centrifugación en presencia de 4µg/mL de bromuro de hexadimetrina (Sigma-Aldrich) a 32°C durante 90'. Para la detección de células transducidas se evaluó la presencia de GFP+ por citometría de flujo en el caso de pCDH-*Emerald*. Mientras que, para pLentiCas9-Blast y pLentiGuide-Puro, se realizó una selección por blasticidina y puromicina (Sigma-Aldrich), respectivamente.

3.2.6.6. Análisis de la señalización con vectores reporteros

Para analizar la actividad de señalización de las isoformas larga y corta de LAPTM4B, se utilizaron diferentes vectores reporteros basados en luciferasa: pGL4.33[luc2P/SRE/Hygro] (Promega), que incluye un elemento de respuesta a suero activado por la señalización de MAPK-Erk; pGL4.29[luc2P/CRE/Hygro] (Promega), que contiene el elemento respuesta a AMPc (CRE); pGL4.30[luc2P/NFAT-RE/Hygro], que posee el elemento de respuesta al factor

nuclear de células T activadas y 4xM67 pTATA TK-Luc (Addgene), que contiene el elemento respuesta a Stat1/3 (Besser et al., 1999). Todos los plásmidos expresan luciferasa *luc2* (*Firefly*) de manera condicional a la estimulación de los elementos respuesta. Mediante el sistema JetPei se transfectaron 2×10^5 células HEK-293T/mL con el vector pGL4 con el elemento respuesta, las diferentes construcciones de pCDH-*Emerald*-LAPTM4B larga y -LAPTM4B corta y un plásmido control con expresión constitutiva del gen de luciferasa *Rluc* (*Renilla*) (pRL-SV40, Addgene) a una proporción 2:2:1. 24h después de la transfección se trataron las células según lo indicado y 24h después del tratamiento las células fueron lisadas, y se evaluó la luminiscencia emitida por los dos tipos de luciferasa siguiendo las indicaciones del proveedor. Los datos obtenidos se presentaron como la luminiscencia de *Firefly* respecto a la de *Renilla* y se normalizaron mediante el cálculo de un factor por el que multiplicar todos los valores y así reducir el amplio rango de los valores obtenidos de esta técnica. Dicho factor se calculó dividiendo el valor medio de todos los datos obtenidos de cada réplica entre el valor de la media derivada de todos los datos de todas las réplicas.

3.2.7. Estudios de supervivencia y proliferación

3.2.7.1. Citotoxicidad

Con el fin de evaluar el efecto citotóxico de los diferentes compuestos, las líneas celulares se sembraron en placas de 96 pocillos 7×10^5 células/mL, 5×10^5 células/mL y 3×10^5 células/mL para los experimentos de 24h, 48h y 72h, respectivamente, y fueron tratadas con los compuestos a la concentración indicada. Pasado el tiempo correspondiente, la viabilidad fue analizada por contaje volumétrico, según como se describe en el apartado **3.2.2.**

3.2.7.2. Cálculo de las concentraciones efectivas medias (EC50)

La EC50 es la concentración en la cual un compuesto induce la mitad de su efecto máximo. Su cálculo se realizó en base a los datos de citotoxicidad después del tratamiento con un amplio abanico de concentraciones del compuesto, obtenidos mediante el protocolo explicado en el apartado **3.2.7.1.** Los valores de las EC50 se

obtuvieron mediante el software GraphPad Prism (Variable slope-four parameters o Variable slope-three parameters, dependiendo del experimento).

3.2.7.3. Ensayo de proliferación con DiI

Para el análisis de la proliferación celular en líneas celulares, se utilizó la sonda DiI (1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine, ThermoFisher), capaz de teñir las membranas celulares lipofílicas. La intensidad media de fluorescencia disminuirá conforme las células se dividan, puesto que la tinción se divide entre las células hijas. Un total de $1,5 \times 10^5$ células, previamente lavadas con PBS 1x, se tiñeron con DiI $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ durante 20' a 37°C . A continuación, se lavaron dos veces con PBS 1x + 20% FBS y se sembraron por triplicado en placas de 24 pocillos a una concentración de 3×10^5 células/mL. Los días 0, 2 y 4 del experimento, la mitad del medio fue retirada, se analizó la tinción DiI por citometría de flujo y se completó con la misma cantidad de medio retirada.

3.2.7.4. Análisis del ciclo celular

Los cambios en el ciclo celular estimulados por las diferentes transducciones o por los efectos de los compuestos, se estudiaron cultivando las células en medio desprovisto de FBS durante 18h para sincronizarlas. A continuación, se cultivaron con medio completo para determinar las diferencias de las transducciones a nivel basal. Las células se lavaron con PBS 1x + 0,5mM EDTA y se fijaron con etanol al 70% frío durante 18h. Consecutivamente, las células se lavaron y se tiñeron con Hoechst33342 y se adquirieron los datos mediante citometría de flujo. Para discernir entre las diferentes fases del ciclo celular se determinó el contenido de ADN tras excluir los dobletes (Dean & Jett, 1974). Además, las células en fase <G0 y >G2/M fueron descartadas del análisis y se recalculó el 100% de la suma de las fases G0/G1, S y G2/M.

3.2.7.5. Análisis de las reversiones de la citotoxicidad

Para evaluar el potencial de la LAPTM4B para revertir la citotoxicidad inducida por algunos compuestos, las células han sido tratadas con combinaciones de compuestos

simultáneamente durante 48h y posteriormente, se analizó la viabilidad celular según se detalla en el apartado **3.2.7.1**.

3.2.8. Ensayo de clonogenicidad

Para evaluar el potencial de autorrenovación de las células se han realizado ensayos de clonogenicidad. Un total de 1.500 células, para HL-60 y MM-1, o 1000 células del resto de líneas celulares empleadas se mezclaron con 1mL de *MetboCult H4435 Enriched* (Stem Cell Technologies) y se sembró por duplicado en placas de 24 pocillos. Las unidades formadoras de colonias (CFU) se contaron en base a la morfología y la celularidad a día 10.

3.2.9. Estudios *in vivo*

Toda la experimentación *in vivo* llevada a cabo en este trabajo se ha realizado de acuerdo con los procedimientos aprobados por el correspondiente Comité Ético de Experimentación Animal (CEEAA) de la Universidad de Barcelona (UB) y del Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol (IGTP) y en cumplimiento de lo establecido en el Real Decreto 53/2013, por el cual se establecen las normas básicas aplicadas para la protección de los animales usados en experimentación y otras finalidades científicas.

En los estudios *in vivo*, se ha trabajado con ratones adultos inmunodeficientes NOD-scid IL2Rgamma^{null} (NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ, NSG) procedentes de Jackson Laboratory. La elección de este modelo animal se ha basado en su alta eficacia de injerto de poblaciones hematopoyéticas, al igual que en su incrementada reproducibilidad de los resultados (Agliano et al., 2008; Sarry et al., 2011).

Los animales se mantuvieron en condiciones estériles, estabulados en jaulas ventiladas con aire filtrado y manipulados en campanas de flujo laminar. Se les suministró una dieta ordinaria de laboratorio y acceso a agua y comida *ad libitum*. La temperatura se controló para oscilar entre 22 y 24°C y se aplicaron ciclos de luz-

oscuridad de 12h. Los experimentos se realizaron con ratones de entre 6 y 8 semanas de edad y se mieloablacionaron con la administración intraperitoneal de 30mg/kg de busulfán (Sigma-Aldrich) 24h antes de la inyección de células.

3.2.9.1. Xenotrasplante con líneas celulares

Se inyectaron por vía intravenosa 2×10^6 células HL-60 transducidas con pCDH-*Emerald*, pCDH-*Emerald*-LAPTM4B largo o -*Emerald*-LAPTM4B corto, junto con el plásmido lentiviral pLL-EF1 α -eFLuc-T2A-GFP (rLuc, System Bioscience #LL410PA-1) resuspendidas en solución fisiológica (0,9% NaCl, Sigma-Aldrich). El plásmido rLuc permite la expresión de luciferasa, la cual puede detectarse por luminiscencia producida por la oxidación de la luciferina, y así bien, poder disponer de un seguimiento de la capacidad de injerto. La carga leucémica se analizó en días alternos mediante el sistema de toma de imágenes *in vivo* no invasivo IVIS® Lumina III *In vivo Imaging System* (Perkin Elmer). Para ello, se inyectó de forma intraperitoneal Luciferina 150mg/kg de peso del ratón (Perkin Elmer) y se anestesiaron con 3% de isoflurano (BBraun). Transcurridos 10' se realizaron las capturas de imágenes en un lapso de entre 30" (ratones inyectados con la isoforma larga) o 2' (ratones inyectados con la isoforma larga o el vector control) y se analizaron con el software Aura®. Pasadas tres semanas, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y se extrajeron las tibias, los fémures y el bazo. Las células de la médula ósea obtenidas de las tibias y los fémures se extrajeron por disgregación mecánica mediante el empleo de un mortero. En cambio, para la obtención de las de bazo se realizó presión mecánica con la ayuda del émbolo de una jeringa. En ambos casos, se resuspendieron en tampón PBS 1x + 0,5mM EDTA + 0,5% BSA y mediante citometría de flujo se analizaron las poblaciones presentes. Para discernir las células leucémicas, se emplearon anticuerpos específicos de CD45 humano, excluyendo las CD45 de ratón, y considerando el porcentaje de células CD45+ como el valor de injerto de las células. Tras seleccionar dicha población, las células de interés se identificaron gracias a la expresión de GFP (*Emerald*), respectivamente, y se representaron como el porcentaje de células, normalizando los resultados al 100%.

3.2.9.2. Ensayo de competición de xenotrasplante con líneas celulares

Previamente a los experimentos *in vivo*, células HL-60, MonoMac-1 o U-937 fueron transducidas con el vector comercial pULTRA-Smurf (Addgene #48974), en el cual la proteína GFP se reemplazó por la proteína fluorescente AmCyan, detectable por citometría de flujo, según el protocolo detallado en el apartado 3.2.6.4. Tras la validación de la transducción, se inyectaron vía intravenosa $1,5 \times 10^6$ (HL-60) o 5×10^5 células (MonoMac-1 o U-937) pULTRA-Smurf, junto con $1,5 \times 10^6$ células HL-60 o 5×10^5 MonoMac-1 o U-937, respectivamente, transducidas con el vector pCDH-*Emerald*, -*Emerald*-LAPTM4B largo y -*Emerald*-LAPTM4B corto resuspendidas en solución fisiológica (0,9% NaCl, Sigma-Aldrich). Pasadas dos semanas para MM-1 y U-937 o tres en el caso de HL-60, los ratones se sacrificaron y las células se extrajeron de la misma forma descrita en el apartado 3.2.9.1. Las poblaciones celulares presentes se analizaron por citometría de flujo. Las células leucémicas se identificaron con anticuerpos específicos de CD45 humano, descartando las CD45 de ratón, y se consideró el porcentaje de células CD45+ como el valor de injerto de las células. Tras seleccionar dicha población, las células control transducidas con pULTRA-Smurf y las células de interés fueron diferenciadas debido a la expresión de AmCyan y GFP (*Emerald*), respectivamente, y representadas como el porcentaje de células, normalizando los resultados al 100%.

3.2.10. Western Blot

Con el fin de analizar las proteínas en estado basal, 10×10^6 células de las líneas celulares de LMA, de muestras primarias procedentes de sangre periférica o de leucoaféresis fueron recolectadas para asegurar un distinguido porcentaje de blastos. Para el análisis de proteína tras un tratamiento, se cultivaron 3×10^6 células de LMA y se trataron con los compuestos indicados 24h o 48h, o se cultivaron en ausencia de nutrientes durante 18h. Las células fueron lisadas con el tampón RIPA complementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas (1mM benzamidina, 1mM DTT, 1µg/mL leupeptina, 1µg/mL aprotinina, 1mM PMSF, 1mM ortovanadato de sodio, 20mM NaF) para poder analizar la proteína total. Tras obtener los extractos

de proteína, se cuantificaron con el kit *BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fischer Scientific) mediante el uso del espectrofotómetro *Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader* (BioTek) a 562nm.

A continuación, se realizó una electroforesis de los extractos proteicos en geles de geles de poliacrilamida a una concentración de 60-100 μ g y en presencia de condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS y β -mercaptoetanol, Sigma-Aldrich) y fueron transferidos a una membrana de nitrocelulosa de 0,2 μ m (BIO-RAD). Para la inmunodetección, se usaron anticuerpos primarios específicos (**Tabla 4**) y anticuerpos secundarios *IRDye® 800 CW* y *IRDye® 680 CW* (LI-COR) según las indicaciones del sistema de inmunodetección Odyssey (LI-COR). Las imágenes fueron obtenidas con el *Odyssey Infrared Imaging System®* (LI-COR) y se empleó GAPDH y α -Tubulina (**Tabla 4**) como referencia. El software *ImageJ* se usó para cuantificar las bandas.

3.2.11. Generación de líneas resistentes a citarabina

Para estudiar la resistencia en las líneas de LMA, se eligieron las células HL-60 debido a su elevada sensibilidad a quimioterapia y fueron tratadas al valor de la EC50 hasta que adquirieron resistencia a citarabina (AraC R). En ese momento, se incrementó gradualmente la concentración del tratamiento hasta que se duplicó el valor de las EC50, en comparación con el valor inicial. Las células resistentes se mantuvieron con la dosis de la EC50 en el medio para evitar la pérdida de la resistencia y con el fin de validarlas, se comprobaron por citometría de flujo los valores de EC50 (**Figura 10**).

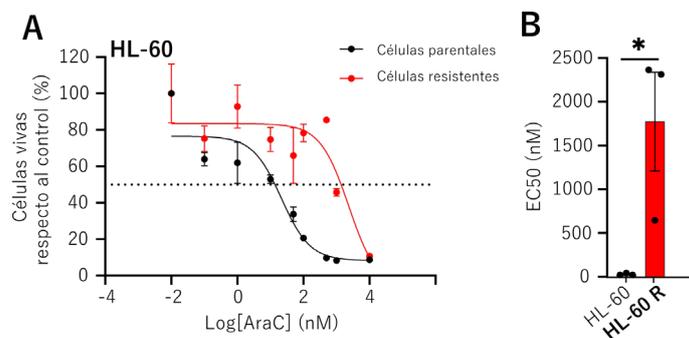


Figura 10. Las células HL-60 resistentes generadas tienen una menor sensibilidad a la citarabina e incrementan el valor de su EC50. Las células HL-60 se trataron con citarabina 15nM hasta que las células adquirieron resistencia. **A)** La línea parental y la resistente se trataron con dosis crecientes de citarabina y la viabilidad se determinó por citometría de flujo. **B)** El cálculo de los valores de las EC50 reveló un incremento en la línea resistente. El gráfico de las EC50 es una réplica representativa de tres experimentos individuales, en la que cada punto representa la media de triplicados de un experimento \pm SEM. La media del valor de la EC50 correspondiente a tres experimentos independientes queda indicada mediante las barras. * $p < 0,05$.

3.2.12. Estudio de la senescencia

La senescencia se ha evaluado mediante el kit *β -Galactosidase Staining Kit* (Cell Signal) que permite la detección de SA- β -Gal, un indicador de la senescencia. $7,5 \times 10^5$ células/mL en estado basal o tratadas 24h previamente según se indica, se lavaron, fijaron y tiñeron durante 12h siguiendo las instrucciones del proveedor. Transcurrido el tiempo correspondiente, se empleó la cámara acoplada a un microscopio invertido y se capturaron imágenes de distintos planos a 20x aumentos.

4. Resultados

4.1. Resultados preliminares

Este proyecto deriva de estudios previos del grupo de investigación centrados en la caracterización de un grupo de compuestos antihistamínicos denominados ANHAs (agonista inverso antineoplásico de HRH1) como potencial tratamiento frente a LMA. Durante la realización de dicho trabajo se concluyó que el mecanismo de acción mediante el cual estos compuestos inducen apoptosis y autofagia simultáneamente en células leucémicas, consiste en provocar una disrupción lisosomal y mitocondrial independiente del receptor de histamina (Cornet-Masana et al., 2019). La relevancia de este estudio para el proyecto actual reside en la caracterización de los lisosomas y las mitocondrias en procesos cancerígenos y en su proposición como posibles dianas terapéuticas.

A pesar de que en dicho proyecto se exploraron ambos orgánulos como potenciales dianas farmacológicas en conjunto, la trascendencia de las mitocondrias como fuente de energía principal de la célula ha generado numerosos estudios a lo largo de los años, en los que se ha tratado de diseccionar su funcionalidad y sus alteraciones en múltiples ámbitos, incluido en el de la leucemia (de Beauchamp et al., 2022; El-Shaqanqery et al., 2021; Mondet et al., 2021; Panina et al., 2021). Por tal razón, junto a la imperante necesidad de encontrar nuevas estrategias terapéuticas contra esta enfermedad (Sukhai et al., 2011), en el trabajo que estamos presentando decidimos centrarnos exclusivamente en los lisosomas, grandes olvidados a lo largo de la historia por su relegado papel como orgánulos de digestión. Del mismo modo, las evidencias encontradas en la literatura al respecto destacan su desestabilización en varios tipos de leucemia (Dielschneider et al., 2014; Puissant et al., 2010) y, en concreto, su fragilidad asociada a un aumento de tamaño en LMA (Sukhai et al., 2013). Dicha inestabilidad lisosomal en el contexto leucémico permitiría a las células de LMA cubrir sus exigentes necesidades energéticas y adquirir ventajas respecto a las células sanas, como una alta proliferación, un metabolismo hiperactivo o una mayor capacidad invasiva (Cuesta-Casnovas et al., 2022; Jain et al., 2022; T. Tang et al., 2020). Asimismo, las diferencias estructurales y funcionales observadas entre los

lisosomas de las células leucémicas y los de células sanas, mejorarían la ventana terapéutica en el supuesto de plantear estos orgánulos como diana frente a LMA.

En base a los datos recopilados acerca de los lisosomas en nuestro laboratorio, esta tesis parte de la búsqueda en repositorios públicos como *Bloodspot* (Bagger et al., 2016), *Cancer Cell Line Encyclopedia* (Ghandi et al., 2019) y *Vizome database* (Tyner et al., 2018), de diferencias de expresión a nivel de ARNm entre moléculas clave para la biogénesis y la funcionalidad lisosomal. En esta búsqueda destacó el gen lisosomal *LAPTM4B*, el cual se encuentra sobreexpresado en varios tumores como cáncer hepatocelular, cáncer gástrico, cáncer de mama o cáncer de colon, y cuya proteína se considera un factor de mal pronóstico en muchos de estos casos (Y. Meng et al., 2016). Por otro lado, el gran interés sobre este gen radica en su presencia en las principales firmas génicas asociadas a **pacientes de LMA** (Metzeler et al., 2008), a **resistencia a citarabina** (Farge et al., 2017) y con ciertas **propiedades de células madre** en el contexto leucémico (**Figura 11**) (Ng et al., 2016).

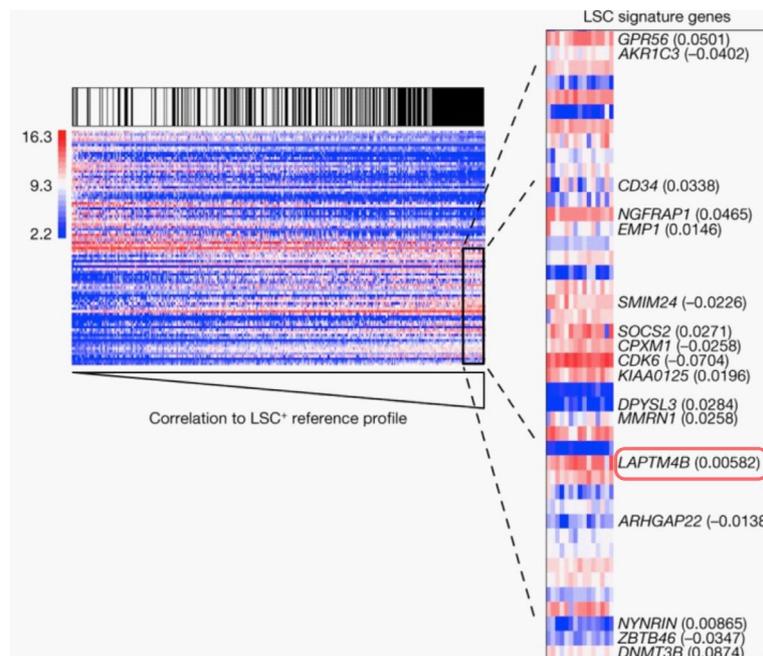


Figura 11. Lista de 17 genes con valor pronóstico y asociados a células madre leucémicas. (Ng et al., 2016).

4.2. Estudio de la familia LPTM en LMA

Tras la obtención de los resultados extraídos de las bases de datos, así como de la literatura apuntando a *LPTM4B* como gen relevante en LMA, se decidió estudiar en primer lugar, la expresión diferencial de *LPTM4B* junto con la de otros miembros de la familia LPTM, con el fin de validar su elección como gen de estudio.

4.2.1. Expresión de la familia LPTM en células hematopoyéticas sanas y neoplasias

Inicialmente, se evaluó la expresión de *LPTM4A*, *LPTM4B* y *LPTM5* mediante la base de datos pública de expresión génica R2: *Genomics Analysis and Visualization Platform* (hgserver1.amc.nl). Las sondas utilizadas para nuestros genes de interés fueron: 200673_at para *LPTM4A*, 214039_s_at, 208029_s_at y 208767_s_at usadas en conjunto para *LPTM4B* y 201721_s_at para *LPTM5*.

Como primer paso, quisimos determinar si existían diferencias de expresión entre los diferentes genes de la familia LPTM, comparando muestras sanas con muestras de pacientes de LMA. Para este supuesto, usamos la base de datos GSE13159, la cual contiene los datos obtenidos en el estudio MILE (*Microarray Innovations In Leukemia*) de la *European Leukemia Network* (ELN) (Haferlach et al., 2010; Kohlmann et al., 2008). Este estudio incluye más de 2000 muestras de sangre o médula ósea derivadas de pacientes con leucemia mieloide aguda en el momento del diagnóstico (Kohlmann et al., 2008) y analizadas mediante la tecnología *Affymetrix HG-U133 Plus 2.0 GeneChips*. De este primer análisis, no se obtuvieron diferencias significativas entre la expresión de *LPTM4B* en muestras de LMA frente a los controles sanos. En cambio, *LPTM4A* presentó un aumento significativo en la expresión de pacientes en comparación con individuos sanos y opuestamente, *LPTM5* mostró un descenso de la expresión en esta misma comparación (**Figura 12**).

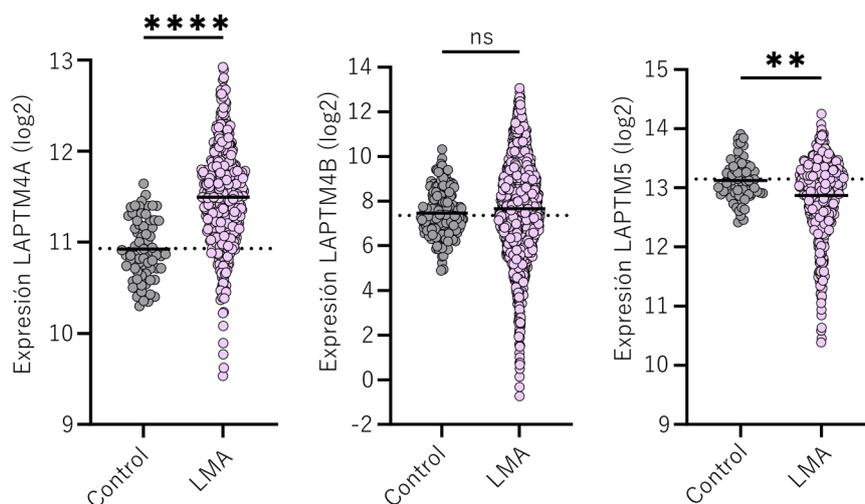


Figura 12. Expresión de la familia de genes *LAPTM* en muestras sanas o de pacientes de LMA. Expresión génica en células hematopoyéticas sanas (gris) y células de LMA (rosa) de *LAPTM4A*, *LAPTM4B* y *LAPTM5*. Cada punto indica el valor de expresión de un individuo (Log2) y la barra indica la media de todos los valores obtenidos de la base de datos GSE13159. ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$; ns, no significativo.

4.2.2. Expresión de la familia *LAPTM* en LMA asociada con mal pronóstico

Ante el hecho de no encontrar diferencias significativas en la expresión de *LAPTM4B* en pacientes frente a individuos sanos, decidimos explorar su expresión en el curso clínico de la enfermedad.

En primer lugar, evaluamos la tasa de supervivencia de pacientes con LMA en relación a la expresión de *LAPTM4A* (200673_at), *LAPTM4B* (214039_s_at) o *LAPTM5* (201721_s_at) (**Figura 13A**). Estos resultados se obtuvieron de la base de datos GSE37642, que contiene información de la expresión génica de 562 muestras de pacientes de LMA derivados del estudio AMLCG 1999 (Haferlach et al., 2004). Según podemos deducir de ellos, una mayor expresión de *LAPTM4B* estaría asociada con una menor supervivencia, mientras que no se observa este patrón en los casos de *LAPTM4A* o *LAPTM5*.

Dada la frecuencia y gravedad asociada a las recaídas en LMA (Medeiros, 2018; Thol & Ganser, 2020), así como, a la relación entre una mayor expresión de *LAPTM4B* con una menor supervivencia (**Figura 13A**), se procedió al análisis de la expresión

diferencial de todos los miembros de la familia LPTM en el contexto de las recaídas frente al momento del diagnóstico en muestras pareadas. Estos resultados se obtuvieron a partir de la base de datos GSE66525 y según el protocolo publicado por Hackl et al. (Hackl et al., 2015). De la misma forma que hemos observado en el caso de la supervivencia, únicamente se han detectado diferencias notables en *LPTM4B*. En concreto, se distingue un aumento de la expresión de este gen en el momento de las recaídas respecto al diagnóstico (**Figura 13B**). Por todo ello, *LPTM4B* sería el único miembro de la familia LPTM que tiene relación con la supervivencia y las recaídas, aunque no se encuentre sobreexpresado de forma general en LMA.

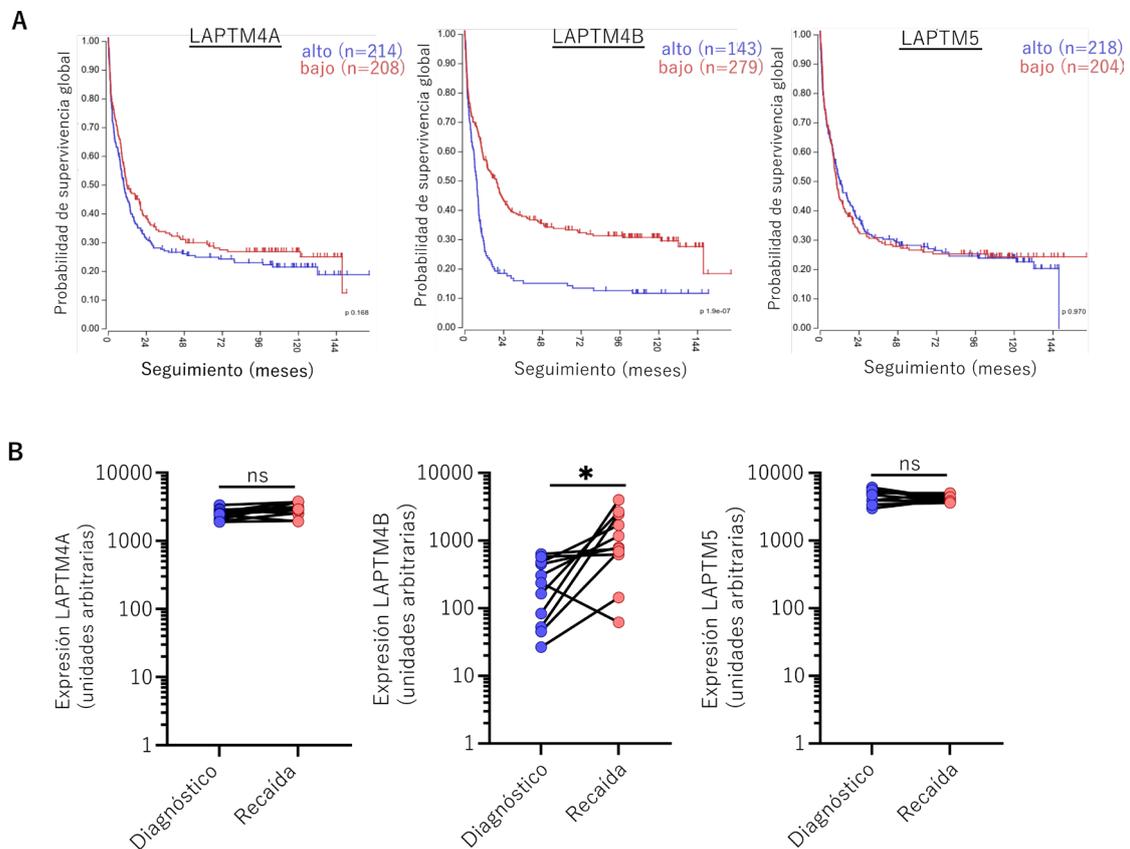


Figura 13. Una alta expresión de *LPTM4B* disminuye la supervivencia y se asocia con las recaídas en LMA. A) Curvas de supervivencia según la expresión superior (azul) o inferior (roja) a la media de LPTM4A, LPTM4B y LPTM5, respectivamente. **B)** Expresión de LPTM-4A, -4B y -5 en muestras pareadas en el momento del diagnóstico y en las recaídas, cada punto indica el valor de expresión de un individuo en unidades arbitrarias obtenidos de la base de datos GSE66525 (Hackl et al., 2015). * $p < 0,05$, ns, no significativo.

4.3. Estudio de LAPTM4B en LMA

Dado que nuestro principal interés residía en confirmar que LAPTM4B podría ser un buen candidato frente a LMA, y los datos previos lo sustentan en casos asociados a un peor pronóstico, los siguientes pasos consistieron en estudiar específicamente la expresión de LAPTM4B a diferentes niveles (*in silico*, para completar los estudios previos, e *in vitro*, tanto en líneas celulares de neoplasias como *ex vivo*) y en crear un modelo de estudio para evaluar la funcionalidad de LAPTM4B en LMA.

4.3.1. Expresión de LAPTM4B en células hematopoyéticas sanas y neoplasias

a) *In silico*

Debido a la heterogeneidad asociada a la LMA, comenzamos detallando su expresión en diferentes subtipos en base a sus características citogenéticas y ordenados de mejor a peor pronosis (Assaf et al., 2022; Estey, 2020; Pourrajab et al., 2020) (**Figura 14A**). Aunque a nivel global, expresando todos los tipos de LMA en conjunto, no se detectaba un cambio destacable en la expresión de *LAPTM4B* (**Figura 12**), al separar dichos subgrupos según la clasificación de la OMS vigente (Khoury et al., 2022), se observa una relación entre la pronosis asociada a cada subtipo y la expresión de *LAPTM4B*. La expresión de *LAPTM4B* es superior en aquellos casos con peor pronóstico e inferior en algunos de los grupos con mejores tasas de respuesta al tratamiento (**Figura 14A**). Cabe destacar que el caso de LMA con cariotipo complejo, generalmente asociado con una baja supervivencia (Schoch et al., 2005; Stölzel et al., 2016), es el subgrupo con mayor expresión de *LAPTM4B*. Del mismo modo que en el caso de las recaídas comentado en el apartado anterior, existe una correlación inversa entre la expresión de LAPTM4B y la supervivencia.

Seguidamente, para conceptualizar a LAPTM4B en un estado fisiológico ausente de enfermedad, se procedió a evaluar su expresión en células mieloides hematopoyéticas sanas obtenidas de la base de datos GSE24759 (Novershtern et al., 2011), la cual incluye datos de expresión de ARNm de 211 muestras derivadas de 38 poblaciones diferentes de células hematopoyéticas humanas. Este gráfico muestra

diferentes grupos de expresión de *LAPTM4B* (Figura 14B), donde las HSCs presentan la máxima expresión, seguidas del linaje megacariocítico y de los progenitores celulares. Mientras que las células maduras, tanto del linaje mieloide como del eritroide, muestran una baja expresión. En líneas generales, este resultado sugiere un aumento de la expresión de *LAPTM4B* en aquellas células menos diferenciadas, coincidiendo con la correlación negativa observada en otros trabajos entre la expresión de *LAPTM4B* y el estado de diferenciación de ciertos tumores como en hepatocarcinoma (Peng et al., 2005).

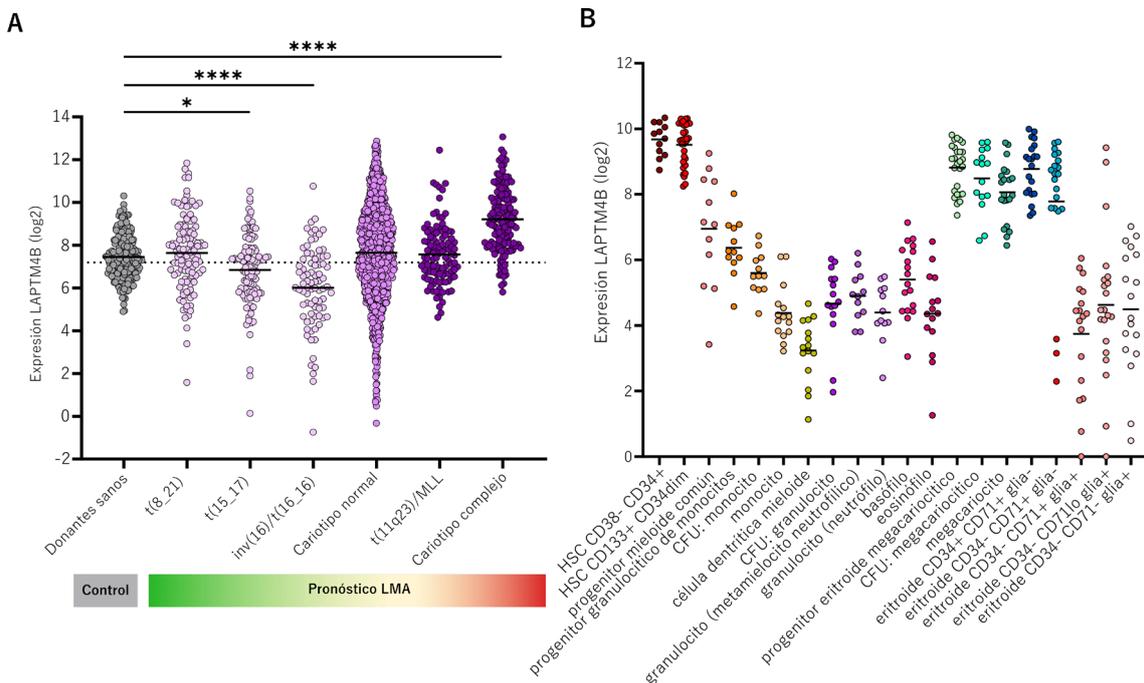


Figura 14. Una elevada expresión génica de LAPTM4B se asocia a LMA con cariotipo complejo y a células sanas poco diferenciadas. A) Expresión génica de LAPTM4B en células hematopoyéticas sanas (gris) y los diferentes subtipos de LMA ordenados de mejor a peor pronóstico según la clasificación citogenética (Estey, 2020; Pourrajab et al., 2020). * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$. **B)** Expresión de LAPTM4B en células mieloides sanas. Cada punto indica el valor de expresión de un individuo (Log2) y la barra indica la media de todos los valores obtenidos de la base de datos GSE13159 y GSE24759, respectivamente.

b) *In vitro*: muestras primarias

Una vez recopilados los datos bioinformáticos que justifican la elección de *LAPTM4B* como objeto de estudio por su posible relación con la LMA, tales como su alta expresión en pacientes con cariotipo complejo, en recaídas y en células sanas poco diferenciadas, consideramos continuar con estudios de caracterización *in vitro*.

En primer lugar, se consideró importante conocer el nivel de expresión de *LAPTM4B* en células hematopoyéticas derivadas de población sana y de pacientes de LMA. Con este fin, se usaron las técnicas de PCR semi-cuantitativa en tiempo real (RT-PCR), para medir la expresión derivada de la transcripción del gen (ARNm), y de Western blot, para evaluar el nivel de proteína. Aunque la evaluación de la expresión de *LAPTM4B* mediante citometría de flujo habría resultado de utilidad para nuestro estudio, no disponer de anticuerpos adecuados para ello nos impidió llevar a cabo este abordaje.

Para este primer estudio exploratorio por RT-PCR, se utilizaron dos parejas de cebadores distintas, una de ellas complementaria de la región de *LAPTM4B* específica de la isoforma larga (**Par 1 en Figura 15**) y otro par que hibrida con una región común para ambas isoformas (es decir, nos proporciona información de la isoforma corta y larga) (**Par 2 en Figura 15**) (Xie et al., 2017). Dado que la secuencia codificante de la isoforma corta es idéntica a la larga a excepción de unos 700 pares de bases en el extremo 5', no es posible diseñar cebadores específicos para la secuencia que codifica la proteína de 24 kDa. En líneas generales se sobreentiende que, la diferencia entre la expresión de la pareja de cebadores comunes menos la resultante de la pareja correspondiente a la isoforma larga indicaría la expresión de la isoforma corta (**Figura 15**).

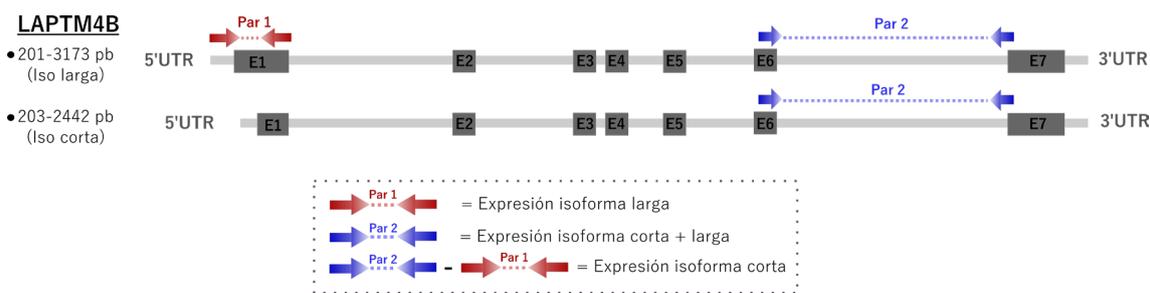


Figura 15. Esquema de la posición y amplificación de los cebadores utilizados para analizar la expresión de *LAPTM4B* por RT-PCR semi-cuantitativa.

El análisis de la expresión se realizó normalizando respecto al gen constitutivo *GAPDH* y los niveles obtenidos fueron muy heterogéneos. A pesar de la variabilidad encontrada, la expresión de *LAPTM4B* detectada por el par 2 (corta+larga) en LMA era similar a la muestra sana de referencia, aunque se observó

una ligera tendencia superior sin valor estadístico. Sin embargo, la expresión de la forma larga (par 1) es equiparable en ambas poblaciones (**Figura 16A**). Estos resultados sugieren que la forma corta está sobreexpresada en LMA, en comparación con las células sanas.

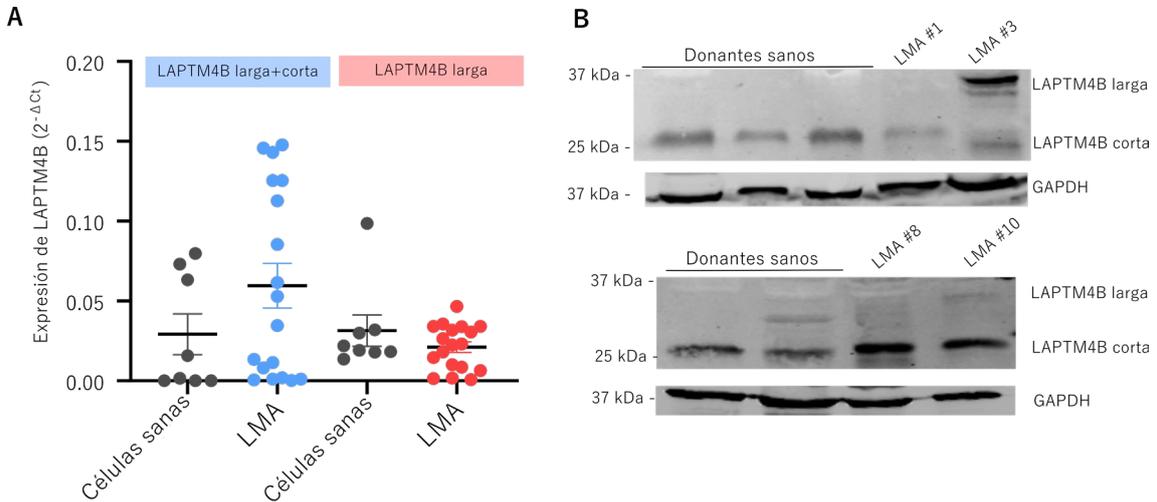


Figura 16. Las células de neoplasias hematológicas expresan niveles variables de *LAPT4B*, aunque con cierta tendencia de aumento de la isoforma corta a nivel transcripcional respecto a células sanas. **A)** Expresión de *LAPT4B* analizada mediante RT-PCR en muestras de donantes sanos (gris) en comparación con las células de LMA (azul, isoforma larga y corta; rojo, isoforma larga). La barra horizontal indica la media de todos los valores para cada caso \pm SEM. **B)** Western blot representativos con el anticuerpo de *LAPT4B* humano y GAPDH como control de carga.

Por otro lado, debido a que la unidad funcional es la proteína, quisimos analizar su expresión seleccionando algunas de las muestras primarias de LMA y células sanas sanguíneas. Mediante el uso de un anticuerpo específico para la región común de ambas proteínas, observamos bandas del tamaño esperado, 24 kDa y/o 35 kDa. Asimismo, se utilizó GAPDH como proteína de referencia. Resulta destacable mencionar la expresión ubicua encontrada en la isoforma corta (24 kDa), presente con diferentes niveles en la totalidad de muestras sanas y enfermas, frente a la ausencia de la proteína de 35 kDa en casi la mayoría de ellas (**Figura 16B**). La expresión proteica de las diferentes isoformas iría en concordancia con los datos derivados del análisis de ARNm, donde la isoforma corta se expresa asiduamente, aunque con diferente intensidad según la muestra, a diferencia de la larga, que parece tener una expresión mucho más limitada y no parece sobreexpresada en LMA.

c) *In vitro*: líneas celulares

Una vez contextualizada la expresión de LAPT_M4B en muestras primarias, usamos las mismas estrategias para dilucidar su expresión en líneas celulares de linaje mielóide, dado que éstas serán nuestra herramienta de estudio. Todas las líneas evaluadas corresponden a LMA o se comportan como tal, a excepción de K-562, clasificada como leucemia mielóide crónica (LMC) (**Figura 17A**). Respecto a la expresión de ARNm, se detectó gran variabilidad de unas líneas a otras, siendo K-562 y MM-1 las que presentan mayor expresión de *LAPT_M4B*, y U-937 y KG-1, las de menor expresión endógena. A nivel de proteína, los resultados muestran la ausencia de bandas del tamaño esperado, 24 kDa y/o 35 kDa, mientras que los niveles de la proteína de referencia GAPDH sirven como control de carga (**Figura 17B**). Es decir, parece que el nivel de la proteína LAPT_M4B está por debajo del nivel de detección de esta técnica/anticuerpo o bien que dicha proteína no se expresa en las líneas celulares estudiadas.

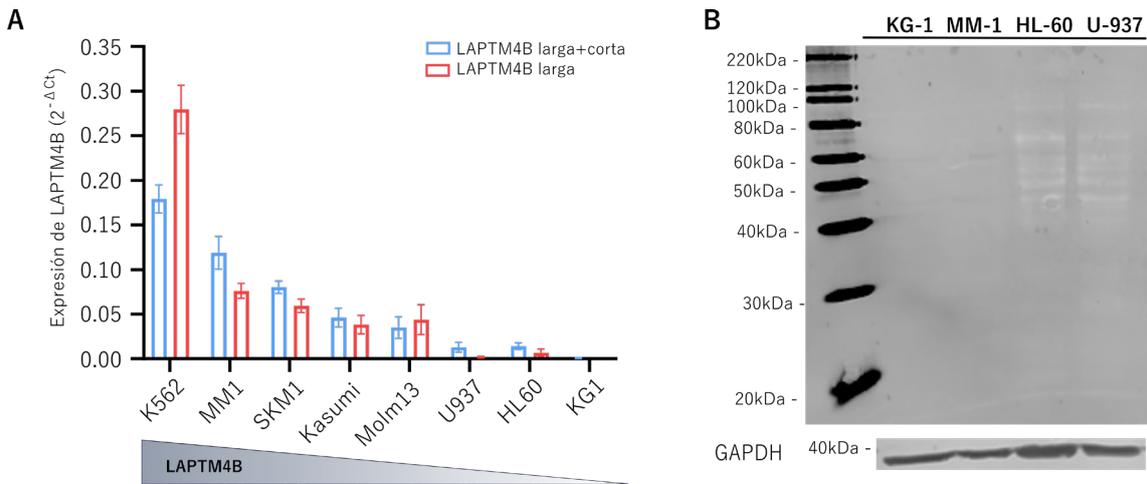


Figura 17. Expresión de LAPT_M4B en líneas celulares de neoplasias hematológicas. A) Expresión génica de las isoformas larga+corta (azul) o la isoforma larga (rojo) y respecto al gen normalizador GAPDH, cada barra representa la media de triplicados de tres experimentos independientes \pm SEM. **B)** Western blot representativo de las líneas celulares KG-1, MM-1, HL-60 y U-937, con el anticuerpo específico de LAPT_M4B y GAPDH como control de carga.

4.3.1.1. Generación de líneas celulares con sobreexpresión de LAPT_M4B

Aunque existe una alta heterogeneidad en cuanto a la expresión de *LAPT_M4B* tanto en muestra primarias como en líneas celulares de LMA, se aprecia una tendencia a

su sobreexpresión a nivel de ARNm en LMA. De acuerdo con los datos clínicos de expresión génica asociada a pronóstico, en conjunto con estas primeras comprobaciones, se decidió evaluar la importancia de LAPTM4B mediante estudios de pérdida y ganancia de función en líneas celulares.

En primer lugar, para poder explorar y caracterizar detalladamente ambas isoformas, se procedió a la generación de un modelo de estudio con sobreexpresión ectópica y constitutiva de LAPTM4B, para su isoforma larga o corta. Este procedimiento se realizó por transducción lentiviral de líneas celulares de LMA, HL-60, MonoMac-1, U-937, KG-1, SKM-1, Molm-13 y la línea de LMC, K-562 con las dos isoformas de LAPTM4B fusionadas a la proteína fluorescente *Emerald*, con el fin de poder validar la transducción y localizar la proteína diana. Es importante mencionar que las líneas ampliamente utilizadas en este trabajo fueron las de: HL-60 (línea con maduración FAB M2), MonoMac-1 (leucemia monocítica FAB M5) y U-937 (línea derivada de linfoma histocítico difuso, por su morfología y comportamiento monocítico se utiliza como modelo de LMA), dado que por sus características consideramos que representaban la heterogeneidad descrita en LMA.

Para la comprobación de la infección lentiviral de las células de interés, se empleó la citometría de flujo por la posibilidad de detectar la fluorescencia emitida por la proteína *Emerald*. La eficiencia de la transducción fue muy alta para todos los casos (>90%), como se puede apreciar en este histograma representativo para HL-60, MM-1 y U-937 (**Figura 18**).

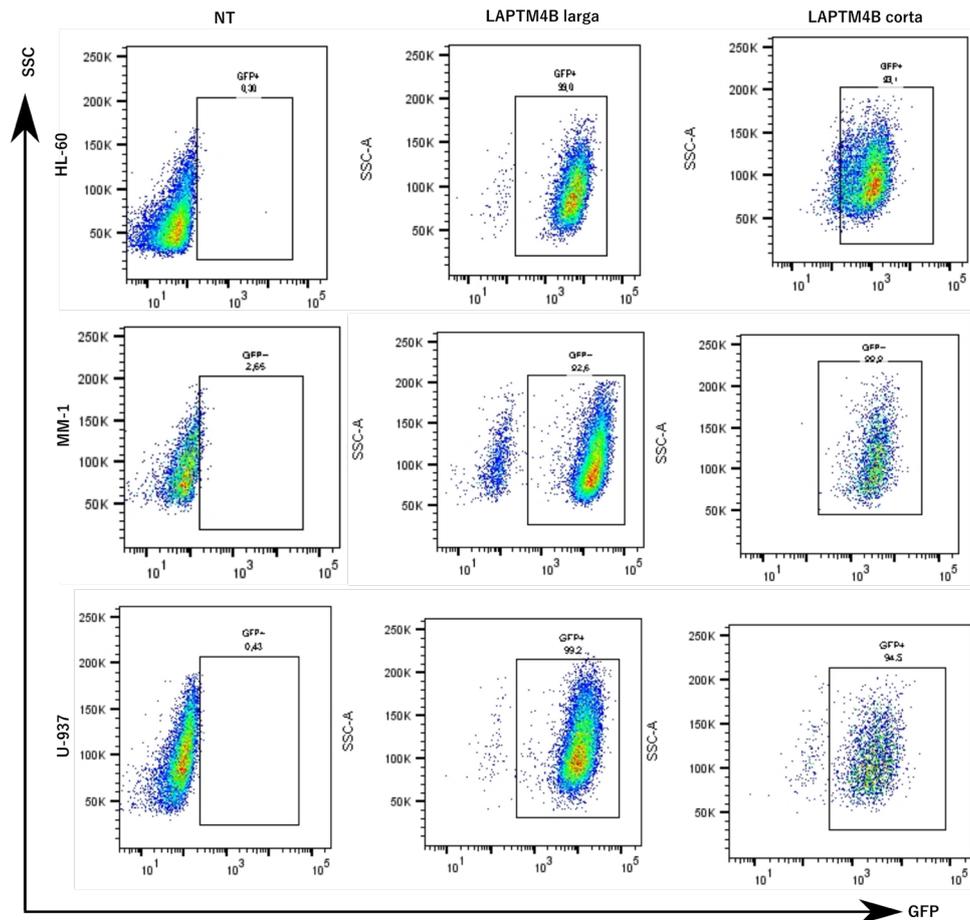


Figura 18. Comprobación de las transducciones de *Emerald-LAPTM4B* mediante citometría de flujo. Porcentaje de células GFP+ correspondientes a las transducidas con Emerald, histograma representativo para tres líneas celulares de LMA: HL-60, MM-1 y U-937.

Del mismo modo en que se analizó la expresión por RT-PCR y mediante Western blot en muestras humanas, se confirmó la sobreexpresión génica y proteica de LAPTM4B en las líneas celulares evaluadas (**Figura 19A**). A nivel proteico, se debe destacar que el tamaño de las proteínas detectado por el anticuerpo anti-LAPTM4B, corresponde al tamaño de la isoforma corta o larga de LAPTM4B (24 kDa y 35 kDa), más el tamaño correspondiente a la proteína de fusión verde fluorescente *Emerald* (27 kDa), por ello se esperan bandas de 51 o 62 kDa respectivamente, en las líneas transducidas. En cambio, las células control presentarán el tamaño estándar de las isoformas (24 kDa y 35 kDa) puesto que no están transducidas o lo están con el vector vacío (**Figura 19B**). Pese a ello, se detectaron también bandas a 24 o 35 kDa en las líneas transducidas, que podrían corresponder a las proteínas endógenas debido a un mecanismo de inducción mediado por la transducción no conocido o

por la escisión de la proteína sobreexpresada, que se habría separado de la proteína *Emerald*.

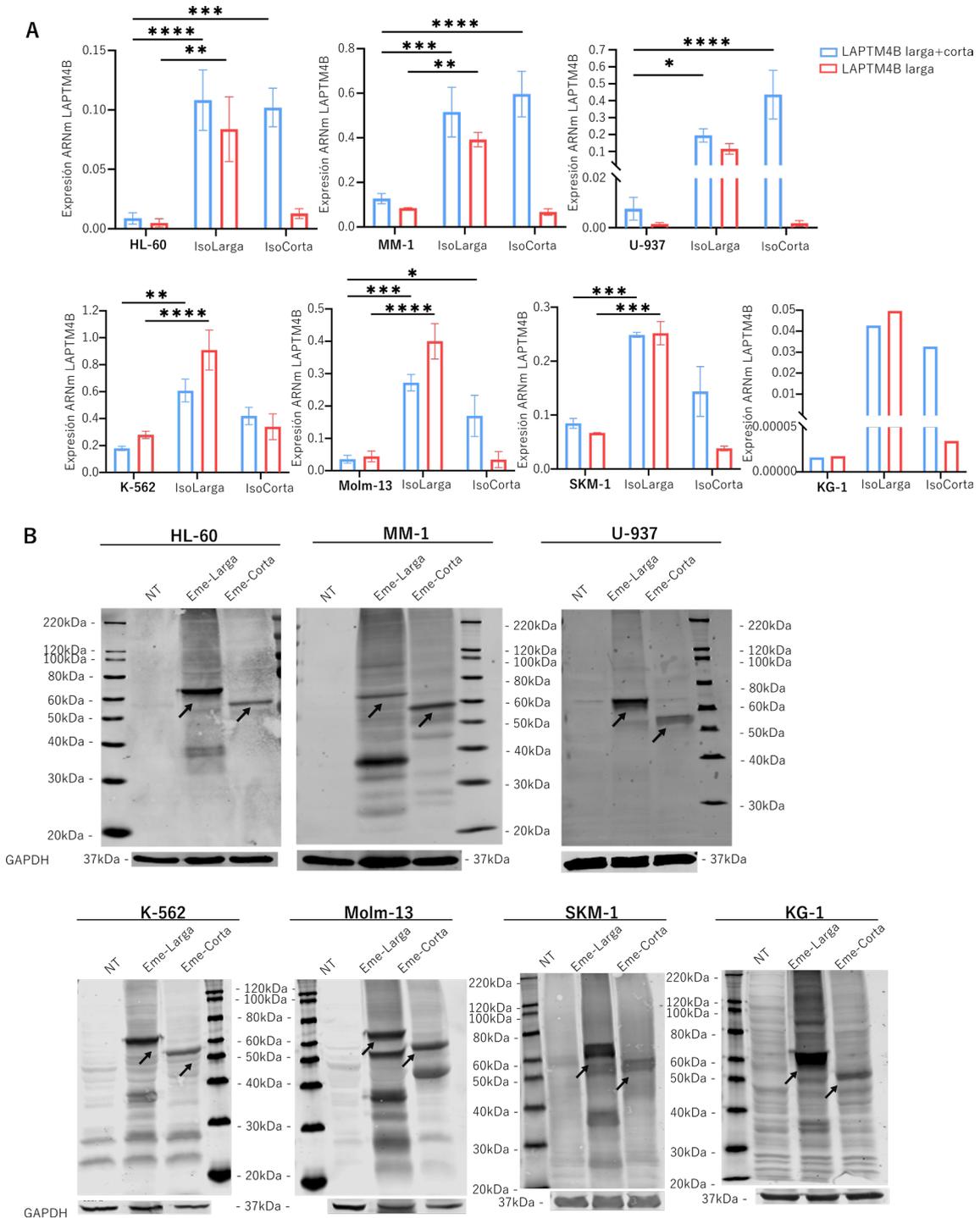


Figura 19. Validación de la expresión de las formas de LAPT4B en las células transducidas. A) Expresión génica de las diferentes isoformas transducidas analizada por RT-PCR semi-cuantitativa. **B)** Determinación de la presencia de las diferentes isoformas de LAPT4B mediante Western blot en las diferentes líneas celulares con GAPDH como control de carga. Los gráficos de barras indican la media de expresión génica de tres réplicas de tres experimentos independientes \pm SEM respecto

al gen de referencia GAPDH. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. NT: no transducido, IsoLarga: isoforma larga, IsoCorta: isoforma corta, Eme: Emerald.

Como se puede observar en los datos derivados de estas comprobaciones, tanto a nivel génico como a nivel de proteína, la expresión de LAPTM4B, larga o corta, ha incrementado notablemente en todas las líneas celulares.

Por último, se realizaron inmunofluorescencias para obtener información acerca de la localización y del patrón de distribución de la proteína LAPTM4B. Para dichas inmunofluorescencias se empleó el anticuerpo específico frente a LAPTM4B, junto con la detección de la fluorescencia emitida por *Emerald*, para poder determinar si existía colocalización entre la proteína sobreexpresada y la endógena. De la misma forma, se realizaron inmunofluorescencias de LAMP1 como marcador lisosomal (Baba et al., 2020).

En este caso, las líneas evaluadas por inmunofluorescencia fueron HL-60 y SKM-1 representando diferentes subtipos de LMA (M2 y M5, respectivamente). En ellas, se puede observar una localización similar entre el LAPTM4B endógeno y el expresado ectópicamente en ambas líneas celulares. Igualmente, el patrón de expresión de LAPTM4B coincide con el de LAMP1, lo que sugiere su localización en lisosomas, aunque también se encuentra en otras localizaciones subcelulares. En cuanto a la expresión de las diferentes isoformas, podemos concluir que la isoforma larga presenta una distribución más amplia, puesto que se expresa tanto en los lisosomas como en la membrana plasmática. Por otro lado, la isoforma corta aparece como una señal más débil, más concreta y restringida a los lisosomas (**Figura 20**).

Estas células se trataron con cloroquina como control positivo, debido a que este compuesto antimalárico es conocido por ser un agente lisosomotrópico que bloquea el proceso de autofagia, aumenta el pH lisosomal y provoca un aumento de tamaño de los lisosomas (Fedele & Proud, 2020; Mauthe et al., 2018; Yoon et al., 2010). Al tratar con este compuesto, se observó un cambio de patrón en la distribución de LAPTM4B, siendo más evidente su expresión en zonas concretas de las células transducidas, sobre todo en las células con sobreexpresión de la isoforma corta (**Figura 21**).

Con estos resultados podemos confirmar la localización de ambas isoformas de LAPTM4B en los lisosomas, aunque la isoforma larga podría encontrarse también en la membrana celular. Asimismo, la adición de cloroquina provoca una concentración de nuestra proteína de interés en los lisosomas, de forma más patente en el caso de la isoforma corta.

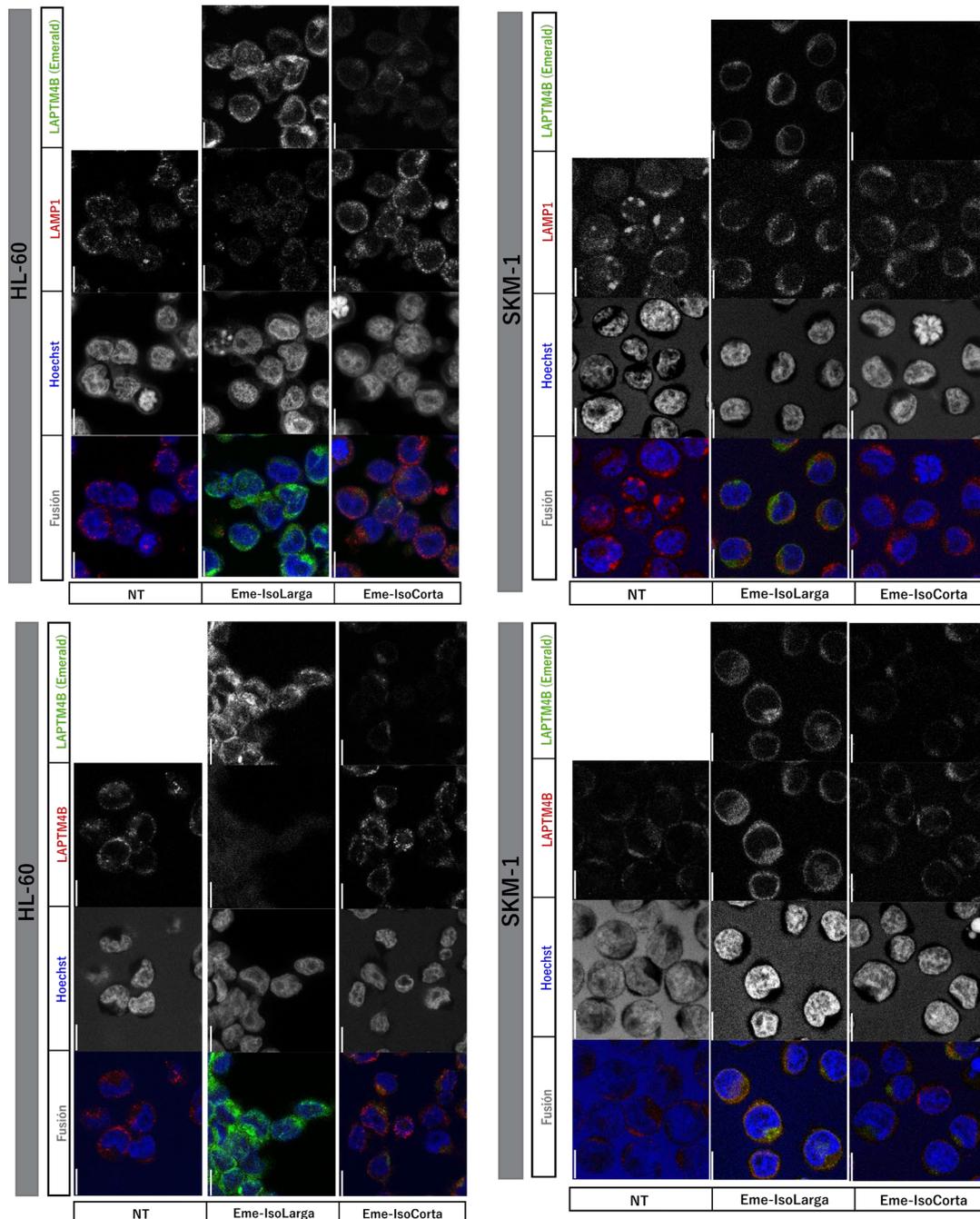


Figura 20. Validación de la transducción y localización de las isoformas de LAPTM4B. Expresión de LAPTM4B o LAMP1 detectada por inmunofluorescencia en HL-60 y SKM-1 transducidas con Emerald-LAPTM4B largo/corto (verde). Las barras de escala corresponden a 10 μ m.

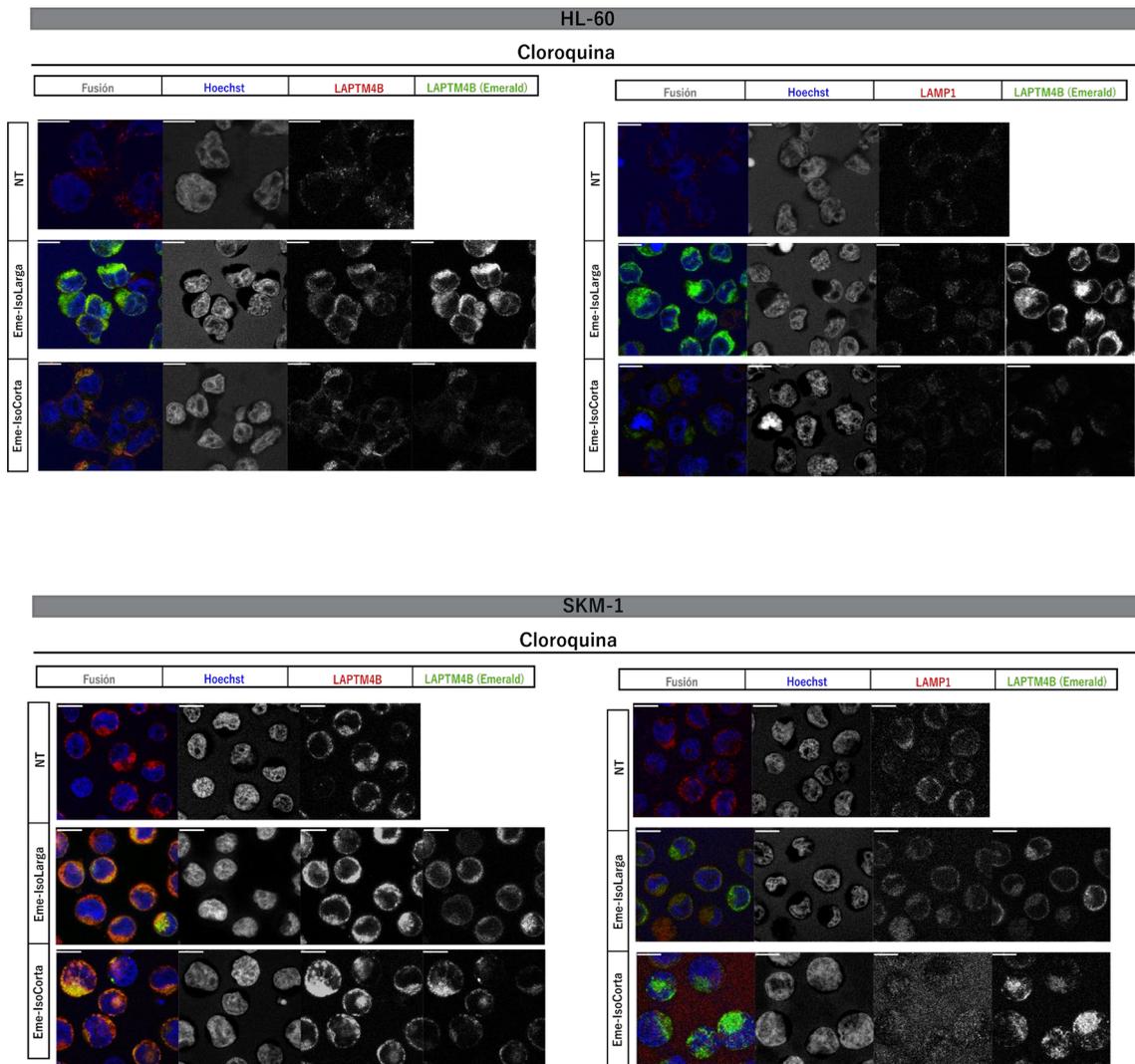


Figura 21. El tratamiento con cloroquina produce una concentración de LAPTM4B en puntos más discretos. Expresión de LAPTM4B o LAMP1 detectada por inmunofluorescencia en HL-60 y SKM-1 transducidas con Emerald-LAPTM4B largo/corto (verde) y tratadas 24h con cloroquina 20 μ M. Las barras de escala corresponden a 10 μ m.

4.4. Caracterización de LAPTM4B en LMA

Una vez validada la eficacia de la transducción de ambas isoformas, se iniciaron los estudios orientados a determinar la localización y funcionalidad de LAPTM4B en el contexto leucémico.

4.4.1. Evaluación del compartimento lisosomal

Como hemos visto anteriormente, los lisosomas en el contexto leucémico presentan características particulares (Sukhai et al., 2013) asociadas a una mayor fragilidad y sensibilidad a muerte celular (Cornet-Masana et al., 2019; Jain et al., 2022; Rafiq et al., 2021). Puesto que nuestro objeto de estudio es un gen lisosomal y su proteína se expresa en la membrana de estos orgánulos, quisimos evaluar si LAPTM4B estaba implicado en los fenómenos descritos anteriormente. Así como, si existía un fenotipo específico para cada isoforma.

Para poder estudiar este compartimento, se empleó la sonda *LysoTracker Deep Red* (*LTR Deep Red*) para la evaluación de la posición, cantidad y tamaño lisosomal en las células HL-60, MM-1 y U-937. La citometría de flujo permite detectar cambios en términos de contenido lisosomal, pero no en su distribución. Mediante esta técnica, los resultados obtenidos no revelaron cambios significativos en condiciones basales entre células no transducidas (NT) y células transducidas con la isoforma larga o corta de LAPTM4B. De la misma forma, tampoco se apreciaron cambios diferenciales entre las dos isoformas. En concordancia con lo esperado para el tratamiento con el control positivo, se detectó un aumento en la masa lisosomal en todas las líneas celulares tratadas con cloroquina, sin la detección de diferencias significativas entre las células control y las transducidas, ni tampoco entre las diferentes isoformas de LAPTM4B (**Figura 22A**).

Dado que los lisosomas pueden mediar la quimiorresistencia (Cuesta-Casanovas et al., 2022) y la citarabina es el fármaco más recurrente en LMA, quisimos evaluar cómo dicho tratamiento afectaba a estos orgánulos y si se daban diferencias en aquellas células con sobreexpresión de LAPTM4B.

En primer lugar, la línea celular HL-60 mostró un incremento de masa lisosomal en todos los tipos celulares, mientras que en MM-1 y en U-937 los cambios no fueron notables probablemente por su fenotipo resistente a dicho fármaco. De nuevo, el tratamiento con citarabina no originó diferencias obvias entre controles y transducidas, ni entre las dos isoformas de LAPTM4B (**Figura 22A**).

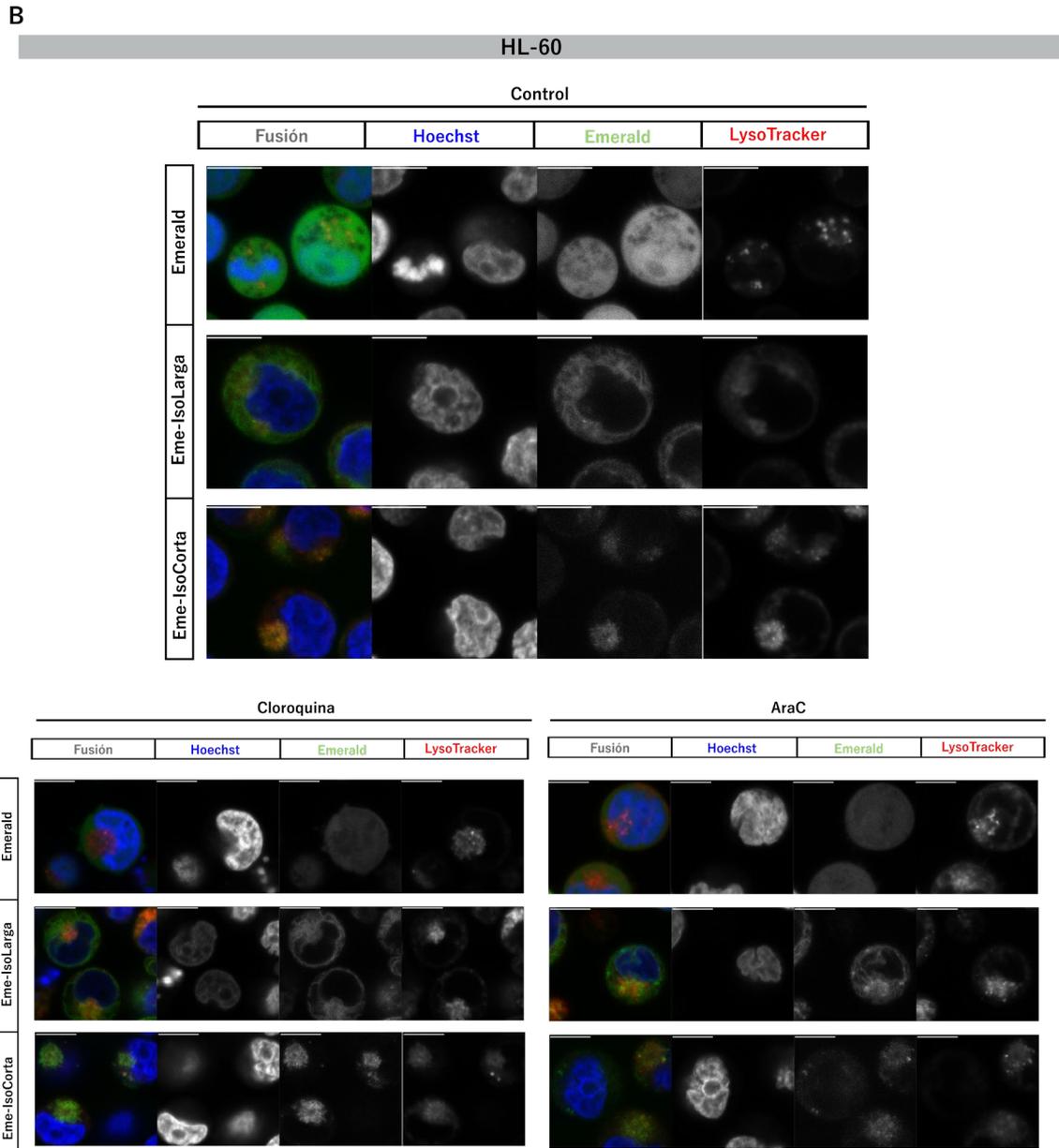
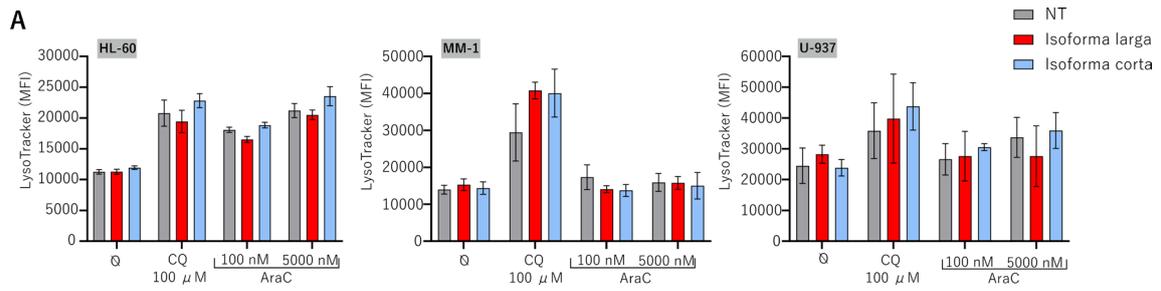
En paralelo, la evaluación del *LTR Deep Red* mediante microscopía confocal nos permitió ahondar en las sutiles diferencias observadas por citometría. Como nos indica la **Figura 22B**, en ausencia de tratamiento no se apreciaron diferencias notorias entre la intensidad de la señal del *LTR* comparando las células sin transducir con las transducidas, en ninguna de las dos líneas testadas. Sin embargo, se puede intuir un cambio en la posición lisosomal, de más perinuclear a más periférico en las células transducidas con ambas isoformas de LAPTM4B en la línea celular HL-60 frente a las parentales. Respecto a las células transducidas, se detectó una amplia co-localización entre los lisosomas detectados por *LTR* y LAPTM4B, confirmando una vez más la localización de nuestra proteína de interés en estos orgánulos.

Mientras que, al tratar con cloroquina la señal se acumula con mayor intensidad en puntos localizados pudiendo corresponder con el aumento de volumen lisosomal descrito mediante citometría (**Figura 22A**). Aunque dicho efecto ocurre en todos los subtipos celulares, parece que las células que expresan ectópicamente LAPTM4B son más sensibles al tratamiento con cloroquina que las parentales, sobre todo, visible en las células MM-1 (**Figura 22B**). Además, este efecto se detecta especialmente en la isoforma corta, como observamos en las inmunofluorescencias de la sección anterior (**Figura 21**). En estas imágenes se aprecia cómo la isoforma corta de LAPTM4B pasa de un patrón difuso, a uno punteado, más concreto y de mayor volumen en la línea MM-1 tras el tratamiento con cloroquina (**Figura 22B**).

Por otro lado, la citarabina provocó efectos heterogéneos en estas células. En las células HL-60 este tratamiento produjo un fenotipo similar al de la cloroquina, agrupando la señal *LTR*. Contrariamente, en la línea MM-1, este patrón fue

indetectable y la distribución e intensidad de la sonda fue similar al de las células sin tratar, una vez más atribuible a su baja sensibilidad al fármaco. Respecto a ambas isoformas de LAPTM4B, no se pudo determinar ninguna diferencia ante el tratamiento con citarabina (**Figura 22B**).

Con todo ello podemos esclarecer que, aunque LAPTM4B no induciría un aumento lisosomal en condiciones basales, el tratamiento con cloroquina podría tener mayores efectos en las células transducidas que en las parentales y particularmente, más notables en la isoforma corta de LAPTM4B. Asimismo, el efecto de la citarabina dependerá de la sensibilidad asociada a cada tipo celular, como hemos podido observar mediante estas dos aproximaciones experimentales. Finalmente, estudiar la localización de los lisosomas en procesos tumorales podría ser relevante (Cabukusta & Neefjes, 2018), ya que una distribución periférica, como la detectada en las células HL-60 transducidas, se asocia con procesos de invasión, metástasis y crecimiento celular (Machado et al., 2021; Nishimura et al., 1998; T. Tang et al., 2020), aunque debido al gran tamaño nuclear de las líneas celulares de LMA no ha sido posible observar en detalle este efecto.



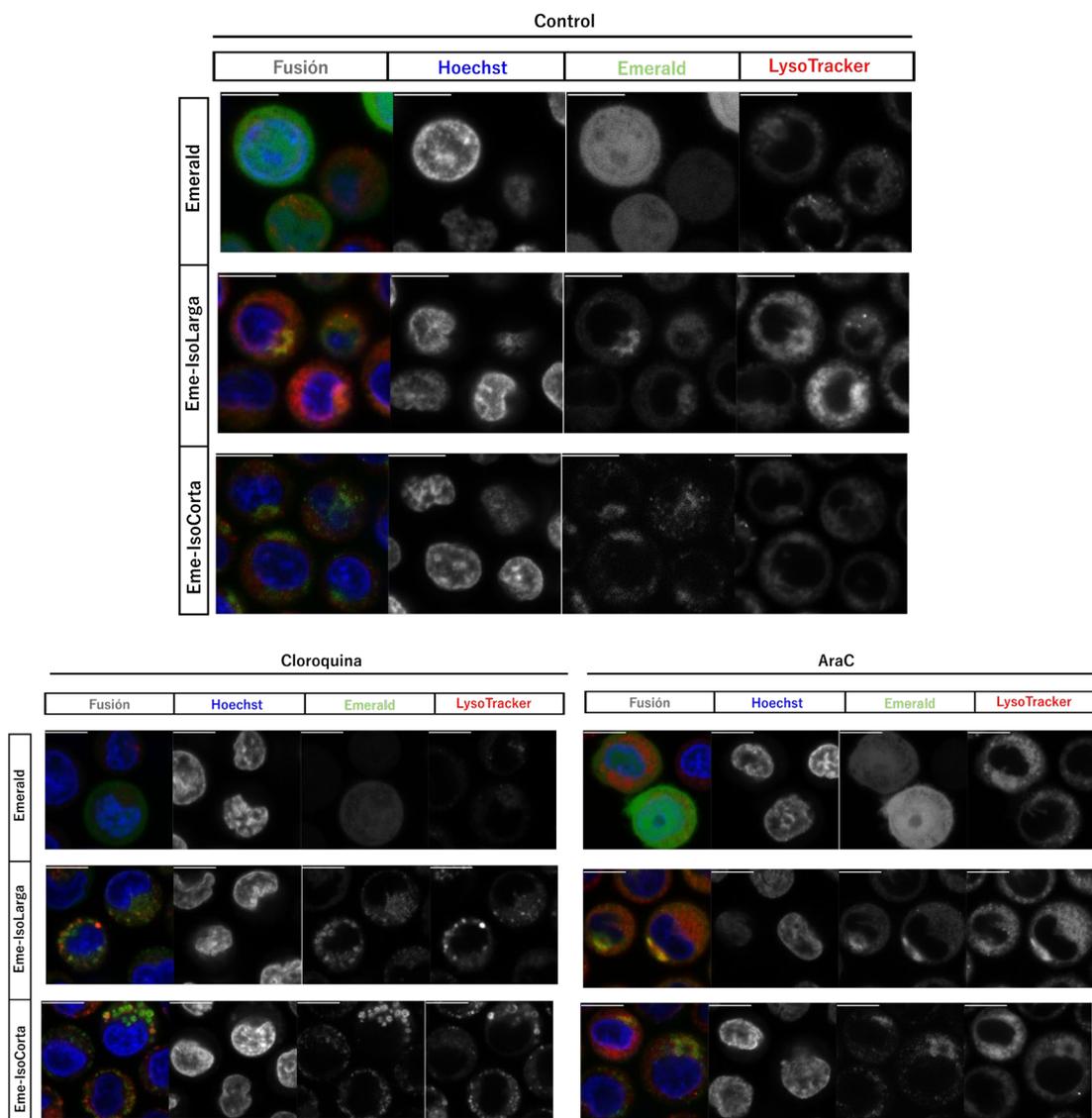


Figura 22. La cloroquina induce un aumento tanto de la masa lisosomal en líneas de LMA, así como de LAPT4B cuando se encuentra expresado ectópicamente. **A)** Las células transducidas con las distintas formas de LAPT4B, larga (rojo) o corta (azul) se trataron 24h con cloroquina 100 μ M, AraC 100nM o AraC 5000nM y se analizó la masa lisosomal mediante tinción con *LTR Deep Red*. Las barras representan la media \pm SEM de tres experimentos independientes. **B)** Las células HL-60 y MM-1 (transducidas con *Emerald*, *Emerald-IsoLarga*, *Emerald-IsoCorta*) se trataron durante 24h con cloroquina 20 μ M o AraC 25nM, se tiñeron con *LTR Deep Red* (lisosomas) y *Hoechst* (núcleo), y se observaron en vivo con un microscopio confocal. Las barras de escala corresponden a 10 μ m.

4.4.2. Implicación de LAPT_{M4B} en la función lisosomal

- **Biogénesis lisosomal**

Continuando con la evaluación de cada una de las isoformas de *LAPT_{M4B}* en la expresión génica asociada a los lisosomas, el estudio de TFEB resultaba imprescindible.

TFEB es el principal regulador transcripcional en la síntesis de lisosomas. En condiciones normales, se encuentra fosforilado en el citoplasma. Dicha fosforilación es dependiente de la disponibilidad de nutrientes y se produce por mTORC1 en la membrana lisosomal. En cambio, en condiciones adversas es desfosforilado por MCOLN1 y se transloca al núcleo donde se encarga de la regulación de la transcripción de genes implicados en la biogénesis lisosomal mediante la activación de la red CLEAR. Asimismo, TFEB también participa en la modulación de la autofagia, de la exocitosis lisosomal y en algunas de las vías de degradación de moléculas (Bala & Szabo, 2018; Settembre et al., 2011; Zhitomirsky & Assaraf, 2017).

Para analizar la actividad de TFEB en las formas transducidas con LAPT_{M4B}, se utilizó un ensayo de ensayo de señalización por luciferasa. Los resultados derivados de dicho estudio nos muestran la ausencia de diferencias significativas en la activación transcripcional basal de las células transfectadas con LAPT_{M4B} respecto al control. Igualmente, ambas isoformas de LAPT_{M4B} mostraron una actividad transcripcional análoga entre ellas (**Figura 23A**).

Sin embargo, al tratar con cloroquina se indujo significativamente la actividad transcripcional en las células con sobreexpresión de LAPT_{M4B}, mientras que en las células control este aumento no fue significativo. Entre las dos isoformas de LAPT_{M4B} tampoco se detectaron diferencias significativas en su inducción post tratamiento (**Figura 23A**).

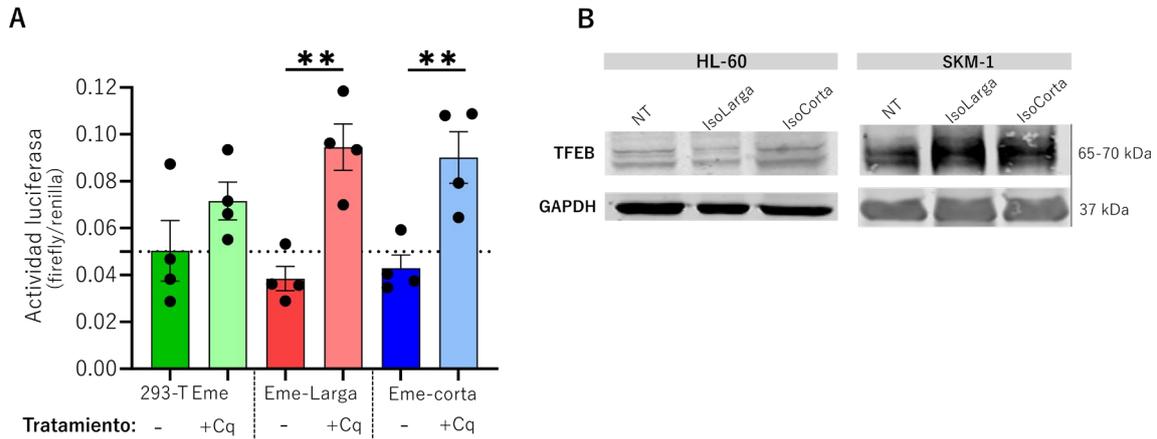


Figura 23. La expresión ectópica de LAPT4B incrementa la actividad de TFEB en respuesta a cloroquina. A) Las células HEK-293T se cotransfectaron con el vector con Emerald (pCDH-Emerald) o con pCDH-Emerald-LAPT4B (isoforma larga o corta), junto con el vector reportero TFEB para detectar la señalización activada. La actividad luciferasa se muestra como una ratio de luciferasa/renilla y se evaluó en condiciones basales o tras el tratamiento de cloroquina 20µm durante 24h. **B)** Expresión de TFEB mediante Western blot hibridando con anticuerpos específicos de LAPT4B y GAPDH como control de carga. La media de la ratio luciferasa/renilla de triplicados de cuatro experimentos independientes, donde cada punto es el valor de la media de cada experimento ± SEM, ha sido indicado mediante las barras. **p<0,01.

Con el fin de evaluar TFEB a nivel proteico y basal en LMA, se realizaron Western blot. A pesar de que a nivel basal no habíamos detectado diferencias en la actividad de este factor de transcripción (**Figura 23A**), según podemos observar en la **Figura 23B**, parece darse un ligero aumento en la cantidad de TFEB en las células HL-60 transducidas con la isoforma corta y en las células SKM-1 transducidas con ambas isoformas de LAPT4B. Aunque dicho efecto es muy limitado y por tanto, no podríamos descartar que fuera un efecto clonal.

En conclusión, aunque LAPT4B no genera cambios en la actividad transcripcional de TFEB en estado basal, ante la presión impuesta por la cloroquina podría potenciar la transcripción de genes relacionados con biogénesis lisosomal a través de TFEB.

- **Exocitosis**

Debido a la falta de certeza derivada de los resultados anteriores, decidimos profundizar en otros aspectos ligados a la actividad lisosomal, como su relación con el calcio y la exocitosis.

Los lisosomas son grandes almacenes de calcio y participan en algunas de sus vías de señalización. Asimismo, el calcio intracelular parece jugar un importante papel en la regulación de la autofagia y en procesos asociados con la reconstrucción de las membranas celulares. Del mismo modo, la calcineurina estaría involucrada en la traslocación de TFEB al núcleo (Medina, 2021; Medina et al., 2015).

Para evaluar la relación entre LAPTM4B y el calcio lisosomal, medimos la concentración intracelular de calcio mediante la prueba radiométrica Fura2-AM en las líneas celulares HL-60, MM-1 y U-937. En los resultados obtenidos podemos observar un aumento de calcio intracelular a lo largo del tiempo en todas las líneas celulares. En concreto, la línea HL-60 fue la que más incrementó la concentración de calcio durante el experimento, asimismo, fue la única línea en la que las células sin transducir presentaron mayores cantidades de Ca^{2+} , en términos absolutos, que las transducidas. En este caso, no se observaron diferencias entre las isoformas de LAPTM4B. Al tratar con ionomicina, las HL-60 parentales mantuvieron una mayor concentración de Ca^{2+} a tiempo 0, 15' y 45' y de nuevo, las transducidas presentaron cantidades absolutas equitativas (**Figura 24A**).

En las células MM-1 sin tratar pudimos apreciar que a pesar de que las células con expresión ectópica de LAPTM4B partieron de una cantidad mayor de Ca^{2+} intracelular que las no transducidas, al final del experimento los valores fueron similares, asumiendo un mayor incremento en la concentración para las células no transducidas. Tras el tratamiento con el control positivo, las células sin transducir fueron las que perdieron el calcio intracelular con mayor velocidad. Entre las transducidas, la isoforma corta se indujo más que la larga en tiempo 0, pero ambas acabaron con valores similares (**Figura 24A**).

Por último, a nivel basal las células U-937 NT y las transducidas mostraron valores muy similares a lo largo del tiempo. Sin embargo, bajo el tratamiento de ionomicina las células control incrementaron ligeramente su cantidad de calcio en todos los puntos de medición en comparación con las transducidas, donde ambas isoformas fueron similares.

Respecto a la inducción en la entrada de calcio por el control positivo, podemos observar que a los 15 minutos del experimento no existen diferencias significativas entre las líneas parentales y las transducidas en el caso de HL-60 y U-937, así como tampoco las hay entre ambas isoformas de LAPTM4B. En cambio, en las células MM-1 transducidas se observó un pequeño aumento en la inducción de Ca^{2+} en comparación con las no transducidas, sin diferencias entre la isoforma corta o larga (Figura 24B).

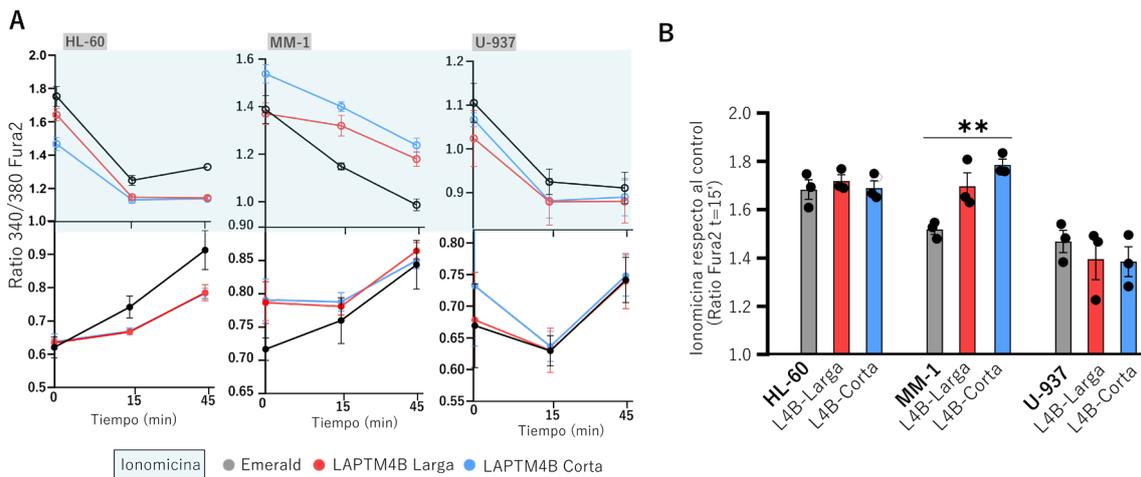


Figura 24. LAPTM4B no ejerce ningún efecto diferencial en la concentración de calcio intracelular. Cuantificación de calcio libre intracelular mediante tinción con Fura2-AM en las células HL-60, MM-1 y U-937 transducidas únicamente con Emerald o con las construcciones LAPTM4B (largo y corto), en estado basal o tratadas con ionomicina $1\mu\text{M}$ (cuadro azul). **A)** Se midió la fluorescencia en diferentes puntos y se representó la ratio 340/380 de 3 réplicas independientes. **B)** Representación de la inducción de la ionomicina a los 15 minutos, respecto al control sin tratar. Las barras representan la media de tres experimentos independientes \pm SEM; cada punto representa un experimento. $**p < 0,01$

De este experimento se dedujo que, a nivel basal LAPTM4B no genera cambios en la concentración de calcio lisosomal a comparación de las células parentales, ni tampoco entre las diferentes isoformas. La ionomicina causó la entrada de calcio a tiempo 0 y fue disminuyendo a medida que aumentaba el tiempo en todas las líneas, como se esperaba. Del mismo modo, la inducción en la entrada de calcio promovida por la ionomicina fue similar a los 15' para las células no transducidas y para aquellas con expresión ectópica de la isoforma corta o larga de LAPTM4B, en el caso de HL-60 y U-937. Mientras que dicha inducción, resultó significativamente superior en el caso de ambas isoformas de LAPTM4B en MM-1 respecto a su control. Tampoco se detectaron cambios entre las diferentes isoformas en este caso (Figura

24B). Estos cambios sutiles no resultaron consistentes al ser diferentes de unas líneas a otras, por lo que una alta expresión de LAPTM4B no tendría repercusión en la movilización de calcio hacia los lisosomas.

- **Autofagia**

Dado que la autofagia es un proceso altamente regulado por los lisosomas y que las evidencias descritas en la literatura señalan la función moduladora de LAPTM4B en dicho proceso (Ji et al., 2022; Y. Li et al., 2012; F. Wang et al., 2019), resultaba de interés para nuestro trabajo estudiar esta relación en el contexto leucémico.

Una de las proteínas clave en autofagia es LC3 perteneciente a la familia Atg8/LC3 (Lee & Lee, 2016). Aunque dentro de esta familia existen diferentes proteínas LC3 (LC3A, LC3B y LC3C), en nuestro caso únicamente nos referiremos al subtipo LC3B por ser el más estudiado hasta la fecha (H. J. Hwang et al., 2022; Koukourakis et al., 2015). Esta proteína se encuentra en su forma LC3B-I en el citosol, y se conjugará para formar LC3B-II durante la activación de la autofagia, en ese momento será reclutada en la membrana de los autofagosomas (Tanida et al., 2008).

En primer lugar, se procedió a la evaluación de LC3B por estudios de inmunofluorescencia. En ellos se emplearon las células HL-60 y SKM-1 en estado basal o tratadas con cloroquina. La cloroquina inhibe la autofagia impidiendo la fusión entre autofagosomas y lisosomas (Mauthe et al., 2018).

Como se puede apreciar en estas imágenes, las células HL-60 transducidas con LAPTM4B presentan un aumento de LC3B, sobre todo en aquellas células que sobreexpresan la isoforma corta. Contrariamente, en la línea SKM-1 el nivel basal de LC3B es muy elevado en las células control (se aprecian grandes puntos rojos) comparado con las transducidas, que presentan una señal débil y semejante entre ellas (**Figura 25A**).

Al tratar con cloroquina, las células respondieron de diferentes maneras. En el caso de las HL-60 parentales, no se apreciaron diferencias respecto a su estado basal. En cambio, las células HL-60 transducidas mostraron un patrón más difuso y con

menor localización lisosomal de LC3B ante el tratamiento. En las células SKM-1 la cloroquina redujo la señal de LC3B en las células sin transducir, posiblemente por el bloqueo de la autofagia, mientras que, las células transducidas incrementaron LC3B, de forma más patente en la isoforma corta (**Figura 25A**).

Para determinar la expresión relativa de cada una de las isoformas de LC3B realizamos Western blot de la línea celular HL-60 (**Figura 25 B y C**). Los niveles de proteína LC3B-II detectados no revelaron cambios significativos entre la línea parental y las transducidas, aunque se observó un ligero aumento en el caso de la expresión derivada de la isoforma corta (**Figura 25B**). Debido a la degradación de la forma LC3-II que se da en la fase final de la autofagia (Mizushima & Yoshimori, 2007), así como, a la diversidad de estímulos que pueden afectar dicho proceso, empleamos varios factores inductores de la misma con el fin de facilitar su detección. El tratamiento con citarabina (L. Chen et al., 2017) o vitamina D3 (J. Wang et al., 2008) y el déficit de nutrientes (Shang et al., 2011) se utilizaron como posibles controles positivos para validar el modelo experimental, aunque no generaron cambios relevantes en la expresión proteica de LC3B (**Figura 25C**).

La heterogeneidad de estos resultados no nos permite establecer conexiones claras entre la expresión de LAPT4B y la inducción de la autofagia, sin embargo, las diferencias entre las células transducidas y las parentales observadas en ambas líneas celulares podrían denotar el papel regulador de LAPT4B en el proceso de autofagia.

A

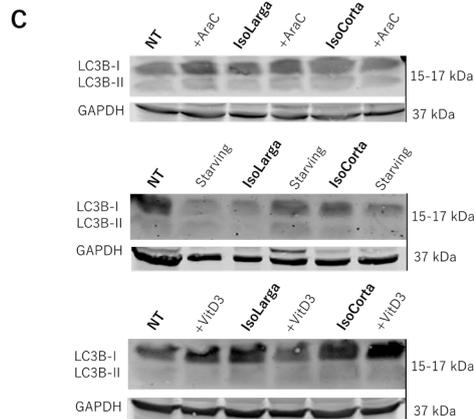
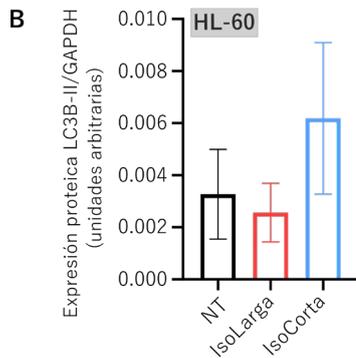
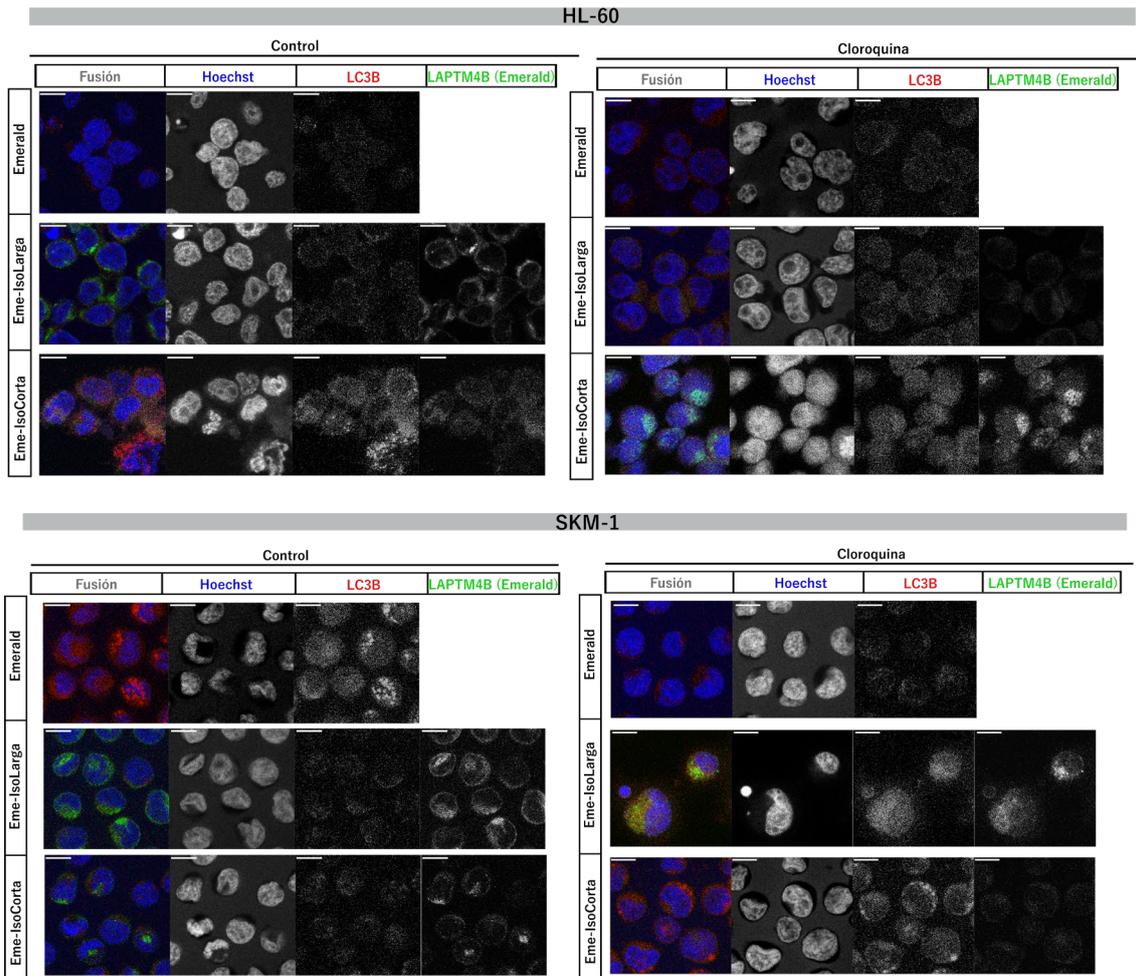


Figura 25. Evaluación del marcador autofágico LC3B y su relación con LAPT4B. A) Inmunofluorescencia anti-LC3B (rojo) para lisosomas y tinción nuclear (Hoechst, azul) en HL-60 y SKM-1 transducidas con Emerald-LAPT4B largo/corto (verde) y tratadas 24h con cloroquina 20 μ M. Las barras de escala corresponden a 10 μ m. **B)** Cuantificación de LC3B por Western blot normalizado respecto a la proteína GAPDH, media de tres réplicas independientes \pm SEM. **C)** Western Blot representativo de uno de HL-60.

Puesto que LAPTM4B está implicado en la funcionalidad de los lisosomas, y la cloroquina inhibe la autofagia, decidimos evaluar el efecto de las isoformas de LAPTM4B en la respuesta citotóxica a cloroquina. Para poder detectar cambios en la sensibilidad/resistencia a muerte dependiente de autofagia entre las isoformas y respecto al control, analizamos la citotoxicidad derivada del tratamiento de las células HL-60 y SKM-1 con dosis crecientes de cloroquina durante 48h. Como recoge la **Figura 26A**, la cloroquina provocó muerte celular de forma análoga en las células no transducidas y en las transducidas, sin cambios destacables en sus EC50 (**Figura 26B**).

En definitiva, no hemos detectado una relación entre la muerte celular dependiente de autofagia y la expresión de LAPTM4B. No obstante, las pruebas anteriores sugieren una función regulatoria de la isoforma corta de LAPTM4B en el proceso de autofagia, aunque quizás esta función esté más relacionada con el proceso de formación de autolisosomas o de reciclaje que con el de muerte celular.

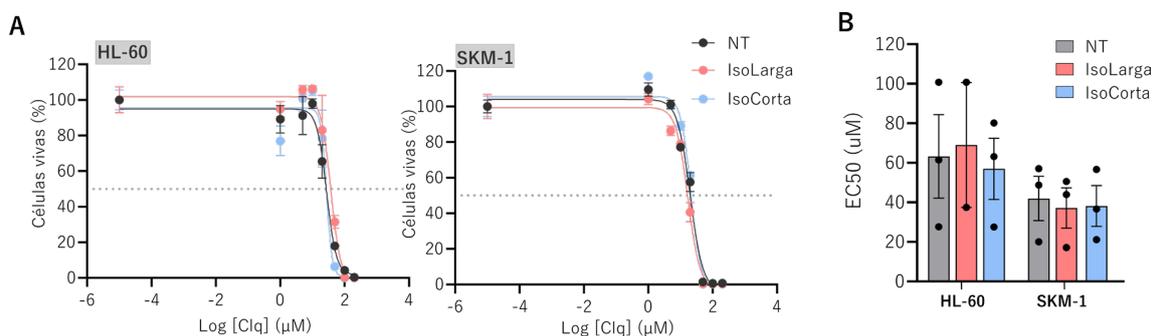


Figura 26. El tratamiento con cloroquina no induce cambios, en términos de muerte celular, en células con sobreexpresión de LAPTM4B respecto a las células control. Con el fin de determinar la viabilidad y calcular el valor de la EC50, las células HL-60 y SKM-1 no transducidas (NT) y transducidas con LAPTM4B (largo o corto) se trataron 48h con dosis crecientes de cloroquina y se evaluaron mediante citometría de flujo. Los resultados se han representado como **A)** una réplica representativa de las EC50 en las distintas líneas, en la que cada punto corresponde con la media de triplicados de cada experimento independiente \pm SEM (n=3) y **B)** los valores numéricos de las EC50 calculadas \pm SEM (n=3).

4.4.3. Estudio de la señalización basal de LAPTM4B

Una vez explorado el papel de LAPTM4B en el compartimento lisosomal y autofágico, nos centramos en descifrar la función de LAPTM4B en la LMA. Para

ello, se analizó la señalización basal activada por las isoformas larga y corta de LAPTM4B, frente a las células control.

Para determinar la señalización celular asociada a la expresión de LAPTM4B se utilizó un ensayo de señalización mediante la cotransfección de las dos isoformas de LAPTM4B junto con los vectores de elemento respuesta a suero (SRE, señalización MEK-Erk), a AMPc (CRE, señalización PI3K-Akt), a Stat3 (pTATA, señalización Stat3) y al factor nuclear de células T activadas (NFAT, movilización de Ca²⁺ intracelular) acoplados a luciferasa. En todos los casos, el tratamiento con cloroquina se empleó como control positivo.

Para comenzar, se comprobaron por Western blot que las transfecciones de los plásmidos con las isoformas de LAPTM4B se realizaron eficientemente y en niveles equivalentes para ambas isoformas (**Figura 27A**).

Posteriormente, el ensayo de señalización nos indicó que la sobreexpresión de LAPTM4B incrementa significativamente la actividad señalizadora basal mediada por SRE (MEK-Erk), CRE (PI3K-Akt) y NFAT (movilización de Ca²⁺ intracelular) respecto a las células no transducidas. Sin embargo, entre ambas isoformas no se dieron diferencias significativas en ninguno de estos casos. Inversamente, en la vía de Stat3 (pTATA) no se detectaron diferencias significativas en su actividad, comparando las células no transducidas con las transducidas a nivel basal. Aunque tampoco se dan diferencias estadísticamente notables entre las isoformas, la actividad de la isoforma larga es ligeramente superior a la observada en la corta (**Figura 27B**).

Por otro lado, el tratamiento con cloroquina afectó de forma diferente la actividad celular dependiendo de la vía de señalización estudiada. En concreto, la actividad señalizadora mediada por SRE y CRE aumentó equitativamente para ambas isoformas de LAPTM4B frente a las células control, que no mostraron cambios tras el tratamiento. En lo que respecta a la vía mediada por NFAT, únicamente la isoforma corta de LAPTM4B mostró un incremento en su actividad como consecuencia de la cloroquina. Por último, en el caso de la señalización mediada por

el elemento pTATA, tanto las células no transducidas como aquellas con sobreexpresión de LAPTM4B incrementaron la actividad después del tratamiento. Particularmente, la actividad derivada de la isoforma larga fue notablemente mayor que la de la corta o las células control (**Figura 27B**).

El análisis de la inducción de cada isoforma tras el tratamiento nos llevó a descubrir diferencias relevantes entre los subgrupos estudiados como se manifiesta en la **Figura 27C**. El tratamiento con cloroquina promueve significativamente la activación de la vía CRE en aquellas células con expresión ectópica de la isoforma larga LAPTM4B en comparación con las células control. En este caso, no se dieron diferencias significativas entre la inducción de la isoforma corta con las células control, ni entre ambas isoformas. En cuanto a la vía mediada por SRE, ambas isoformas de LAPTM4B incrementaron notablemente su actividad respecto al control, de forma bastante similar entre ellas. Finalmente, en las vías de NFAT y pTATA no se detectaron diferencias significativas en la inducción tras el tratamiento entre las células control y las transducidas, ni tampoco entre las dos isoformas de LAPTM4B. Si bien, en el caso de NFAT la actividad de la isoforma larga parece tener menor inducción respecto a la actividad derivada de las células control y a la correspondiente a la isoforma corta.

A modo de conclusión, la sobreexpresión de LAPTM4B promueve la activación de las vías MEK-Erk (SRE), PI3K-Akt (CRE) y la movilización de Ca²⁺ intracelular (NFAT) en el contexto leucémico, aunque la más relevante biológicamente parece ser la vía MEK-Erk, donde la activación es dos veces mayor en las células transducidas que en el control (**Figura 27B**). Asimismo, esta vía de señalización mediada por SRE también fue la que mayores diferencias de inducción mostró entre las células transducidas y las células control (**Figura 27C**).

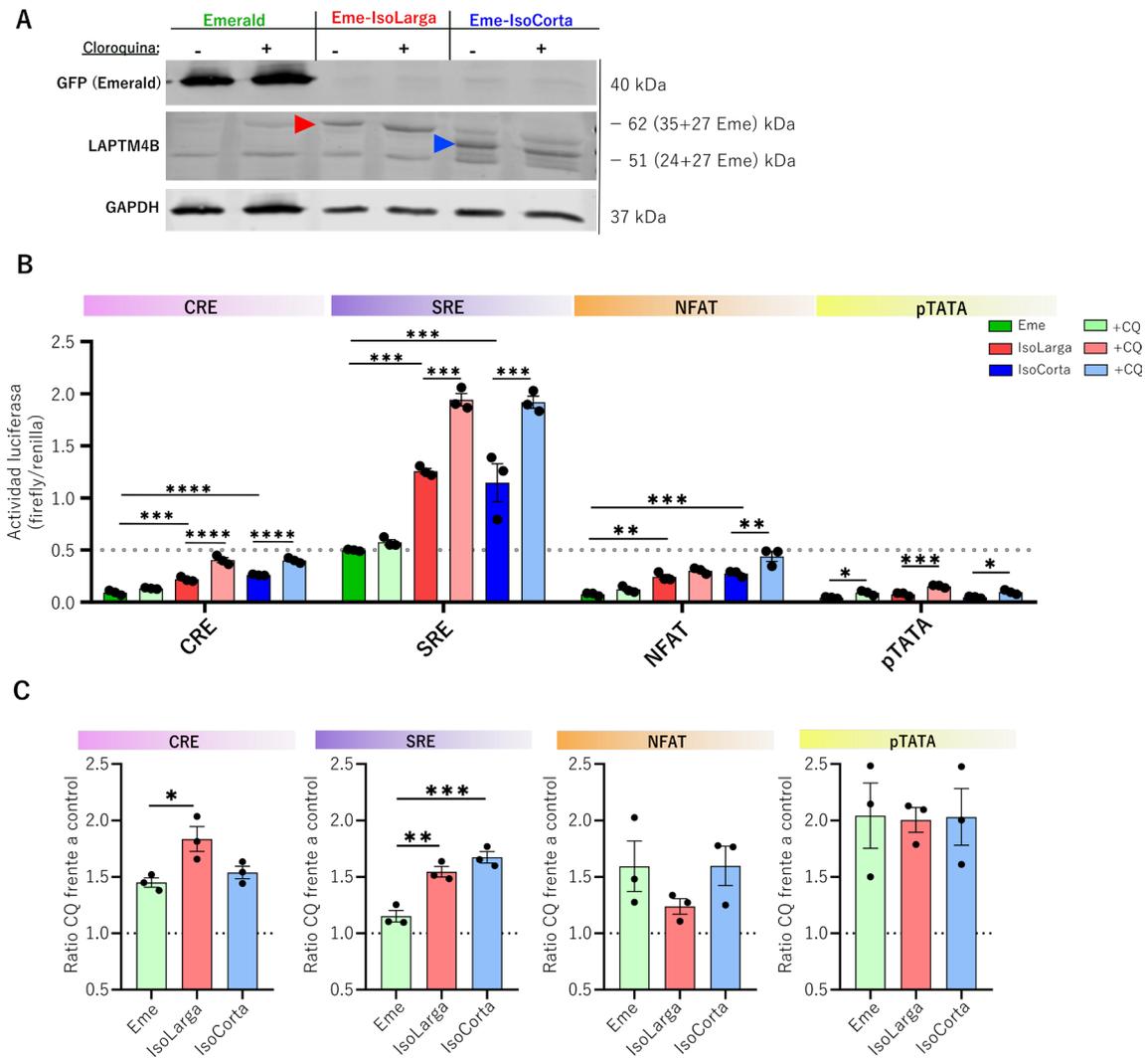


Figura 27. Las isoformas LAPT4B larga y corta activan mayoritariamente la vía de señalización mediada por el elemento SRE (MEK/Erk). **A)** Las transfecciones con los vectores pCDH-Emerald y pCDH-Emerald-LAPT4B largo o corto se validaron por Western blot. Las células se trataron durante 24h con cloroquina 20 μ M. **B)** La actividad luciferasa fue analizada tras la cotransfección de los vectores de interés (control o cada una de las isoformas de LAPT4B), junto con los vectores acoplados a luciferasa (CRE, SRE, NFAT y pTATA) y el vector control renilla y posteriormente, se calculó la ratio de luciferasa/renilla. **C)** Inducción producida por la cloroquina en las diferentes vías de señalización, en comparación con su control sin tratar. Las barras representan la media de triplicados de tres experimentos independientes \pm SEM; cada punto representa la media de un experimento * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Debido a que la sobreexpresión de LAPT4B en estado basal estimula la activación de diferentes vías de señalización relevantes en LMA, se decidieron explorar en profundidad estas rutas de señalización mediante la cuantificación de proteínas clave fosforiladas en función de la proteína total. Con este fin, las células HL-60, MM-1 y U-937 transducidas con ambas isoformas de LAPT4B o sin transducir, fueron evaluadas a nivel de proteína en su estado basal o tras 24h en ausencia de nutrientes.

Esta condición de estrés metabólico podría servir de control positivo intensificando los efectos de LAPTM4B (Wu & Zhang, 2020) y poner de manifiesto su función como regulador de la disponibilidad de nutrientes (K. Zhou et al., 2020). Los mensajeros secundarios evaluados fueron mTOR, Akt (pertenecientes a la vía mediada por SRE), Stat3 (pTATA) y Erk (SRE), por ser los elementos clave de las vías de señalización analizadas por luciferasa (**Figura 28A**).

Respecto a las células HL-60, a nivel basal observamos una disminución en la cantidad de p-mTOR y mTOR en la isoforma corta de LAPTM4B en comparación con la isoforma larga o las células parentales. En cambio, en deficiencia de nutrientes aumenta la cantidad de proteína en la isoforma corta, mientras que disminuye en la isoforma larga o se mantiene igual en las NT. Sin embargo, no se han percibido cambios evidentes en la activación de Akt en esta línea celular en ninguna de las células o condiciones. Siguiendo con la vía de Stat3, parece existir una tendencia de aumento en la cantidad de proteína activada (p-Stat3) en ambas isoformas de LAPTM4B frente a su control y sin modificaciones en ausencia de nutrientes. Por último, en la vía mediada por el elemento de respuesta a SRE, destaca el incremento de p-ERK/ERK en las células con sobreexpresión de LAPTM4B respecto al control. Dicha activación disminuyó bajo estrés nutricional, sobre todo observable en la isoforma larga (**Figura 28B**).

Por otra parte, la línea celular MM-1 a nivel basal mostró un aumento en la cantidad de p-mTOR y mTOR en el caso de las células transducidas, aunque mayoritariamente en la isoforma larga de LAPTM4B. En este caso, la ausencia de nutrientes potenció la cantidad de p-mTOR y mTOR para ambas isoformas, al contrario de las células control donde la expresión fue casi imperceptible en las dos condiciones evaluadas. Sin embargo, no se pudieron detectar cambios en la activación de p-AKT o p-Stat3 entre las células NT y las transducidas, ni entre ambas isoformas en estado basal ni en ausencia de nutrientes. En cambio, la activación de Erk parece ligeramente superior en las células transducidas respecto a las células control. Las condiciones de estrés nutricional parecen disminuir dichos

niveles en todas las células, aunque con mayor intensidad en la isoforma larga de LAPTM4B.

La última línea testada, U-937, mostró un perfil de expresión proteica superior para p-mTOR y mTOR en la isoforma larga, en comparación con la línea parental. La ausencia nutricional aumentó dicha expresión para las células control y en el caso de la isoforma corta, mientras que, en la isoforma larga disminuyó p-mTOR y mTOR en estas condiciones. Aunque en condiciones basales, la activación de Akt fue similar en todas las líneas, el estrés nutricional impulsó la actividad para las células transducidas. La activación de p-Stat3 en esta línea no se puede evaluar correctamente, aunque los niveles totales de Stat3 fueron similares para todas las células en todas las condiciones. De nuevo, la vía de Erk parece sobreactivada en las células con sobreexpresión de LAPTM4B en comparación con su control. En este caso, la deficiencia nutricional no pareció reducir su cantidad y sí lo hizo en las células parentales.

A nivel general, se observó un incremento de p-Erk/Erk en todas las células transducidas con LAPTM4B (**Figura 28 B y C**), resultado esperable tras los resultados obtenidos en los ensayos de luciferasa mediados por el elemento de respuesta SRE. Medir los niveles de proteína de forma independiente en cada experimento genera valores dispares al compararlos, por ello, se decidió representar la mediana en lugar de la media en la **Figura 28C**. Asimismo, se deduce que el resto de los cambios detectados no son tan evidentes, ni reproducibles como el dado en el caso de Erk, por lo que no se pueden garantizar efectos derivados de la sobreexpresión de LAPTM4B en el resto de las vías de señalización.

Respecto a la condición de déficit nutricional, fue difícil extraer conclusiones debido a la heterogeneidad observada en cada línea celular y para cada mensajero evaluado, aunque en el caso de la isoforma corta de LAPTM4B las condiciones de estrés nutricional parecen disminuir sus niveles en todas las líneas evaluadas.

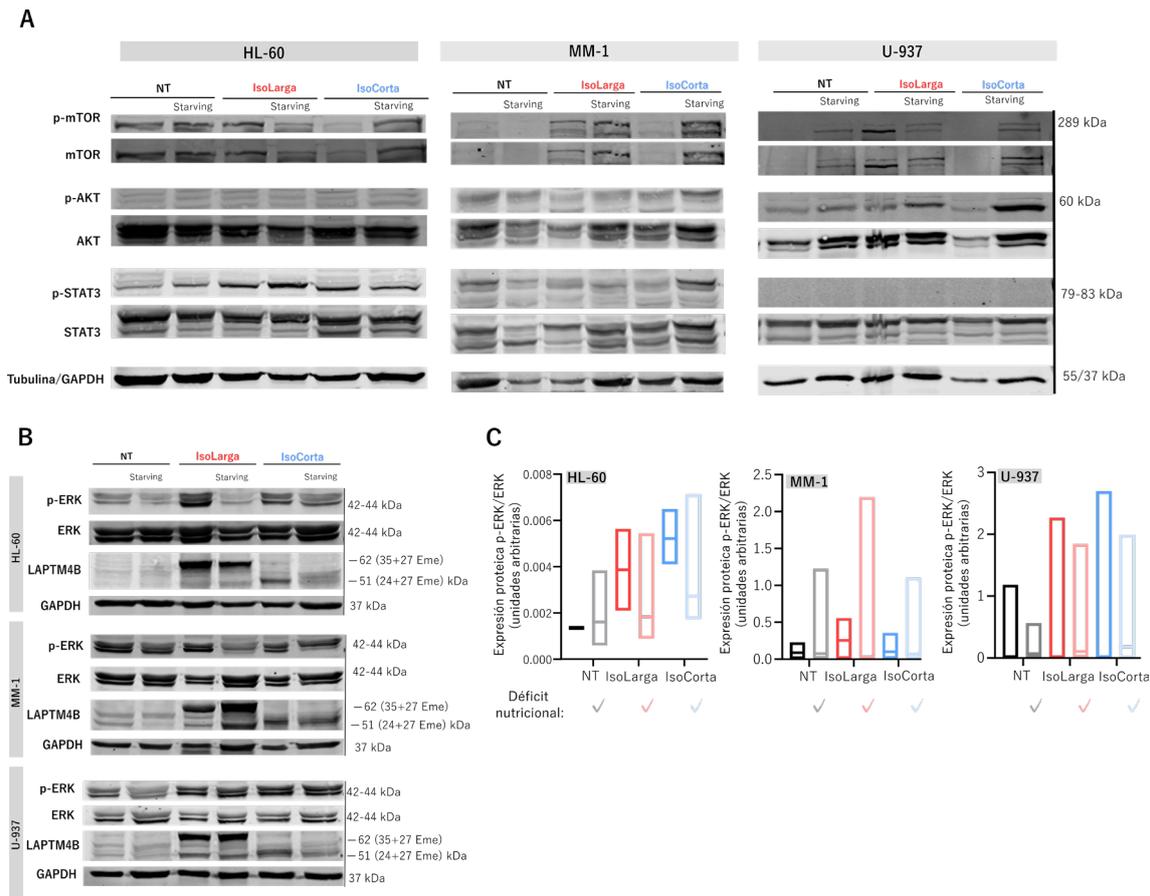


Figura 28. LAPTM4B activa la vía de señalización de las MAP quinasas a través de un aumento en la proporción p-Erk/Erk. A) Western blot representativos para cada línea celular en las que se evaluaron la fosforilación de mensajeros secundarios clave en las vías de señalización estudiadas por los reporteros de luciferasa, junto a la proteína total. **B)** Western blot representativos para cada línea celular en la que se evaluaron p-Erk y Erk en presencia de cada una de las isoformas de LAPTM4B. **C)** Cuantificación de p-Erk/Erk donde las barras representan los valores máximos y mínimos de 3 experimentos independientes y la línea horizontal el valor de la mediana en cada caso.

4.4.3.1. Estudio de la señalización mediante inhibidores

Debido a los resultados obtenidos anteriormente demostrando la implicación de LAPTM4B en la actividad mediada por SRE (MEK-Erk) y CRE (PI3K-Akt), junto a la relevancia de dichas vías en LMA, se optó por estudiar en detalle la señalización mediante el uso de PD184352 y Ly294-002, inhibidores de la fosforilación de MEK y PI3K, respectivamente.

Curiosamente, el tratamiento con el inhibidor de MEK, PD184352, no causó diferencias apreciables en la viabilidad entre aquellas células con sobreexpresión de LAPTM4B y los controles, así como, tampoco se observaron diferencias entre

ambas isoformas en ninguna de las líneas testadas (**Figura 29A**). En contra, la adición del inhibidor Ly294-002 disminuyó la viabilidad de las células HL-60 transducidas con LAPTM4B de forma significativamente mayor que en las células parentales, en ambas isoformas por igual, como se puede deducir de los valores y las curvas de EC50 obtenidas (**Figura 29B**).

Los resultados obtenidos tras el uso de inhibidores nos llevaron a comprobar, mediante la cuantificación de proteína, el efecto del inhibidor de la vía PI3K-Akt. De la misma forma que para estudiar la inhibición por citometría, tratamos a las células HL-60 con Ly294-002 y posteriormente, se estudiaron sus niveles de proteínas. Como sería esperable por el mecanismo de acción de este compuesto, la fosforilación de Akt sufriría una disminución en las células tratadas. Opuestamente a lo esperado, no se observaron cambios en la relación p-Akt/Akt ni en las células control ni en las transducidas. En cambio, p-Erk/Erk sufrió un descenso en las células con expresión ectópica de LAPTM4B, indicando el bloqueo de la vía de señalización de la vía de las MAPK. Mientras que, las HL-60 control aumentaron la actividad de Erk tras el uso de su inhibidor (**Figura 29C**).

Como consecuencia de estos resultados apuntando a una disminución en la vía de las MAP quinasas tras el tratamiento con el inhibidor de PI3K, Ly294-002, realizamos una última prueba confirmatoria. De igual manera que en el caso de la señalización basal, evaluamos la vía de señalización mediada por SRE (MEK-Erk) tras el tratamiento con una dosis no muy elevada de PD184352 (**Figura 29D**) o Ly294-002 (**Figura 29E**) para evitar la citotoxicidad. En el caso del inhibidor PD184352, los resultados obtenidos tras medir los niveles de luciferasa indicaron una ligera disminución en la actividad señalizadora en todas las células (transducidas y no transducidas) aunque no significativa respecto a cada una de sus células control. Asimismo, tampoco se apreciaron diferencias entre la disminución de la actividad entre las células transducidas y las parentales, ni entre ambas isoformas de LAPTM4B (**Figura 29D**), por lo que dicho efecto no es específico de LAPTM4B.

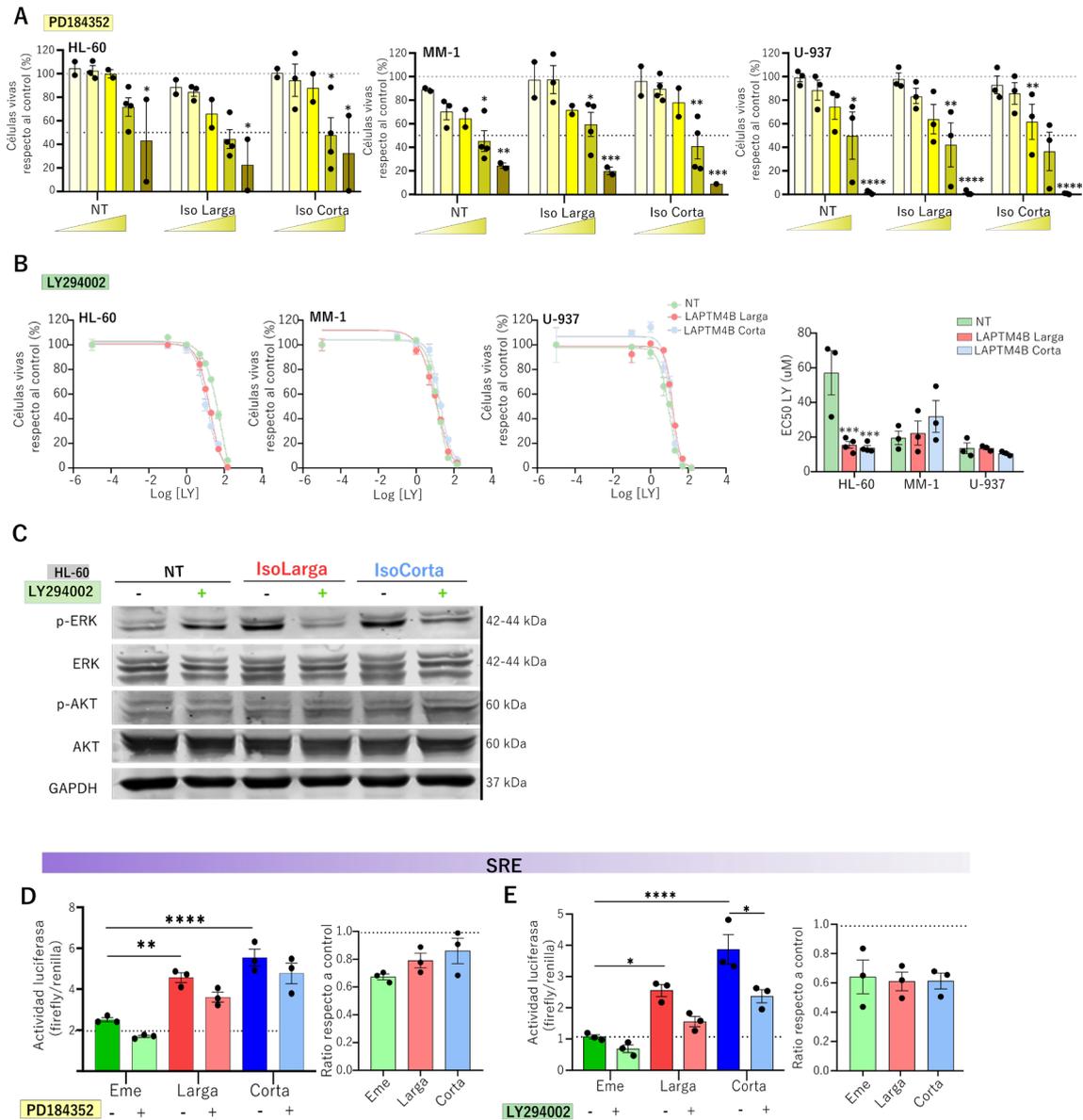


Figura 29. La expresión de LAPT4B en la línea de LMA HL-60, confiere una sensibilidad al inhibidor LY294-002 pero no a PD184352. Células HL60, MM-1 y U-937 no transducidas (NT) y transducidas con LAPT4B (largo o corto) se trataron 48h con **A)** el inhibidor de MEK-Erk (PD184352, amarillo) en concentraciones crecientes de 0,1µM, a 300µM, únicamente representadas: 10, 50, 100, 150 y 300µM. La viabilidad celular se evaluó por citometría de flujo. **B)** el inhibidor de PI3K-Akt (Ly294-002, verde) a 0,1µM, 1µM, 5µM, 10µM, 20µM, 50µM y 150µM. La viabilidad celular fue analizada por citometría de flujo y posteriormente, se calcularon las EC50 de al menos tres experimentos independientes ± SEM. **C)** Western blot representativo para observar la fosforilación de Erk tras el tratamiento de Ly294-002 15µM durante 48h. **D)** Actividad luciferasa analizada mediante la ratio de luciferasa/renilla y la ratio lucifera/renilla de células tratadas frente al control, gracias al sensor contenido en el plásmido SRE. Experimentos realizados en células HEK-293T transfectadas con LAPT4B o el control Emerald, tras el tratamiento durante 24h con PD184352 25µM o **E)** Ly294-002 25µM. Las barras indican la media de triplicados de tres experimentos independientes ± SEM; cada punto representa la media de un experimento y los triángulos dosis crecientes del inhibidor utilizado. Se normalizaron los datos previamente al análisis estadístico. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001.

El tratamiento con el inhibidor Ly294-002, al igual que en el caso anterior, produjo una reducción en la actividad señalizadora tanto en las células transducidas como en las parentales. En cambio, en este caso la disminución fue significativa en las células transducidas con la isoforma corta de LAPTM4B frente a su control. No obstante, no se dieron diferencias destacables entre las células sin transducir y las transducidas, ni entre ambas isoformas de LAPTM4B (**Figura 29E**).

Aunque el tratamiento con inhibidores de las vías de señalización disminuye la viabilidad celular y parcialmente la actividad señalizadora, estos efectos no son específicos de LAPTM4B en el caso del inhibidor de Erk, PD142352. Alternativamente, a pesar de que el inhibidor de PI3K (Ly294-002) no varió la actividad mediada por SRE entre las diferentes células, redujo significativamente la viabilidad, así como la cantidad de proteína Erk fosforilada, de forma específica en las células HL-60 con sobreexpresión de LAPTM4B.

En concordancia con las conclusiones anteriores, la inhibición parcial de estas vías de señalización podría indicar la promiscuidad de mecanismos implicados en su activación, asimismo la inhibición cruzada observada podría ser un fenómeno ligado a tipos concretos de LMA, dado que no se ha observado en la línea de riñón embrionario, HEK-293T. Con todo ello, se podría resumir que LAPTM4B estaría implicado en la activación de ciertas vías de señalización con gran importancia en cáncer (Braicu et al., 2019) y en hematopoyesis (Geest & Coffey, 2009), como la vía de las MAP quinasas, demostrada aquí. Aunque el mecanismo de activación de esta vía todavía sea una incógnita, su interacción con receptores tirosina quinasa, encargados de la activación de estas vías en presencia de factores de crecimiento, podría ser un elemento clave para la regulación de la señal (R. L. Zhou et al., 2015) (**Figura 30**).

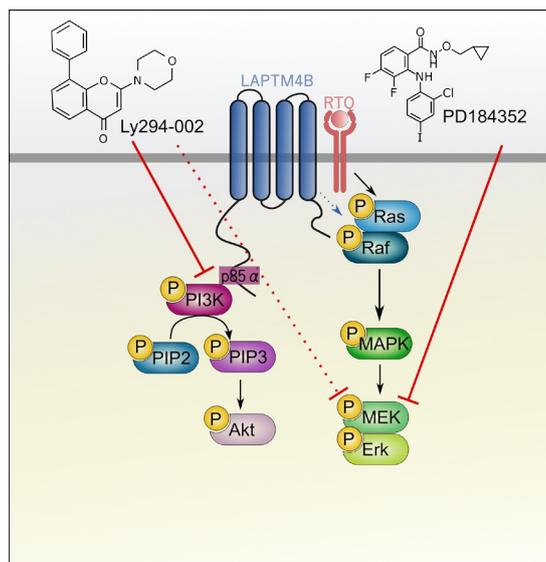


Figura 30. Señalización regulada por LAPT M4B. Basado en (Ji et al., 2022; Y. Meng et al., 2016; X.-C. Xu et al., 2021; R. L. Zhou et al., 2015). Ly294-002: inhibidor de PI3K, PD184352: inhibidor de MEK/Erk, RTQ: receptor tirosina quinasa.

4.4.4. Efecto diferencial de LAPT M4B en LMA

- **LAPT M4B y receptores tirosina quinasa**

Atendiendo a los resultados anteriores, resultaba de interés profundizar en si los efectos producidos tras la expresión ectópica de LAPT M4B, como la sobreactivación de la vía de las MAPK o su participación en el proceso de autofagia, podrían estar mediadas por la interacción entre LAPT M4B y los receptores tirosina quinasa. La idea de explorar este tipo de receptores surge de las evidencias previamente descritas en la literatura acerca de la estrecha relación entre LAPT M4B y EGFR, que podría ser clave para regular la autofagia durante el proceso de tumorigénesis. De igual manera, los trabajos acerca de este receptor tirosina quinasa, demuestran que el aumento de la autofagia ocurre como consecuencia de la activación de la vía MAPK por EGFR y para ello, es clave el papel de LAPT M4B (Ji et al., 2022; M. Wu & Zhang, 2020).

En función de lo planteado, el procedimiento más lógico sería evaluar la relación entre EGFR y LAPT M4B en LMA, sin embargo, existe controversia acerca de si EGFR se expresa en esta neoplasia (Mahmud et al., 2016; Nath et al., 2020). Por consiguiente, el receptor tirosina quinasa escogido para su evaluación ha sido FLT3,

debido a su mayor implicación en LMA y a la mayor frecuencia de mutaciones FLT3-ITD asociada a la expresión de LAPTM4B (Bullinger et al., 2008; L. Huang et al., 2012; Ng et al., 2016). Para abordar esta cuestión, se decidió emplear el inhibidor de FLT3-ITD, gilteritinib.

En primer lugar, realizamos un estudio exploratorio para testar el fármaco gilteritinib en las líneas celulares HL-60, MM-1, SKM-1, KG-1, K-562 y Molm-13, línea de LMA heterocigota para la mutación FLT3-ITD (Quentmeier et al., 2003). Para ello, tratamos con gilteritinib durante 72h y analizamos la viabilidad celular mediante citometría de flujo. Con gran diferencia respecto de las demás líneas celulares, Molm-13 mostró una EC50 a una concentración muy baja del inhibidor, como era esperable por la presencia de la mutación. Mientras que las líneas U-937, K-562 o HL-60 fueron las más resistentes al tratamiento (**Figura 31A**).

Una vez comprobado el efecto citotóxico de este compuesto, fundamentalmente en presencia de la mutación FLT3-ITD, se incluyó LAPTM4B en esta ecuación. A pesar de que dicho inhibidor resulta altamente efectivo frente a FLT3-ITD, parece no ser completamente específico de su estado mutado (Janssen et al., 2022; Perl et al., 2017). Por tanto, incluimos en este estudio células no mutadas para FLT3, con el fin de determinar si su efecto varía en células con alta expresión de LAPTM4B frente a los controles (**Figura 31B**). Para ello, las células HL-60, MM-1 y Molm-13 fueron evaluadas de la misma forma a la descrita anteriormente mediante citometría de flujo tras el tratamiento de gilteritinib. Contrario a la hipótesis planteada, no se detectaron diferencias significativas entre las células sin transducir o transducidas con LAPTM4B al tratar con este fármaco en ninguna de las líneas empleadas (**Figura 31B**). En el caso de las células Molm-13, se aprecia una leve tendencia hacia una mayor sensibilidad al tratamiento cuando LAPTM4B está sobreexpresado, pero su poder estadístico no fue suficiente para determinarlo como significativo (**Figura 31C**).

Cabe destacar que, del resto de las líneas no se calculó la EC50 puesto que los valores obtenidos en las diferentes réplicas fueron muy heterogéneos. A pesar de las

pruebas realizadas, por el momento no podemos afirmar que exista un vínculo entre LAPTM4B y otros receptores tirosina quinasa diferentes de EGFR, pero se necesitan estudios más amplios para abarcar dicha pregunta.

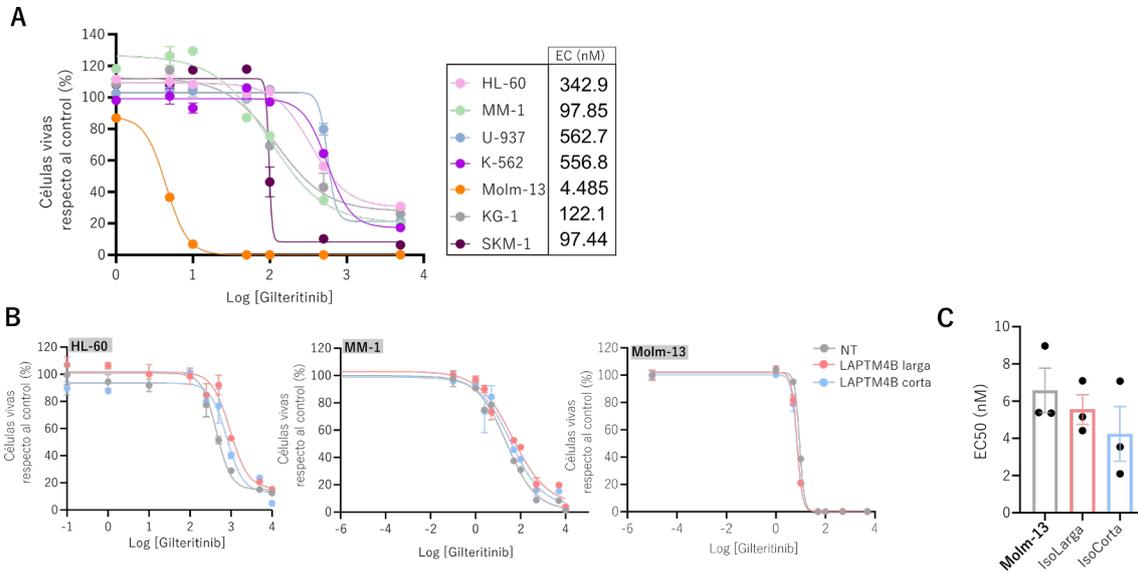


Figura 31. La sobreexpresión de LAPTM4B no genera cambios en la respuesta al tratamiento con gilteritinib. Se trataron células NT o transducidas con LAPTM4B (largo o corto) durante 72h con dosis crecientes de gilteritinib: **A)** Citotoxicidad medida por citometría de flujo y EC₅₀ representativas para cada línea celular sin transducir. **B)** Evaluación de la sensibilidad en líneas transducidas frente a control por citometría de flujo, histogramas representativos para HL-60, MM-1 y Molm-13. **C)** EC₅₀ de gilteritinib en la línea Molm-13, las barras indican la media de tres réplicas independientes \pm SEM.

- **Papel de LAPTM4B en la diferenciación**

Considerando que una de las características fundamentales de las células de LMA es el bloqueo en la diferenciación (Bonnet & Dick, 1997) y una de las estrategias empleadas para erradicar las células leucémicas consiste en inducir la diferenciación mieloide (Madan & Koefler, 2020; Stubbins & Karsan, 2021), se decidió analizar la relación entre la sobreexpresión de LAPTM4B y la diferenciación. Por otro lado, en la literatura se describe la correlación negativa entre la expresión de LAPTM4B y el grado de diferenciación observada en ciertos tumores (Peng et al., 2005).

Para estudiar el papel de LAPTM4B sobre la diferenciación, se evaluó la expresión de los marcadores de diferenciación mieloide CD11b (diferenciación granulocítica) y CD14 (diferenciación monocítica) en superficie. Para ello, se trataron las células HL-60, MM-1 y U-937 durante 72h con agentes diferenciadores (ácido

holotransretinoico, ATRA, y vitamina D3) y se determinó la diferenciación mieloide por citometría de flujo analizando la expresión en superficie de dichos antígenos.

Según revelan los gráficos siguientes (**Figura 32**), a nivel basal no existen diferencias significativas en los niveles de diferenciación granulocítica ni monocítica detectados en superficie por CD11b y CD14 respectivamente, entre las células control y las transducidas con LAPTM4B, en ninguna de las líneas celulares testadas. Asimismo, tampoco se dan diferencias entre las diferentes isoformas de LAPTM4B.

En cambio, los tratamientos con ATRA y vitamina D3 produjeron diferencias dependiendo del contexto celular y de la expresión de LAPTM4B. En cuanto a la línea HL-60, la diferenciación granulocítica (CD11b) se indujo significativamente y de forma análoga, tanto en las líneas transducidas como en el control, bajo el tratamiento con vitamina D3. En cambio, ATRA produjo un aumento en este tipo de diferenciación únicamente en las células con sobreexpresión de LAPTM4B, de forma equitativa entre ambas isoformas (**Figura 32A**). Inversamente, en el caso de la diferenciación monocítica (CD14), el agente diferenciador específico, vitamina D3, indujo un aumento significativo y específico en las células HL-60 transducidas con LAPTM4B, sin diferencias entre ambas isoformas. Mientras que el tratamiento con ATRA no produjo diferencias significativas entre ningún subtipo, existe una tendencia de aumento de la diferenciación en el caso de las células con sobreexpresión de LAPTM4B frente al control (**Figura 32B**). A pesar de que estos datos sugieren que la diferenciación puede inducirse con mayor intensidad en las células transducidas que en las células HL-60 control tras el tratamiento con los agentes diferenciadores, no podemos tener en cuenta estos resultados dado que van en contra de lo esperado para las células HL-60. Este tipo celular suele ser fácilmente diferenciable bajo estos compuestos (Hughes et al., 2010; Tasseff et al., 2017), por lo que la escasa diferenciación observada en los controles podría atribuirse a un mal estado de las células o a otras causas desconocidas.

Detalladamente para MM-1, también parece darse una mayor inducción hacia la diferenciación granulocítica (CD11b) al tratar con la vitamina D3 en las células

transducidas. Aunque en este caso, el aumento de CD11b fue estadísticamente significativo respecto a su control únicamente para la isoforma larga de LAPTM4B. Mientras que, el tratamiento con ATRA no produjo diferencias evidentes en la diferenciación granulocítica en ninguna de las células transducidas ni en las células control (**Figura 32A**). Respecto a la diferenciación monocítica (CD14), tanto la vitamina D3 como ATRA provocaron un gran aumento de la misma, aunque mayor en el caso de la vitamina D3. Sin embargo, no se detectaron diferencias notables entre el aumento de la diferenciación producido en las células control y el dado en las transducidas, ni tampoco entre ambas isoformas bajo ningún tratamiento (**Figura 32B**).

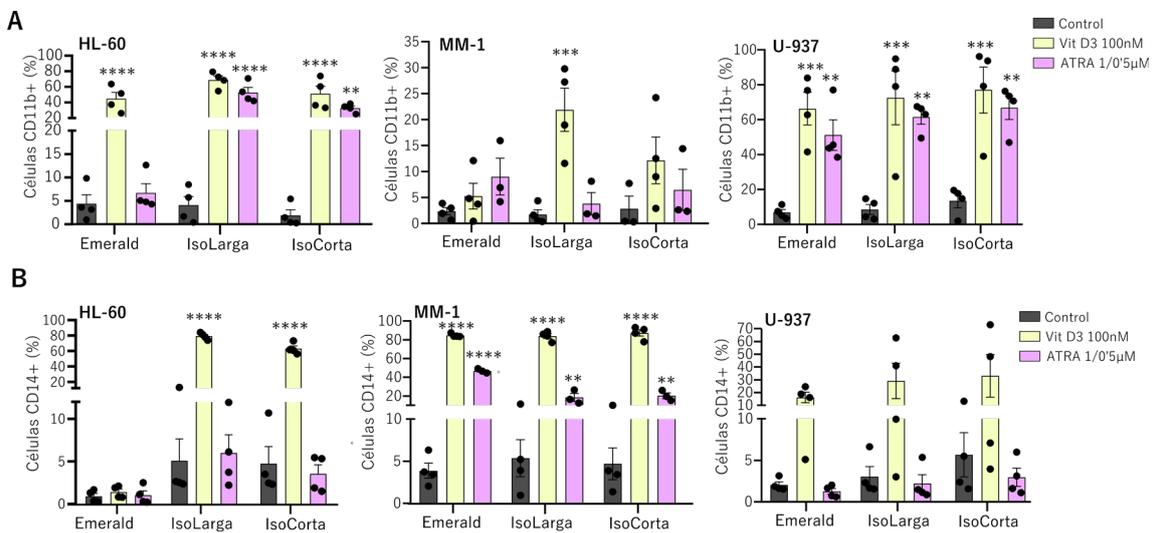


Figura 32. La expresión de las isoformas de LAPTM4B no induce cambios en los marcadores de diferenciación a nivel basal, aunque la vitamina D3 tiene un mayor efecto diferenciador en presencia de las isoformas de LAPTM4B. Las células HL-60, MM-1 y U-937 transducidas con el vector vacío (Emerald) y transducidas con LAPTM4B (largo y corto) se trataron con ácido holotransretinoico (ATRA) 1µM (HL-60) y 0.5 µM (MM-1 y U-937) o vitamina D3 100nM durante 72h. La expresión en superficie de **A)** CD11b y **B)** CD14 se analizó por citometría de flujo. La media de triplicados de tres o cuatro experimentos independientes \pm SEM del porcentaje de células LAPTM4B positivas queda representada mediante barras y cada punto indica la media de un experimento. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Por último, la línea U-937 sufrió un aumento significativo de CD11b tanto tras el tratamiento de vitamina D3 como el de ATRA. En esta ocasión, tras el tratamiento con los compuestos diferenciadores tampoco se han observado grandes diferencias en cuanto a la inducción de la diferenciación producida en las diferentes células, transducidas y parentales, ni entre las diferentes isoformas (**Figura 32A**). Por otro

lado, la diferenciación monocítica (CD14) aumentó únicamente bajo el tratamiento con vitamina D3 y de forma equitativa entre las células no transducidas y las transducidas. Pese a ello, estas diferencias no fueron suficientes para ser estadísticamente significativas. El tratamiento con ATRA no produjo ningún cambio en los niveles de CD14 detectados en ninguna de las células U-937, como se puede apreciar en la **Figura 32B**.

La variabilidad encontrada en cada tipo celular y en función del tratamiento complica la interpretación de los resultados. En general, la sobreexpresión de LAPTM4B no influiría en los niveles de diferenciación basal, si bien, la vitamina D3 parece tener un mayor efecto diferenciador en presencia de las isoformas de LAPTM4B.

- **LAPTM4B y el ciclo celular**

En estrecha relación con la diferenciación, se estudió si las líneas transducidas con LAPTM4B sufrían cambios en su ciclo celular. Para ello, las células HL-60, MonoMac-1, U-937, Molm-13 y K-562 se mantuvieron durante 18h en un medio en desprovisto de suero para sincronizar sus ciclos celulares y tras ser fijadas, se determinaron los ciclos celulares por citometría de flujo.

En primer lugar, los resultados obtenidos revelaron una gran heterogeneidad entre las diferentes líneas celulares. *A priori* observamos diferencias entre las fases S y G2 entre las células HL-60 parentales y las transducidas. En cambio, las células MM-1 mostraron un alto porcentaje de células en fase G1, y las diferentes fases parecen análogas entre las líneas transducidas y su control. En el caso de las U-937, a pesar de que el patrón del ciclo celular es similar al de las células HL-60, las grandes barras de error impiden su correcta interpretación. De las células Molm-13, destaca su alto porcentaje de células en fase G1 tanto en las transducidas como en las no transducidas, al igual que ocurría en MM-1. Finalmente, en la línea de LMC, K-562, se pueden detectar cambios en fase S entre las diferentes células (**Figura 33A**).

Explorando en detalle estos resultados, la **Figura 33B** nos muestra los cambios observados en las líneas HL-60, Molm-13 y K-562. Cabe destacar que las células

MM-1 y U-937 no se muestran en este caso dado que no hay diferencias significativas entre ninguna de las fases del ciclo entre las células control y las transducidas, ni entre las diferentes isoformas de LAPTM4B. Probablemente, esta ausencia de cambios es debido a la alta homogeneidad de los resultados observados en MM-1 y opuestamente, a la gran variabilidad asociada a los resultados derivados de U-937 (**Figura 33A**). Centrándonos en el resto de las líneas, tanto las HL-60 como las Molm-13 transducidas con LAPTM4B incrementaron notablemente la fase S frente al control, y a expensas de una reducción de la fase G2. Aunque en el caso de las Molm-13 dicha reducción no fue significativa. Contrariamente, en la línea K-562 se produjo un aumento de la fase G1 y una disminución de la fase S en las células transducidas con LAPTM4B en comparación con las parentales. No se detectaron diferencias entre las dos isoformas de LAPTM4B en ninguno de los casos comentados (**Figura 33B**).

Durante la fase S del ciclo celular el ADN celular se replicará, generando una copia de todo su material genético. El ciclo celular cuenta con numerosos mecanismos de control y reparación del ADN, pero uno de los principales protagonistas es el factor de transcripción p53, el cual regula la expresión de proteínas inhibitorias como p21, promueve el arresto en el crecimiento o incluso la muerte celular cuando existen daños severos. Asimismo, la proteína p21 permite el avance del ciclo celular desde la fase S, mediante la regulación de la proteína CDK2 (Mercadante & Kasi, 2022).

Tras detectar cambios en esta fase al sobreexpresar LAPTM4B, se procedió a explorar la expresión de la proteína p21 para tratar de esclarecer los resultados obtenidos. En este caso, se determinó la expresión de p21 a nivel de ARNm en las líneas HL-60, MM-1 y U-937 (**Figura 33C**). Como es posible observar en la representación obtenida, la expresión de p21 aumenta significativamente para HL-60 y tiene tendencia a disminuir para MM-1 y U-937, en las líneas transducidas con LAPTM4B respecto al control. Una vez más, no existen diferencias entre la expresión derivada de ambas isoformas de LAPTM4B.

Aunque la heterogeneidad de los resultados entre las diferentes líneas complica la interpretación de los mismos, se han podido detectar cambios en diferentes fases del ciclo. En líneas generales, parece incrementarse la fase S tras la sobreexpresión de LAPTM4B en algunas de las líneas de LMA. En conjunto, estos resultados sugieren que una alta expresión de LAPTM4B podría producir desajustes, todavía inciertos, en el proceso del ciclo celular, y que dichos procesos podrían estar mediados directa o indirectamente por p21.

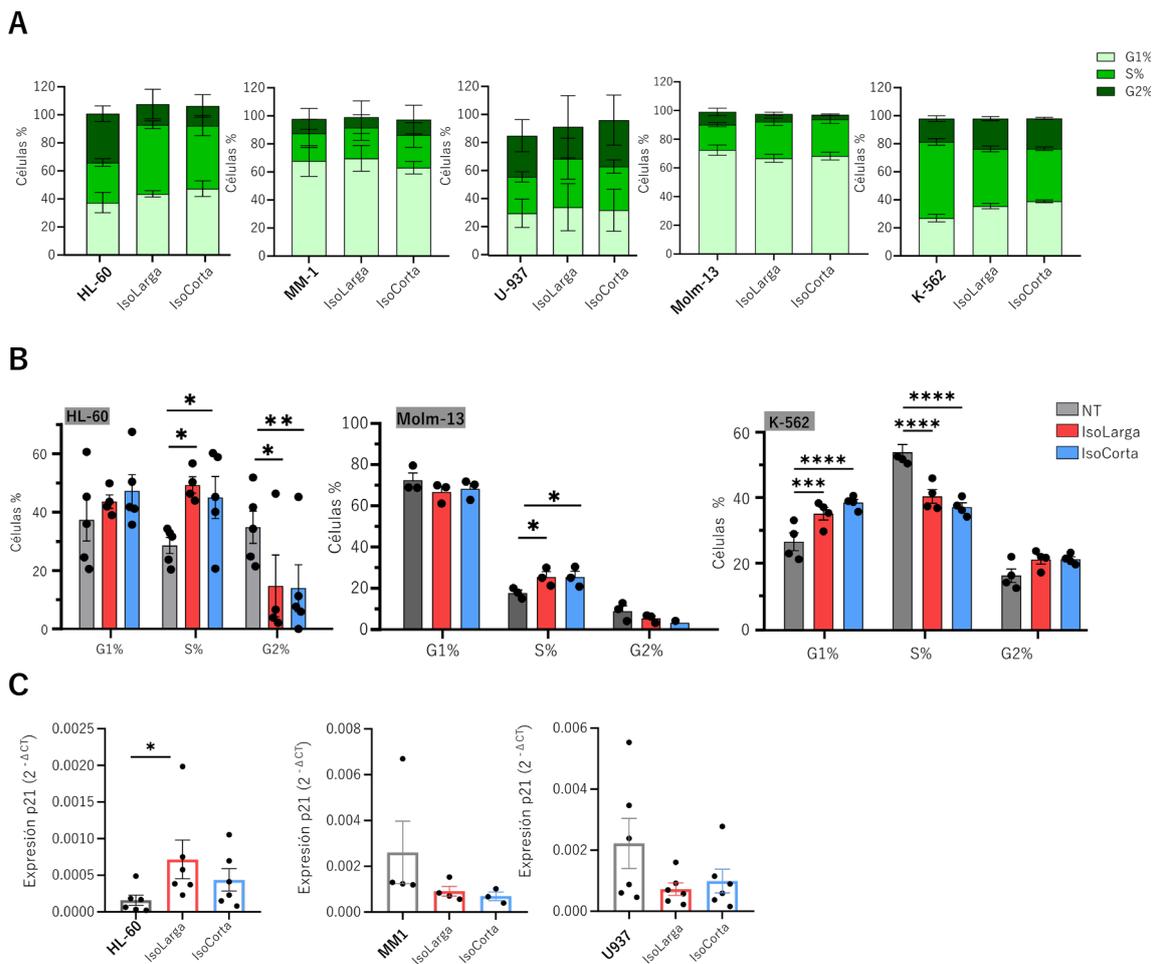


Figura 33. La sobreexpresión de LAPTM4B produce desajustes en el ciclo celular posiblemente a través de p21. Para sincronizar los ciclos celulares, las células mencionadas en cada caso, sin transducir o transducidas con LAPTM4B (largo y corto), se cultivaron durante 18h en medio desprovisto de suero y posteriormente, se usó etanol frío para su fijación. El análisis del ciclo celular se ha adquirido mediante citometría de flujo y se ha representado como **A)** el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular y **B)** muestra de las diferencias estadísticamente significativas. **C)** Expresión génica de p21 analizada por RT-PCR semi-cuantitativa respecto al gen de referencia GAPDH. Los gráficos de barras indican la media de expresión génica de tres réplicas de al menos tres experimentos independientes \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

- **LAPTM4B y su efecto en la proliferación**

A causa de la conexión entre el ciclo celular y la proliferación, analizamos la posible implicación de LAPTM4B en la capacidad proliferativa en LMA. En este marco, se midió la proliferación de forma indirecta a día 0, 2 y 4 mediante la sonda vital DiI, la cual marca de forma inespecífica los lípidos de membrana celular y se disipa conforme las células se dividen en su proceso proliferativo.

Según muestra la **Figura 34**, no se dieron cambios significativos en la proliferación entre las células transducidas con LAPTM4B y sin transducir, para ninguna línea celular a lo largo del experimento. Del mismo modo, tampoco existen diferencias entre las distintas isoformas de LAPTM4B. Concretamente, en el caso de la línea HL-60, las células control mostraron un incremento en la capacidad proliferativa el día 2 del experimento, que luego perdieron hacia el día 4. Mientras que las HL-60 transducidas, no sufrieron incrementos en dicha capacidad a lo largo del experimento. En cambio, la proliferación detectada en MM-1 y U-937 resultó muy similar entre las células transducidas y su control, aunque ligeramente menor en las células control a día 2 o 4 (**Figura 34A**). Para apreciar en detalle las diferencias entre las células transducidas y la no transducidas, en la **Figura 34B** representamos únicamente la proliferación medida a día 4. Aunque no hay diferencias significativas entre las células con expresión ectópica frente a las parentales, ni entre ambas isoformas, se detectó que las células HL-60 son las que menor capacidad proliferativa presentan entre las líneas evaluadas.

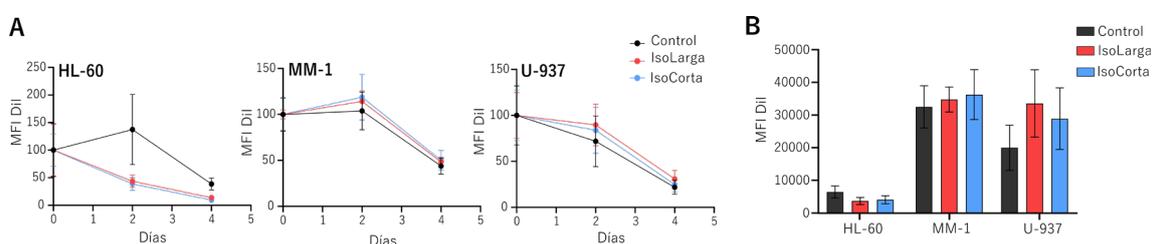


Figura 34. LAPTM4B no afecta la proliferación *in vitro* de las células de LMA transducidas. La proliferación de las células HL-60, MM-1 y U-937 transducidas con el vector vacío o con LAPTM4B (largo o corto) se determinó mediante citometría de flujo mediante el uso de la sonda vital DiI y está representada como **A**) el valor de la MFI a día 0, 2 y 4; y como **B**) el valor de la MFI a día 4. La media de triplicados \pm SEM de tres experimentos independientes se han representado con puntos en A) y barras en B).

Por tanto, se podría concluir que LAPTM4B no modifica la proliferación *in vitro* de las células de LMA transducidas.

Continuando con este conjunto de experimentos para evaluar el papel de LAPTM4B en LMA, resultó interesante analizar la capacidad migratoria de las células con expresión ectópica de LAPTM4B. Igualmente, trabajos previos señalan que una alta expresión de LAPTM4B promueve la migración y la invasión en células cancerígenas (X. Li et al., 2010).

Con el fin de evaluar la capacidad migratoria en células de LMA, se ha estudiado la expresión del receptor de membrana CXCR4 (CD184), el cual es un elemento importante en la migración celular y se encuentra en la mayoría de las células madre cancerígenas (Ratajczak et al., 2006), incluidas las LSCs en LMA (L. Su et al., 2021). Dada su importancia en estos procesos, podría ser una buena diana terapéutica para promover la migración celular desde la médula ósea hacia la sangre, donde las células leucémicas serán más fácilmente eliminadas (L. Su et al., 2021; Tavor et al., 2004).

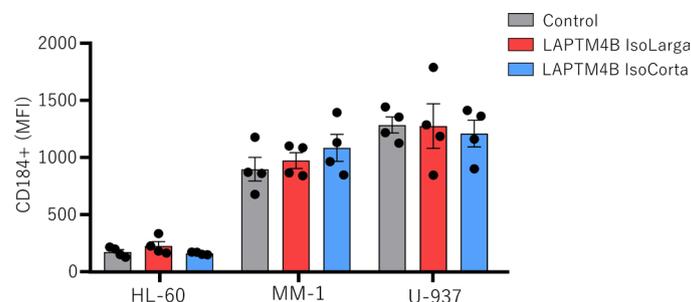


Figura 35. LAPTM4B no induce diferencialmente la expresión del receptor CD184 (CXCR4). Se ha empleado la citometría de flujo para analizar la expresión de CD184 en células HL-60, MM-1 y U-937 no transducidas (NT) y transducidas con LAPTM4B (largo o corto) en condiciones basales (n=4). La media de triplicados de los cuatro experimentos independientes \pm SEM está representado mediante barras donde los puntos indican la media de cada experimento.

Contrariamente a lo esperado, en ninguna de las líneas celulares estudiadas se detectaron diferencias significativas entre las células con expresión ectópica de LAPTM4B respecto a su control. Los niveles de CD184 detectados para las diferentes isoformas también fueron homogéneos entre ellas en todos los tipos celulares. De nuevo, la línea HL-60 resultó ser la de menor capacidad migratoria de

las empleadas en este estudio. Mientras que MM-1 y U-937 poseen una capacidad similar de migración según el marcador evaluado (**Figura 35**).

4.5. Papel de LAPTM4B en leucemogénesis

Una vez explorados los principales efectos de la sobreexpresión de LAPTM4B en líneas celulares de LMA, podemos afirmar que en el contexto leucémico LAPTM4B potencia ciertas vías de señalización implicadas en cáncer y produce desajustes en el ciclo celular sin afectar la proliferación o la migración celular *in vitro*. Por ello, decidimos explorar en detalle sus efectos en términos de leucemogénesis, es decir, la implicación de LAPTM4B en el origen de la enfermedad.

Debido a que actualmente no existe unanimidad sobre el fenotipo de las LSCs, poder cultivarlas *in vitro* aisladas del resto de la población hematopoyética es meramente imposible. Partiendo de que las LSCs se definen por su funcionalidad, los ensayos clonogénicos son la aproximación técnica más fiel para su estudio, puesto que consisten en la evaluación del potencial proliferativo y generador de colonias mediante el cultivo celular (“Cancer Stem Cells,” 2018).

Las células HL-60, MM-1, U-937, K-562 y Molm-13 no transducidas y transducidas con LAPTM4B, se sembraron en un medio semisólido rico en citoquinas instructivas. Transcurridos 10 días, fueron contadas las colonias desarrolladas por las células y se observaron diferentes resultados en función del contexto celular (**Figura 36**). En el caso de HL-60, ambas isoformas mostraron un potencial clonogénico inferior a las parentales, sin diferencias entre ellas. En cuanto a la línea MM-1, se detectó el mismo efecto de disminución en la capacidad generadora de colonias descrito anteriormente, pero únicamente en las células transducidas con la isoforma larga de LAPTM4B respecto al control. Mientras que, la isoforma corta mostró un patrón similar al control. En cambio, las líneas U-937, K-562 y Molm-13 no mostraron diferencias significativas entre las células transducidas y el control, ni tampoco entre las diferentes isoformas.

Dicha heterogeneidad puede ser debida a los múltiples factores derivados del estudio de la clonogenicidad a nivel basal, y la ausencia de un tratamiento específico frente a nuestra proteína diana, dificulta la comparación. En definitiva, las diferencias manifestadas aquí parecen apuntar hacia un ligero descenso o una

ausencia de cambio en la capacidad de autorrenovación *in vitro* en presencia de LAPTM4B.

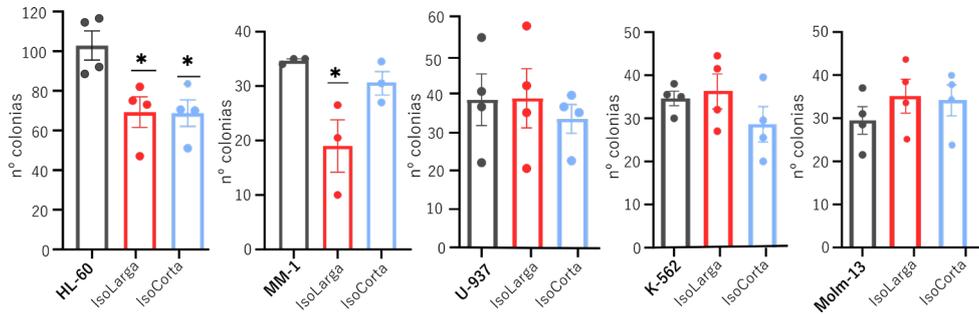


Figura 36. La capacidad clonogénica de las células transducidas con LAPTM4B varía según el contexto celular. Células HL-60, MM-1, U-937, K-562 y Molm-13 no transducidas y transducidas con LAPTM4B (largo y corto) se sembraron en un medio semisólido que contiene citoquinas instructivas y tras 10 días se contaron de forma manual. Las barras indican la media de colonias de duplicados de al menos 3 experimentos independientes \pm SEM. Cada punto indica la media de un experimento. * $p < 0,05$.

Con la finalidad de medir el potencial de leucemogénesis y alcanzar una mejor comprensión de dicho proceso a nivel fisiológico, se emplearon modelos de xenotrasplante de células humanas en ratones inmunodeficientes adultos NSG (NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ) condicionados farmacológicamente con busulfán para la aceptación del injerto.

En primer lugar, la línea celular HL-60 fue transducida con el vector pLL-EF1 α -rFLuc-T2A-GFP (HL-60 rLuc), de esta forma conseguimos seguir la evolución del injerto celular presente en cada ratón durante el periodo experimental. Una vez transducidas las células y los ratones condicionados farmacológicamente, se inyectaron las células por vía intravenosa y se dejaron 20 días para que proliferasen. A lo largo de este tiempo, se realizaron pesajes e imágenes de seguimiento para evaluar la evolución del injerto celular y garantizar el bienestar animal (**Figura 37A**). La imagen presentada en la **Figura 37A**, tomada el día 14 del experimento, revela una gran y amplia distribución del injerto celular en los ratones adultos inyectados con células transducidas con LAPTM4B, medido por luminiscencia. Asimismo, se aprecian diferencias ligadas al sexo, puesto que las hembras mostraron una mayor afectación, detectada por una mayor superficie con presencia de células cancerígenas, en comparación con los machos e indistintamente de la isoforma de

LAPTM4B sobreexpresada. En cambio, en el caso de los animales control a penas se detectaron células HL-60 distribuidas por el organismo de los animales, a excepción de una pequeña acumulación cercana al lugar donde se realizó la inyección intravenosa.

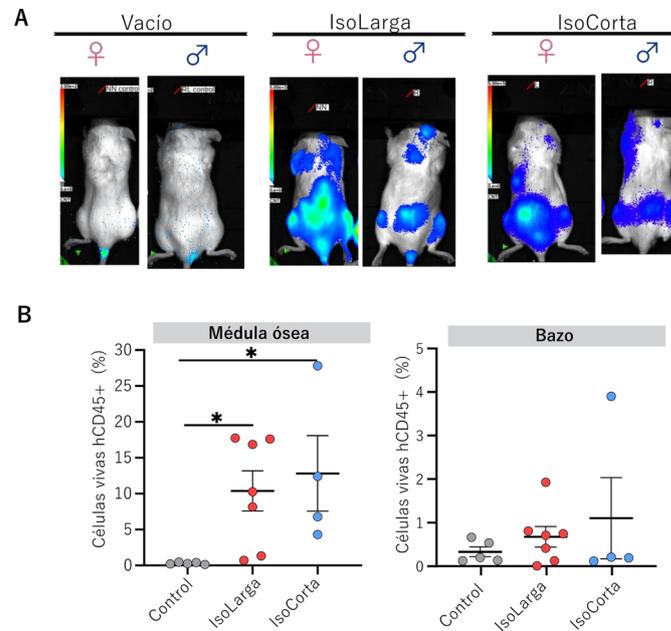


Figura 37. LAPT4B incrementa la capacidad leucemogénica in vivo. Se inyectaron vía intravenosa células HL-60 rLuc (HL-60 rLuc, n=18) a ratones NSG adultos previamente condicionados farmacológicamente, pasados 20 días se sacrificaron y se analizaron los resultados. **A)** Imagen representativa de un animal de cada jaula obtenida por detección de luminiscencia 14 días después de la inyección de células. **B)** Porcentaje de células hCD45+ detectadas al final del experimento en médula ósea o bazo por citometría de flujo. Las barras indican la media de los valores de cada tipo de células y los puntos el valor derivado de cada ratón. *p<0,05.

Tras pasar el tiempo de injerto determinado, se obtuvieron las células hematopoyéticas derivadas de la tibia y fémur, y del bazo y se analizaron y cuantificaron las células de interés (hCD45+ y GFP+, por la presencia de *Emerald*), fácilmente identificables por citometría de flujo. En concordancia con el resultado anterior, la cuantificación de células humanas obtenidas al final del experimento, confirmaron un aumento significativo de las células transducidas con la isoforma larga o corta frente a las células control en médula ósea. Con la finalidad de medir la capacidad de migración de dichas células, también se cuantificaron las células derivadas del bazo de los animales. En este caso, no se detectaron diferencias significativas entre las células transducidas y el control, aunque se detecta un ligero

aumento de las transducidas. En ambos casos, la capacidad de injerto se detecta de forma levemente más notable en el caso de la isoforma corta de LAPTM4B, sin poder estadístico suficiente para confirmarlo (**Figura 37B**).

En vista a estos resultados, se podría concluir que la sobreexpresión de LAPTM4B provoca un incremento en la capacidad de migración y proliferación *in vivo*, aumentando la capacidad leucemogénica en médula ósea y posiblemente en bazo.

Una vez observadas estas diferencias respecto a la capacidad proliferativa y clonogénica *in vivo*, se plantearon experimentos alternativos con la finalidad de confirmar y ampliar estos hallazgos. En este caso realizamos ensayos de competición, estos experimentos resultan de interés puesto que reducen la gran variabilidad asociada a los experimentos *in vivo*, dado que cada ratón se concibe como un control interno. Para ello, se trabajó de nuevo con xenotrasplante de células humanas en ratones inmunodeficientes NSG (NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ) condicionados con busulfán.

Para dicha competición, se inyectó en cada animal un número equivalente de células control (pULTRA-pSmurf) y de células de interés (pCDH-*Emerald*, pCHD-*Emerald*-LAPTM4B IsoLarga o pCHD-*Emerald*-LAPTM4B IsoCorta) correspondientes a las líneas HL-60, MM-1 o U-937 (**Figura 38A**). El cumplimiento de aproximadamente un 50-50% en las proporciones celulares, fue validado por citometría de flujo con anterioridad a la inyección de las células, como podemos ver para el caso de las células HL-60 en la **Figura 38B**. Tras la inyección, se dejaron proliferar las células de 15 a 27 días (según la línea celular) hasta desarrollar leucemia. Transcurrido el tiempo indicado de injerto, se extrajeron las células hematopoyéticas procedentes de la tibia y fémur, y del bazo. De igual forma a los análisis explicados en el apartado anterior, las células se pudieron separar y cuantificar por citometría de flujo gracias a la presencia de los marcadores Smurf, para las células control, y *Emerald* (GFP), para las células de interés.

En todas las líneas celulares, los ratones trasplantados con los vectores pSmurf y pCDH-*Emerald* vacío (Control), presentan una capacidad de injerto similar para

ambas poblaciones celulares, como se puede observar en los gráficos de barras (aproximadamente 50-50%). Este hecho confirma que las diferentes transducciones no han alterado los procesos leucemogénicos y por ello, constituye el control interno del injerto (**Figura 38 C, D y E**).

En cuanto a la capacidad de injerto, nuevamente observamos resultados heterogéneos entre las distintas líneas celulares. Los ratones trasplantados con células HL-60 y MM-1 transducidas con LAPTM4B presentan un aumento del potencial leucemogénico respecto a los transducidos con los controles, tanto en médula ósea como en bazo, como se puede apreciar en las **Figura 38 C y D (gráficos con círculos)**, donde se han cuantificado las células hCD45+, marcador exclusivo de células humanas. Aunque que no se dan diferencias obvias entre ambas isoformas de LAPTM4B en estos casos, en MM-1 las células transducidas con la isoforma corta de LAPTM4B presentaron mayor capacidad leucemogénica frente al control que la larga.

En cambio, la línea U-937 mostró el patrón opuesto. Tanto en médula ósea como en bazo, se detecta un menor porcentaje de células con sobreexpresión de LAPTM4B frente a la línea parental. En ambas localizaciones, las células que expresan ectópicamente la isoforma corta de LAPTM4B son levemente superiores a la isoforma larga en su capacidad de injerto. Aunque en médula ósea esta diferencia no resultó significativa, en el bazo la disminución en el porcentaje de células hCD45+ detectada en la isoforma larga frente a la corta fue estadísticamente significativa (**Figura 38E**).

Al cuantificar dentro de este conjunto de células hCD45+ las poblaciones marcadas con Smurf o *Emerald*, podemos detectar cómo el porcentaje de células de interés (*Emerald*) no es tan elevado al esperado según la representación mediante círculos descrita previamente. En ocasiones, como en el caso de la isoforma larga en MM-1, el porcentaje de células *Emerald* es incluso menor al de células Smurf (**Figura 38 C y D, gráficos de barras**). Este llamativo hecho, se podría explicar como un potencial efecto en trans de LAPTM4B, lo que significaría que la sobreexpresión de

LAPTM4B aumenta el potencial de injerto tanto de las células transducidas, como de las acompañantes (Smurf), mediante la secreción de algún factor soluble que potenciasse el efecto proliferativo, causando un efecto auto y paracrino. Asimismo, según lo observado en la **Figura 19B**, otra explicación plausible sería la separación, por causas desconocidas, entre la proteína LAPTM4B y *Emerald*. En este caso, la detección de LAPTM4B mediante las células GFP+ estaría infravalorada. Particularmente, este efecto se observa en las líneas de LMA, de forma muy significativa en MM-1 y con cierta tendencia en HL-60. En cambio, en la línea U-937 la sobreexpresión de LAPTM4B disminuye la capacidad de injerto (**Figura 38E**). Estos resultados podrían ser atribuibles al hecho de que esta línea en realidad no deriva de una LMA, sino de un linfoma histocístico y, por tanto, podría cursar con diferentes fenotipos malignos en el contexto fisiológico de la enfermedad.

Sin embargo, pese a la ausencia de evidencias *in vitro*, podríamos concluir que en LMA LAPTM4B incrementa la capacidad proliferativa y migratoria de las células leucémicas en médula ósea, mientras que no se aprecia una superioridad clara entre las dos isoformas en la capacidad de generar de *novo* la enfermedad *in vivo*. Respecto al bazo, la cuantificación de los distintos tipos de células (Smurf y *Emerald*) podría ser menos precisa al analizar la baja cantidad de células hCD45+ presentes en este órgano, aun así, el efecto parece ser equivalente al observado en médula ósea, presentando un potencial incremento en la capacidad de injerto en las células de LMA transducidas con LAPTM4B. El microambiente tumoral recreado en animales de experimentación es la representación más fiel del cuerpo humano que disponemos en investigación, por lo que es frecuente detectar efectos no observados previamente *in vitro*.

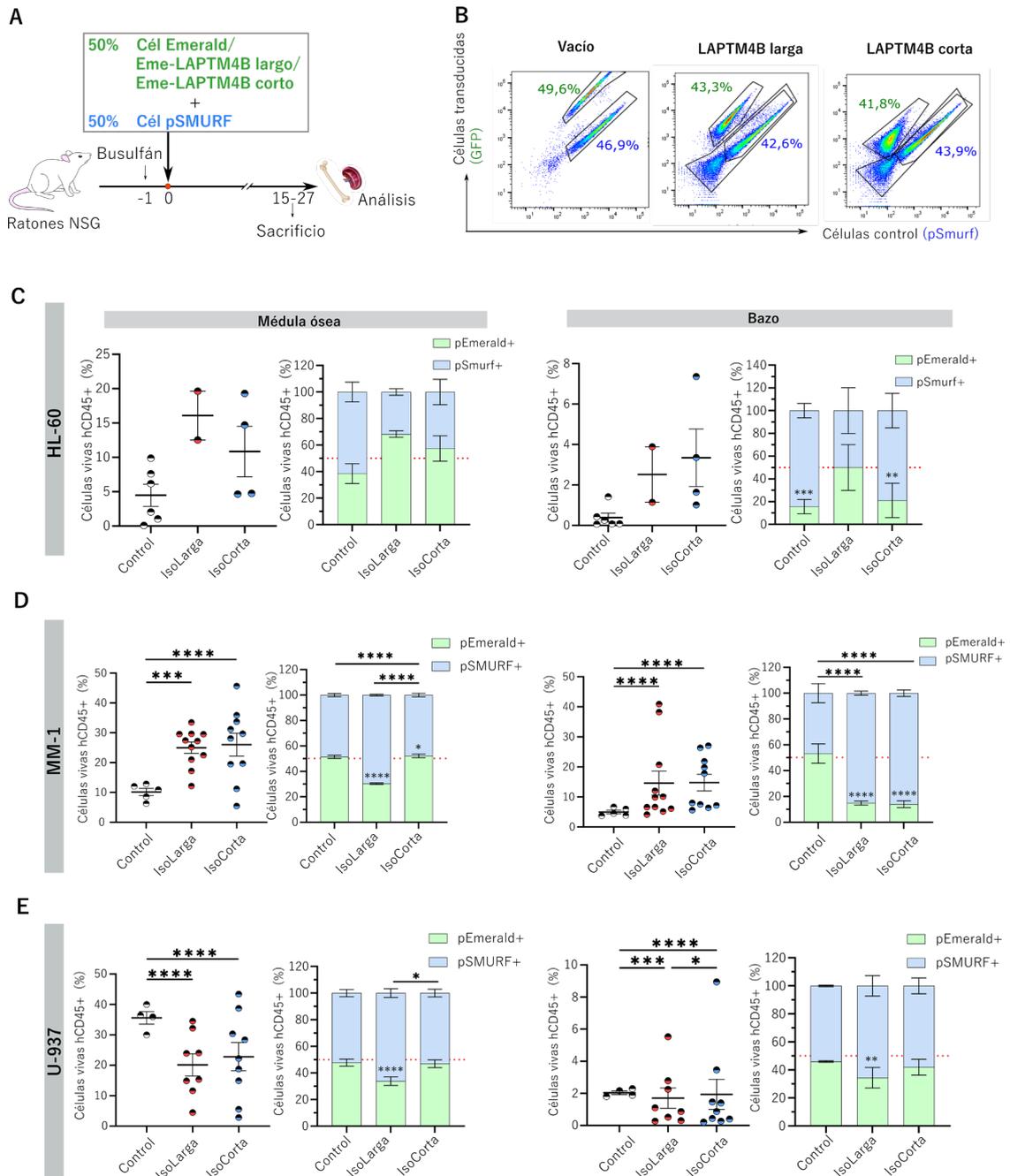


Figura 38. La presencia de LAPTM4B aumenta la capacidad leucemogénica de la LMA. A)

Un número equitativo de células pULTRA-Smurf y pCDH-Emerald o pCDH-Emerald-LAPTM4B (largo o corto) fue inyectado por vía intravenosa en ratones NSG previamente condicionados con busulfán. Las líneas celulares empleadas fueron HL-60, MM-1 y U-937. Pasado el tiempo de injerto, se sacrificaron los ratones y se analizó la médula ósea y el bazo. **B)** Histogramas representativos de las poblaciones de células HL-60, previamente a la inyección intravenosa y analizados mediante citometría de flujo. **C, D, E)** Análisis de las distintas poblaciones celulares obtenidas de la médula ósea y bazo (C = HL-60, D = MM-1, E = U-937). Los primeros gráficos, en cada caso, representan el porcentaje de células vivas hCD45+ para cada grupo de animales, donde las líneas representan el valor medio y cada círculo corresponde con un ratón. Los gráficos de barras indican la media del porcentaje de células evaluado con cada marcador (azul para pSmurf y verde para las células de interés, Emerald=GFP+), dentro de la subpoblación de células hCD45+, de todos los ratones \pm SEM y con la corrección de los valores al 100%. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

4.6. Papel de LAPTM4B en quimiorresistencia

Atendiendo a la alta frecuencia y gravedad de las recaídas en LMA (Thol & Ganser, 2020), y siendo la quimiorresistencia la causa principal de las mismas (Trumpp & Haas, 2022), así como, de la muerte de los pacientes (Levin et al., 2021), resulta de vital importancia estudiar el papel de LAPTM4B en los procesos de quimiorresistencia.

4.6.1. Sensibilidad a quimioterapia en células con sobreexpresión de LAPTM4B

Estudios previos relacionan a LAPTM4B con un aumento de la resistencia a antraciclinas en cáncer de mama (Y. Li et al., 2011), a regímenes basados en cisplatino en carcinoma epitelial de ovario (M. Yin et al., 2011) o a diferentes tratamientos en varios tumores sólidos (Rehman et al., 2019). Por ello, en primer lugar, se ha evaluado la respuesta de las líneas celulares HL-60, MM-1 y U-937 a tres de los compuestos utilizados en clínica para combatir la LMA: las antraciclinas doxorubicina (Doxo) y daunorrubicina (Dauno) y el fármaco por excelencia, citarabina (AraC).

Según como muestra la **Figura 39A**, la citotoxicidad asociada tanto a daunorrubicina como a doxorubicina fue similar entre las células transducidas y las células control, así como, entre ambas isoformas de LAPTM4B de todas las líneas celulares testadas. Igualmente, las diferentes líneas celulares evaluadas mostraron una sensibilidad similar ante los tratamientos. Ante la ausencia de cambios asociados a LAPTM4B tras el tratamiento de daunorrubicina o doxorubicina, decidimos no continuar con su exploración.

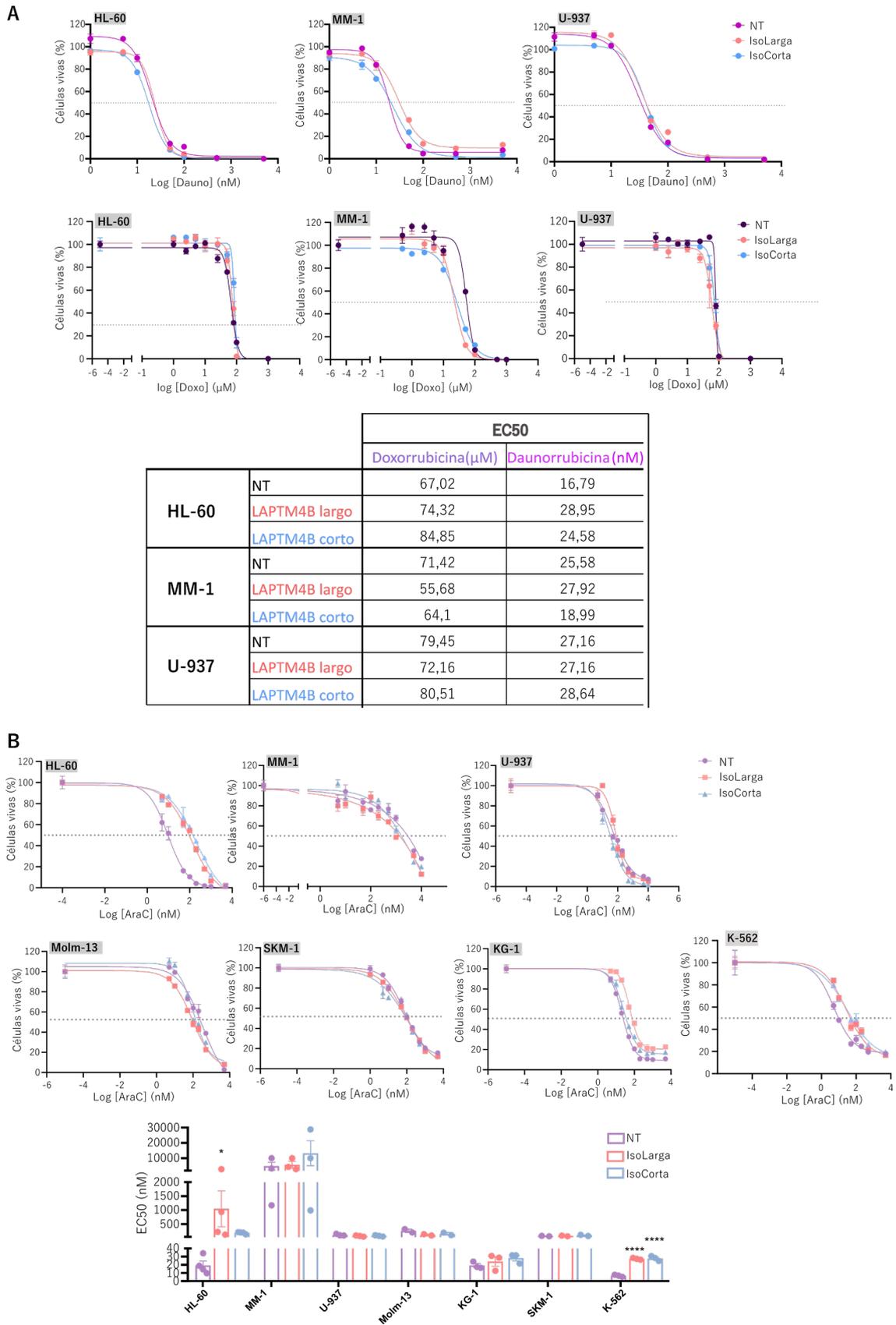


Figura 39. Las células HL-60, KG-1 y K-562 transducidas con LAPTM4B presentan una mayor resistencia al tratamiento con citarabina. Las líneas celulares indicadas anteriormente, no

transducidas (NT) y transducidas con LAPTM4B largo o corto, se trataron 48h a dosis crecientes de **A)** doxorubicina (Doxo) y daunorrubicina (Dauno) y **B)** citarabina (AraC). La viabilidad se analizó por citometría de flujo y se calculó el valor de las EC50. Las gráficas presentan una réplica representativa de tres experimentos independientes, en la que cada punto es la media de triplicados de un experimento independiente \pm SEM. La media del valor de la EC50 para cuatro experimentos independientes en el caso de HL-60, dos para SKM-1 y tres para el resto, se ha representado mediante barras. * $p < 0,05$; *** $p < 0,0001$.

En cambio, la citarabina ejerció potentes efectos diferenciales en algunas de las líneas celulares evaluadas (**Figura 39B**). En la línea HL-60, las células transducidas con LAPTM4B mostraron una gran resistencia a este fármaco frente a la sensibilidad asociada comúnmente a este tipo celular. El incremento en la resistencia es ligeramente mayor en las células con expresión ectópica de la isoforma larga, aunque no existen diferencias significativas entre ambas isoformas. Del mismo modo, este efecto se detectó en la línea de LMC, K-562, incrementando de forma significativa la resistencia a AraC tras la sobreexpresión de LAPTM4B respecto a las parentales y en este caso, de forma equitativa entre la isoforma corta y larga de LAPTM4B. Por último, según podemos observar en el histograma representativo para las células KG-1, se da una ligera tendencia al incremento de la resistencia en las células transducidas respecto a su control, pero dicha diferencia carece de poder estadístico por lo que no podemos afirmarla. En cambio, en el resto de las líneas celulares evaluadas: MM-1, U-937, SKM-1 y Molm-13, no se detectaron diferencias de resistencia/sensibilidad entre las células transducidas y las parentales, y de todas ellas, la más resistente resultó la línea MM-1. Posiblemente, la resistencia intrínseca a citarabina asociada a dichas líneas dificulta que se produzca un incremento de la misma al sobreexpresar LAPTM4B.

En suma, se puede concluir que la sobreexpresión de LAPTM4B está correlacionada con un aumento de resistencia a citarabina en aquellas líneas celulares con capacidad de aumentar su resistencia.

4.6.2. Implicación de LAPTM4B en la resistencia a citarabina

Para averiguar si los incrementos en la resistencia a la citarabina observados anteriormente podrían estar causados por la sobreexpresión de LAPTM4B, se

escogió la línea de LMA HL-60 resistente a citarabina, generada por nuestro laboratorio (**Figura 10**).

La participación de LPTM4B en la resistencia a quimioterapia fue determinada analizando la expresión a nivel de ARNm y de proteína de las células HL-60 parentales y resistentes. La línea HL-60 AraC R no presentó cambios en la expresión génica de LPTM4B respecto a la línea parental, y ambas isoformas de LPTM4B mostraron los mismos niveles en las diferentes células (**Figura 40A**). Por otro lado, en el análisis proteico, el nivel de LPTM4B fue menor al límite de sensibilidad de la técnica o no expresado en ninguno de los casos (**Figura 40B**).

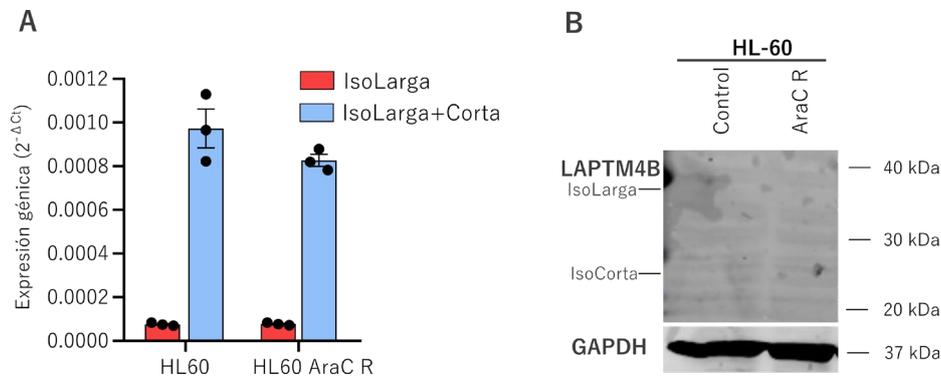


Figura 40. La línea celular HL-60 resistente a citarabina no presenta sobreexpresión de LPTM4B. Se analizó la expresión de LPTM4B de las células HL-60 parentales y resistentes a citarabina **A)** a nivel de ARNm por RT-PCR, normalizado frente a GAPDH y **B)** a nivel de proteína por WB, usando GAPDH como control de expresión. Las barras indican la media de triplicados de experimentos independientes \pm SEM. R: resistentes.

En suma, las células HL-60 resistentes a citarabina presentan una expresión de *LPTM4B* similar a las parentales. Cabe mencionar que, la ausencia de sobreexpresión de LPTM4B en estas células no implica que LPTM4B no esté implicado en la quimiorresistencia, sino que estas células resistentes no han adquirido dicha resistencia a través de este mecanismo.

Dado que son múltiples los factores que propician la quimiorresistencia, como los asociados a proteínas, la resistencia ligada a alteraciones genéticas, a microRNAs o a vías de señalización (J. Zhang et al., 2019), en base a nuestros resultados previos, decidimos estudiar aquellos posibles mecanismos relacionados con la resistencia observada en LPTM4B.

4.6.2.1. Hiperactivación de la vía MAPK

En primer lugar, exploramos la posible relación entre el incremento en la actividad de la vía de las MAPK y su relación con la quimiorresistencia. Como observamos en la **Figura 29**, las células HL-60 transducidas con LAPTM4B mostraron una mayor sensibilidad y disminuyeron la actividad de la vía MAPK ante el inhibidor de PI3K, Ly294-002. Para poder determinar si este proceso afecta a la resistencia a fármacos, las células HL-60 se trataron simultáneamente con Ly294-002 y citarabina a diferentes dosis.

Los resultados derivados de este análisis no mostraron diferencias entre la citotoxicidad mediada por citarabina frente al tratamiento combinado de AraC con Ly294-002, ni en las células parentales ni en las transducidas (**Figura 41**). En concordancia, descartamos la hiperactivación de la vía MEK-Erk como mecanismo principal de quimiorresistencia en el caso de LAPTM4B, aunque un aumento de la actividad en esta vía (Salaroglio et al., 2019) o en las vías de señalización PI3K/Akt podrían estar implicadas en este proceso (L. Li et al., 2010; R. Liu et al., 2020).

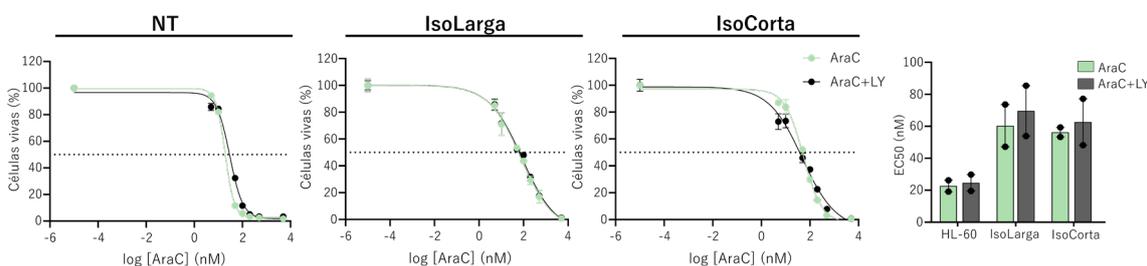


Figura 41. El tratamiento combinado de citarabina y Ly294-002 no restaura la sensibilidad a citarabina en las células HL-60 con sobreexpresión de LAPTM4B. Las células HL-60 no transducidas (NT) y transducidas con LAPTM4B (largo y corto) se trataron 48h a dosis crecientes de citarabina (AraC) o con las mismas dosis de citarabina más el inhibidor de PI3K (Ly294-002) 10 μ M (AraC+LY). La viabilidad se analizó por citometría de flujo y se calculó el valor de la EC50. Las gráficas muestran una réplica representativa de dos experimentos independientes, donde cada punto es la media de triplicados de un experimento independiente \pm SEM. Los gráficos de barras indican los valores numéricos de las EC50 calculadas \pm SEM (n=3), cada punto indica el valor de un experimento.

4.6.2.2. Aumento de autofagia

Una vez descartada la señalización como responsable principal del fomento en la resistencia a citarabina, se procedió a evaluar si los sutiles cambios observados en la **Figura 25** podrían evidenciar un papel de la autofagia mediada por LAPTM4B en la

quimiorresistencia. En trabajos anteriores, se ha indicado una relación entre la autofagia y la quimiorresistencia mediante la interacción entre EGFR y LAPTM4B (Chu et al., 2019; Wu & Zhang, 2020). Alternativamente, la autofagia podría proteger a las células de la muerte celular por apoptosis en presencia de fármacos y de este modo, generar resistencia a los fármacos (Dupéré-Richer et al., 2013; D. Liu et al., 2011).

Para este análisis tratamos a las células HL-60 y MM-1 con el inhibidor de autofagia, cloroquina, junto con diferentes dosis de AraC. Según se observa en la **Figura 42**, en las células HL-60, únicamente las células transducidas con la isoforma larga de LAPTM4B recuperaron parcialmente la sensibilidad a citarabina al tratar con dicha combinación. Aunque esta disminución en la viabilidad también se detecta en el caso de la isoforma corta, no parecer ser suficiente para ser significativo. Por otro lado, en la línea resistente a citarabina, MM-1, tanto las células parentales como las transducidas disminuyeron notablemente su resistencia, aunque de forma similar entre ellas.

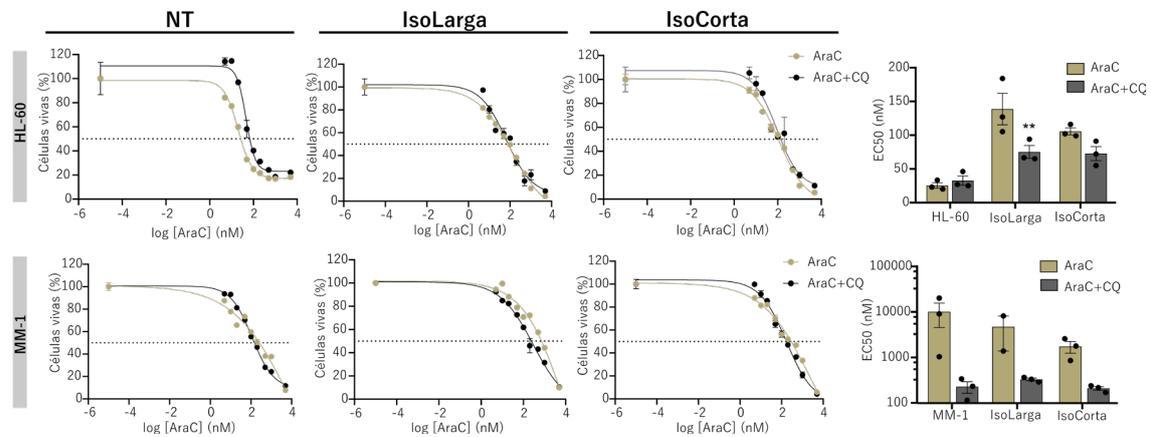


Figura 42. El tratamiento combinado de citarabina y cloroquina resensibiliza a las células HL-60 con sobreexpresión de LAPTM4B. Las células HL-60 y MM-1 no transducidas (NT) y transducidas con LAPTM4B largo y corto se trataron 48h a dosis crecientes de citarabina (AraC) o con las mismas dosis de citarabina más cloroquina (25 μ M para HL-60 y 15 μ M en MM-1) (AraC+CQ). La viabilidad se analizó por citometría de flujo y se calculó el valor de la EC50. Las gráficas presentan una réplica representativa de tres experimentos independientes, donde cada punto es la media de triplicados de un experimento independiente \pm SEM. Los gráficos de barras indican los valores numéricos de las EC50 calculadas \pm SEM (n=3), cada punto indica el valor de un experimento. **p<0,01.

En resumen, se ha corroborado el efecto quimiosensibilizador de la cloroquina (Chang & Zou, 2020; Chu et al., 2019). Pero, más interesante, se ha demostrado que este efecto es dependiente de LAPTM4B en el caso de HL-60, por lo que LAPTM4B podría participar en la generación de quimiorresistencia mediante la modulación de la autofagia.

4.6.2.3. Implicación de ATR en quimiorresistencia

Puesto que el incremento de autofagia no explica totalmente el aumento en la quimiorresistencia y en vista a los cambios observados en el ciclo celular, estudiamos el potencial del inhibidor de ATR (del inglés *ATM and Rad3-related*), elimusertib, como sensibilizador de las células a los tratamientos quimioterapéuticos.

Los daños en el ADN (DDR) pueden estar producidos por múltiples causas tanto endógenas, derivadas por ejemplo de una incorrecta replicación del ADN (Ragu et al., 2020), como exógenas, como las causadas por quimioterapia (Woods & Turchi, 2013). Dichos daños inducen la activación de ATM (del inglés *Ataxia Telangiectasia Mutated*) y ATR, que desencadenarán una cascada de señalización con resultados como: arresto en el ciclo celular, apoptosis o entrada en senescencia (Barnieh et al., 2021; Cuesta-Casanovas, 2022; Di Micco et al., 2021) **(Figura 43)**.

En este caso, se ha evaluado la acción del fármaco elimusertib en células HL-60, MonoMac-1 y U-937 tratadas con dosis crecientes de AraC, mediante el análisis de la viabilidad celular por citometría de flujo. Paralelamente, se ha medido el estado senescente de las células por detección de SA- β -gal, secretada por las células senescentes (Di Micco et al., 2021), en estado basal y tratando con AraC durante dos días consecutivos, con el fin de dilucidar si LAPTM4B promueve la resistencia farmacológica mediante la entrada en senescencia.

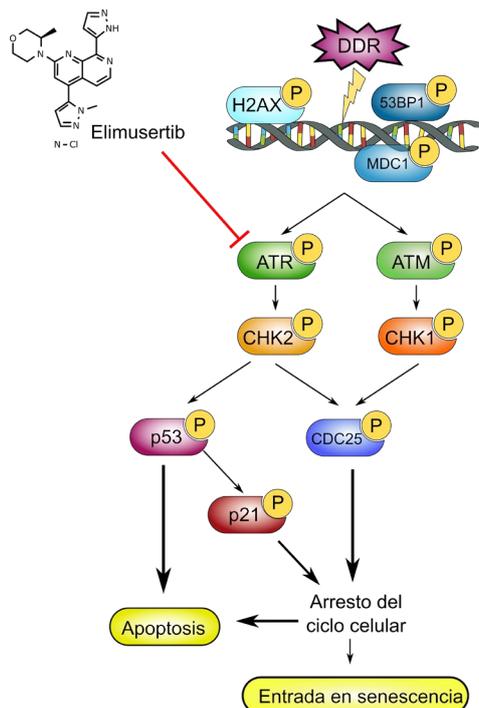


Figura 43. Modelo de señalización de ATR y ATM por daños en el ADN. Basado en: (Barnieh et al., 2021; Di Micco et al., 2021). Las flechas negras señalan progresión de la señalización y la roja inhibición; las P simbolizan fosforilación y activación de proteína. Elimusertib: inhibidor de ATR.

Primeramente, se ha demostrado que el tratamiento con elimusertib sensibiliza a citarabina en todas las líneas celulares evaluadas (**Figura 44 A, B y C**). En el caso de HL-60, la disminución de la EC50 tras el tratamiento combinado frente a AraC, fue diferente dependiendo del nivel de resistencia de partida en cada caso. En el caso de las células control, el descenso en la resistencia frente al tratamiento con AraC fue casi imperceptible, mientras que las células transducidas incrementaron notablemente la sensibilidad, aunque únicamente resultó significativo en las células HL-60 transducidas con la isoforma corta como se puede apreciar en la **Figura 44B**. Detalladamente, el cálculo del *Fold Change* (cambio relativo) en la sensibilidad demuestra que no todas las células responden del mismo modo. El descenso causado fue notablemente mayor en las células transducidas con ambas isoformas de LAPTM4B en comparación con la línea parental, aunque más robusto en la isoforma corta, que presenta un aumento en la sensibilidad a citarabina mayor al tratar conjuntamente con el inhibidor de ATR (**Figura 44D**).

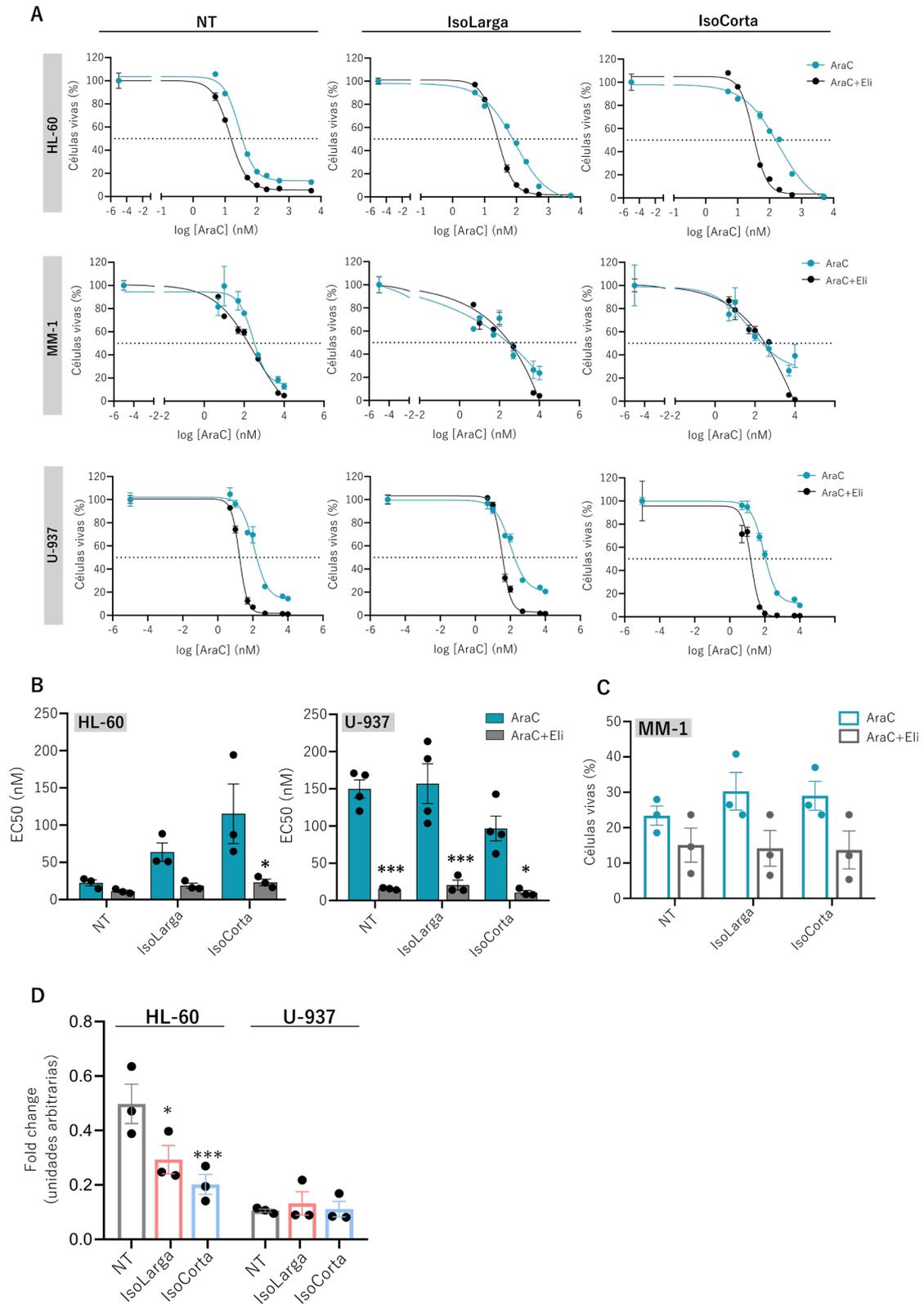


Figura 44. El inhibidor de ATR (elimusertib) sensibiliza las células a citarabina, especialmente, a aquellas células transducidas con LAPT4B resistentes. Las células HL-60, MM-1 y U-937 no transducidas (NT) y transducidas con LAPT4B se trataron 48h con elimusertib 20nM y con un vehículo o dosis crecientes de citarabina para evaluar la viabilidad mediante citometría de flujo y

calcular el valor de la EC50. Los resultados se exponen como **A)** una réplica representativa de las EC50 en las distintas líneas, en la que cada punto está representando la media de triplicados de un experimento independiente \pm SEM (n=3) y **B)** los valores numéricos de las EC50 calculadas \pm SEM para HL-60 y U-937. **C)** Media del porcentaje de células vivas a 5 μ M de AraC de tres experimentos independientes de MM-1 \pm SEM. **D)** Expresión relativa (1-(EC50 AraC/EC50 cotratamiento) para representar el incremento en la sensibilidad de HL-60 y SKM-1. Cada barra indica la media del fold change de tres/cuatro experimentos independientes \pm SEM; cada punto indica el valor de un experimento. *p<0,05; ***p<0,001.

A diferencia de la especificidad a LAPTM4B observada en HL-60, en el caso de MM-1 y U-937 el tratamiento combinado reduce la resistencia respecto a las tratadas exclusivamente con AraC (**Figura 44 B y C**). Dado que las curvas de viabilidad en el caso de MM-1 no siempre alcanzan el eje X por falta de mortalidad, el cálculo de las EC50 en esta línea resultaría erróneo. Por ello, se ha representado la media del porcentaje de viabilidad celular, a una concentración específica de AraC, como muestra más representativa de la realidad (**Figura 44C**). Las células MM-1 y U-937, no muestran diferencias notorias en la sensibilización tras la sobreexpresión de las isoformas de LAPTM4B, posiblemente como consecuencia de su alta resistencia intrínseca a nivel basal, reflejándose una disminución equitativa en las células transducidas y en las no transducidas (**Figura 44 C y D**).

Respecto a la cantidad de SA- β -gal, se ha observado que la línea más senescente a nivel basal es la U-937, correspondiente con su mayor resistencia farmacológica. Mientras que las HL-60 serían las menos senescentes. Sin embargo, no se detectan cambios a nivel basal entre las líneas transducidas y su control, ni tampoco entre las dos isoformas de LAPTM4B. Además, el tratamiento con citarabina no produjo cambios notables en la cantidad de SA- β -gal entre células tratadas y control, ni varió en función del nivel de LAPTM4B, en ninguna de las líneas evaluadas (**Figura 45**).

En conjunto, estos resultados indicarían que el tratamiento combinado de elimusertib con AraC podría reducir la resistencia farmacológica en todos los casos, aunque de forma más notoria en las líneas que habían sufrido un incremento en su resistencia mediado por LAPTM4B, indicando la implicación de LAPTM4B en la quimiorresistencia. Pese a ello, el incremento de resistencia asociado a LAPTM4B no se explicaría con un aumento del estado senescente como mecanismo de

protección ante los efectos citotóxicos del tratamiento, por lo que todavía se debe desvelar la relación entre la vía de ATR y LAPTM4B.

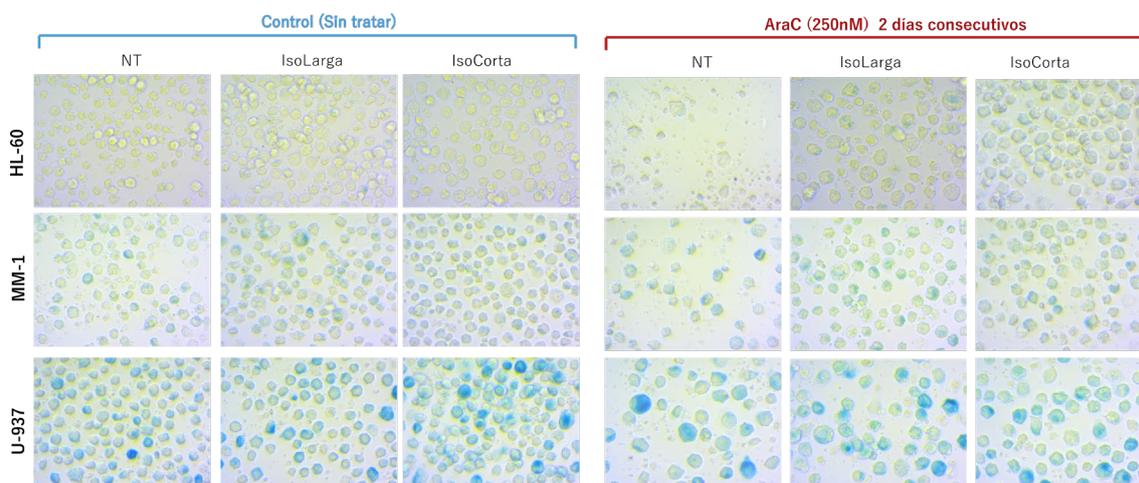


Figura 45. El estado senescente no varía en presencia de LAPTM4B ni se induce tras el tratamiento con citarabina. Imagen representativa de las células HL-60, MM-1 y U-937, no transducidas (NT) y transducidas con LAPTM4B largo y corto se trataron 48h consecutivas con citarabina 250nM, fueron fijadas y teñidas con el fin de detectar la SA-β-gal. Las imágenes muestran un campo representativo y se capturaron en un microscopio invertido a 20x aumentos.

4.6.2.4. LAPTM4B y la activación/inhibición de la citarabina

Las alteraciones en el proceso de internalización y activación y/o inhibición de la citarabina constituyen otro de los factores implicados en la quimiorresistencia. La citarabina puede internalizarse en la célula mediante difusión pasiva o a través de transportadores. Al alcanzar el citoplasma, será fosforilada por tres enzimas distintas hasta llegar a su forma activa, AraC-trifosfato (AraCTP). Por último, entrará en el núcleo, donde podrá desarrollar su función. Paralelamente, existen moléculas encargadas de convertir la citarabina en sus metabolitos inactivos, como la citidina desaminasa (CDA) o la 5'-nucleotidasa (NT5E), impidiendo que los efectos citotóxicos se lleven a cabo (Di Francia et al., 2021; Fajardo-Orduña et al., 2021).

Con el fin de detectar si se producen alteraciones en los procesos de entrada y activación de la citarabina derivadas de la sobreexpresión de LAPTM4B, se evaluó la expresión de distintos genes involucrados en dichos procesos mediante RT-PCR semi-cuantitativa. En este caso, las células evaluadas fueron HL-60, MM-1, U-937 y

K-562 no transducidas y transducidas con LAPTM4B largo y corto. Para ello, se estudiaron los transportadores de equilibrio de nucleósidos *ENT1-3* (Cros et al., 2004; Levin et al., 2021), aunque son bidireccionales parecen tener mayor implicación en el influjo de citarabina (Pastor-Anglada & Pérez-Torras, 2018; Randazzo et al., 2020); el transportador internalizador *CNT3* (Levin et al., 2021) y los externalizadores *MRP7* (McBride et al., 2009) y *BCRP* (Levin et al., 2021). Asimismo, se analizó la expresión de los genes activadores *dCK* (Cros et al., 2004; Levin et al., 2021) y *NDK* y los inactivadores *NT5E*, *PN-1* y *CDA* (Cros et al., 2004). A pesar de las diferencias observadas entre líneas celulares, posiblemente atribuidas a su diferente resistencia intrínseca a citarabina, podemos destacar varios cambios importantes que explicarían dichos fenotipos (**Figura 46**).

En el caso de la línea HL-60, detectamos un gran número de cambios entre las células transducidas y las células control. En primer lugar, fue posible observar un incremento en la expresión de varios de los transportadores de influjo en presencia de LAPTM4B. Lo más notable fue el incremento de la expresión observada en *ENT1* y *CNT3* en las células transducidas con ambas isoformas de LAPTM4B frente al control. En cuanto a la expresión de los externalizadores *MRP7* y *BCRP*, detectamos un aumento significativo del primero y un ligero descenso de *BCRP* en las células transducidas en comparación con el control. En estos casos, no se dieron diferencias entre las dos isoformas de LAPTM4B. Por otro lado, el análisis de los genes activadores de la citarabina reveló una expresión equitativa entre las células transducidas y las no transducidas. No obstante, el hecho más destacable observado en la línea HL-60 fue la expresión cien veces mayor detectada en los genes inactivadores de citarabina *NT5E* y *CDA*, en aquellas células transducidas con LAPTM4B largo o corto, en comparación con las parentales. En el caso de *NT5E*, se dieron diferencias entre ambas isoformas de LAPTM4B, siendo mayor la expresión de la isoforma larga respecto a la corta. En cambio, en *CDA* la isoforma corta mostró una mayor expresión respecto al control, pero no hubo diferencias entre las isoformas. Por su parte, la enzima inactivadora *PN-1* no varió su expresión entre las células transducidas y las parentales, ni tampoco entre las dos isoformas.

Por otro lado, en el caso de las MM-1 los transportadores *ENT1-3* mostraron niveles de expresión similares entre las células transducidas y las parentales. Respecto al internalizador *CNT3*, sufrió un descenso en su expresión en el caso de las células con expresión ectópica de LAPT_{M4B}, al contrario de lo observado en HL-60. En este caso, aunque a falta de ser confirmado estadísticamente, la isoforma corta sufrió un descenso mayor que la larga en la expresión de *CNT3*. En esta línea, una alta expresión de LAPT_{M4B} conlleva a un ligero aumento en la expresión de los genes correspondientes a los externalizadores *MRP7* y *BCRP* respecto al control, si bien estas diferencias únicamente resultaron significativas en *BCRP* y con mayor poder estadístico para la isoforma larga de LAPT_{M4B}. De igual modo a la línea HL-60, la expresión de las enzimas activadoras y de la inactivadora *PN-1*, no sufrió cambios apreciables al sobreexpresar LAPT_{M4B} en MM-1. Opuestamente, las enzimas inactivadoras *CDA* y *NT5E* se encuentran reguladas a la baja en aquellas células transducidas con LAPT_{M4B}.

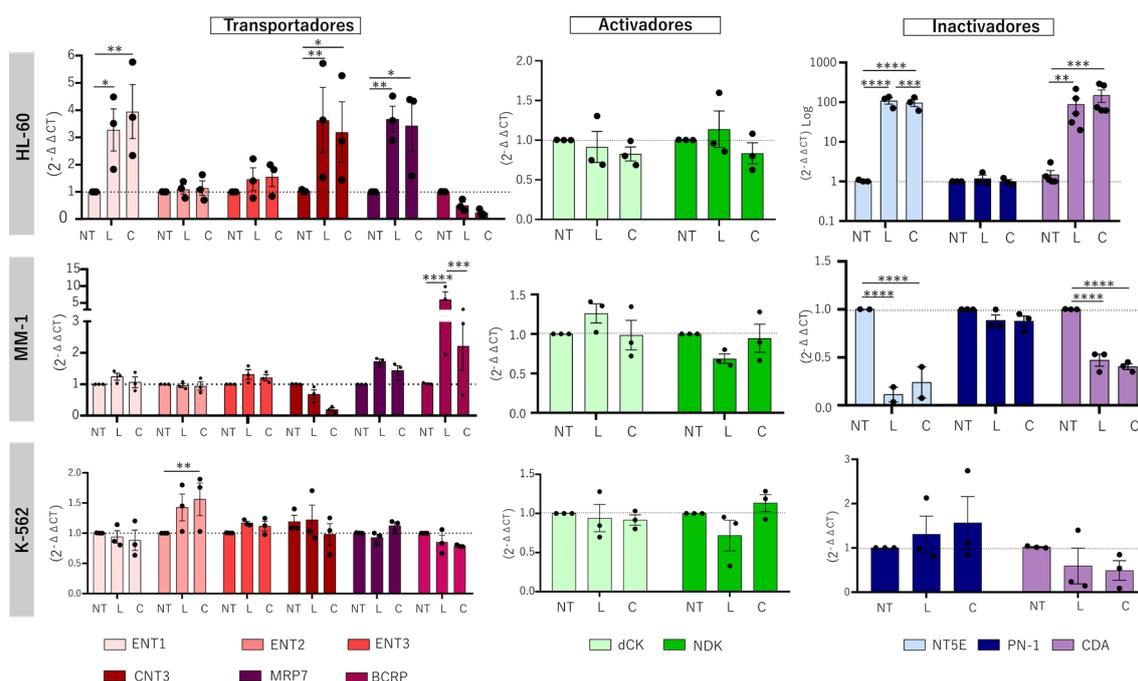


Figura 46. La sobreexpresión de LAPT_{M4B} en HL-60 ocasiona cambios en la expresión génica que favorecen la resistencia a citarabina. La expresión de genes transportadores (*ENT1-3*, *CNT3*, *MRP7* y *BCRP*), activadores (*dCK* y *NDK*) e inactivadores (*PN-1*, *CDA* y *NT5E*) de citarabina, y del gen de referencia *GAPDH* fue analizada en las células HL-60, MonoMac-1 (MM-1) y K-562 sin transducir (NT) y transducidas con LAPT_{M4B} largo o corto. Las barras están representando la media de triplicados de tres/cuatro experimentos independientes \pm SEM y cada punto es la media de un experimento. Los resultados indican el nivel de expresión de cada gen tras su normalización con el gen de

referencia GAPDH y con las células no transducidas. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. NT: no transducidas, L: Isoforma Larga, C: Isoforma Corta.

Por su parte, la línea U-937 quedó descartada por su escasa reproducibilidad entre experimentos (datos no incluidos). La última línea evaluada fue K-562, incluida en este análisis por su fenotipo de resistencia a citarabina similar a HL-60 cuando LAPTM4B está sobreexpresado. Respecto a los transportadores evaluados, únicamente se detectó con claridad una sobreexpresión de *ENT2* en el caso de las células transducidas, aunque robusto exclusivamente en la isoforma corta. De igual forma al resto de líneas testadas, no se detectaron cambios significativos en la expresión asociada a los genes activadores (*dCK* y *NDK*) dependientes de la expresión de LAPTM4B. En este caso no se detectó expresión de *NT5E*, y la derivada de *CDA* y *PN-1* no consiguió ratificar las diferencias entre células transducidas y parentales previamente observadas en otras líneas de LMA.

Cabe mencionar que, aunque el transportador *ENT3* se encuentra mayormente en membranas intracelulares, como en lisosomas y mitocondrias (Pastor-Anglada & Pérez-Torras, 2018), no hemos observado cambios significativos en su expresión en ninguna de las líneas evaluadas. Aun así, este escueto análisis carece de la robustez suficiente para afirmar o descartar la participación de los lisosomas como mediadores de la resistencia a fármacos.

En resumen, el incremento en la resistencia a citarabina observado en HL-60 con regulación positiva de LAPTM4B, parece estar asociado a un incremento de los genes inactivadores de la misma. Este hallazgo evidenciaría que la citarabina internalizada quedaría inactivada por dos vías: pasando desde su forma sin fosforilar AraC a AraU (uracil-arabinósido) por la enzima CDA o desde la forma fosforilada una vez, AraCMP, por NT5E, pudiendo inactivarse totalmente por la acción de CDA (**Figura 47**). En este caso, aunque algunos de los transportadores, tanto de entrada como de salida, puedan estar mayormente activados, el gran incremento de las enzimas inactivadoras provocarán la inactivación de toda aquella citarabina que consiga permanecer en el interior celular.

Mientras que en el caso de MM-1, el fármaco será mayormente expulsado, disminuyendo la efectividad del mismo cuando se sobreexpresa LAPT_M4B en el contexto leucémico y, por tanto, haciendo que la resistencia se mantenga de forma similar a la de las células parentales típicamente resistentes. Debido a ello, no apreciamos diferencias en las EC₅₀ entre las células transducidas y las no transducidas. Esta capacidad aumentada de expulsión podría relacionarse con la disminución en la actividad de las enzimas inactivadoras en presencia de LAPT_M4B, puesto que si entra poco fármaco a la célula estas enzimas podrían no activarse.

Por último, en la línea K-562 no se ha podido determinar que el aumento de resistencia al expresar ectópicamente LAPT_M4B esté relacionado con el mecanismo de internalización y activación/inactivación de la citarabina. Como hemos comentado anteriormente existen múltiples vías y eventos que participan en la adquisición de la resistencia, por tanto, es factible que un mismo efecto fenotípico quede explicado por diferentes mecanismos biológicos.

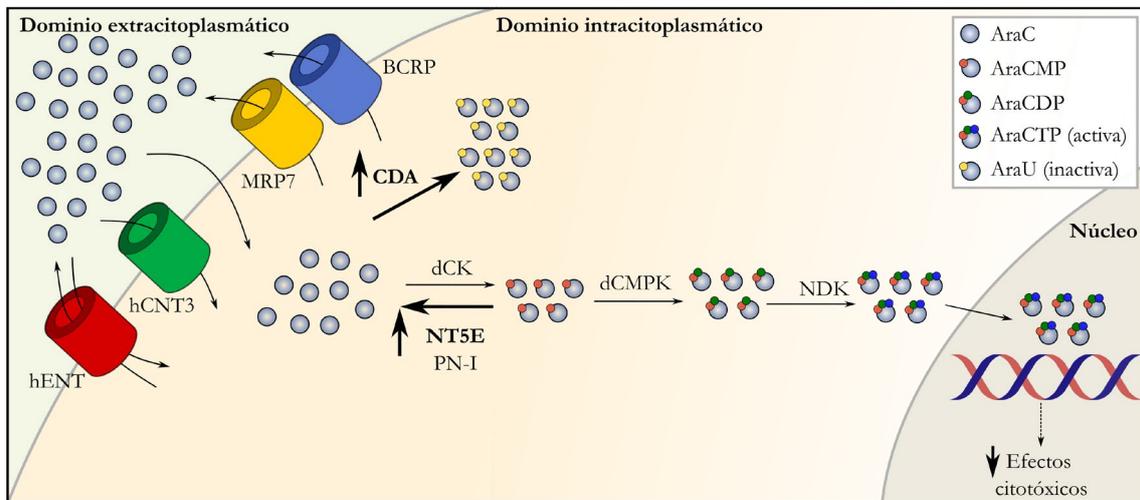


Figura 47. Modelo del metabolismo de la citarabina en las HL-60 con expresión ectópica de LAPT_M4B.

Por otro lado, se incluyó en el análisis la evaluación de tres genes diferentes asociados a otros tipos de resistencia. Dichos genes fueron *BIRC5* (survivina), sobreexpresado en casos de resistencia a doxorubicina y paclitaxel (D. J. Morrison et al., 2012), *CBR1*, relacionado con resistencia a doxorubicina (Matsunaga et al., 2015) y *AKR1C3*, por su relación con daunorrubicina (Bortolozzi et al., 2018). La

sobreexpresión de LPTM4B en las líneas evaluadas no generó cambios en la expresión de *BIRC5* y *CBR1*, mostrando un patrón similar de expresión al de las células control y entre ambas isoformas. El único resultado remarcable de este estudio fue la sobreexpresión de *AKR1C3* en las líneas de LMA, HL-60 y MM-1 con expresión ectópica de LPTM4B (**Figura 48**). En el caso de HL-60, ambas isoformas presentaron una sobreactivación similar, mientras que en MM-1 únicamente la isoforma larga logró un aumento significativo frente al control. Opuestamente, en la línea K-562 parece darse una disminución moderada y no significativa de este gen en las células transducidas.

Por ende, la expresión de *AKR1C3* incrementa en presencia de una alta expresión de LPTM4B en líneas de LMA. A pesar de la ausencia de diferencias detectado en las EC50 de daunorrubicina, entre las células no transducidas y las transducidas (**Figura 39A**), *AKR1C3* también podría estar implicado en otros procesos de tumorigénesis y migración de las células cancerígenas mediante la activación de Erk (B. Wang et al., 2018; X.-Z. Xiao et al., 2021).

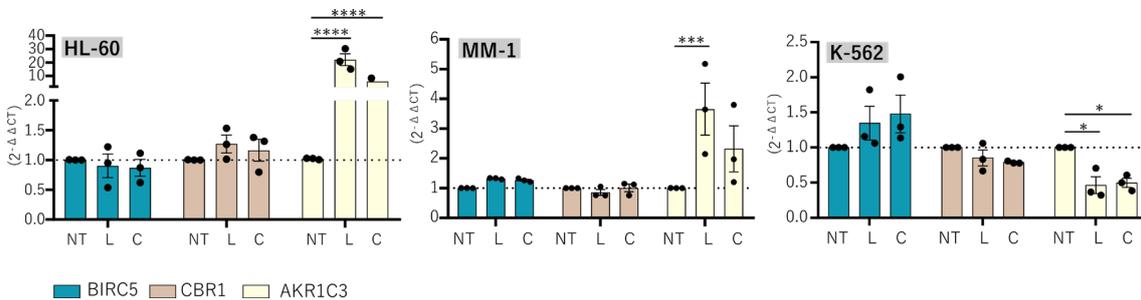


Figura 48. La sobreexpresión de LPTM4B en LMA promueve la expresión génica de AKR1C3. La expresión génica de BIRC5, CBR1 y AKR1C3 se analizó en las líneas HL-60, MonoMac-1 (MM-1) y K-562 no transducidas (NT) y transducidas con LPTM4B (largo o corto). Las barras indican la media de triplicados de cuatro experimentos independientes \pm SEM y cada punto es la media de un experimento. Los datos indican el nivel de expresión de cada gen tras su normalización con el gen de referencia GAPDH y con las células no transducidas. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

- **CDA y la resistencia a AraC**

De acuerdo con los resultados expuestos anteriormente destacando la inactivación de la citarabina como posible causa de la resistencia observada en las células HL-60 con expresión ectópica de LPTM4B, decidimos centrarnos en explorar en detalle

la citidina desaminasa (CDA), puesto que se halla en el último paso y, por ende, el más relevante para la inactivación intracelular de la citarabina.

En primer lugar, comprobamos la expresión proteica de CDA a nivel basal en las líneas HL-60, MM-1, Molm-13 y K-562, sin transducir y transducidas con LAPTM4B largo y corto. Como se puede observar en la **Figura 49**, las diferentes líneas celulares muestran distintos niveles de expresión de CDA, mostrando diferencias entre las isoformas o incluso ausencia de expresión. En el caso de HL-60, la proteína CDA se expresa únicamente en las células transducidas, mientras que en MM-1 o Molm-13 se detecta con mayor intensidad en las células parentales y en el caso de la isoforma corta de LAPTM4B. En cambio, en la línea K-562 no se expresa CDA en ninguno de los subgrupos.

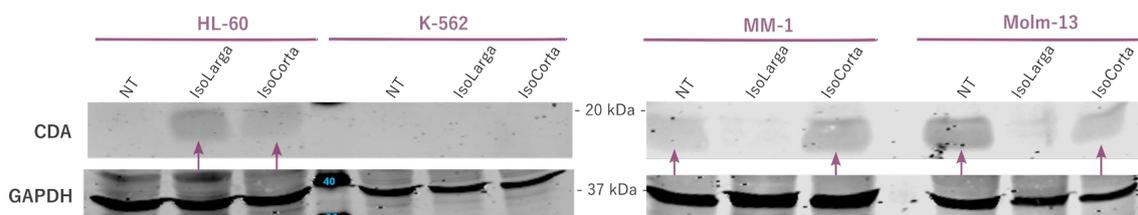


Figura 49. La expresión proteica de CDA es limitada y variable en las células evaluadas. Se analizó la expresión de CDA de las células HL-60, K-562, MM-1 y Molm-13 parentales y transducidas con LAPTM4B largo o corto. La figura muestra un Western blot significativo hibridando con el anticuerpo de CDA y GAPDH como control de carga.

Centrándonos en HL-60, según se puede observar en la **Figura 50A** se produce un aumento de CDA en las células transducidas con LAPTM4B frente al control, aunque debido a la variabilidad asociada a la técnica no resultó significativa. Asimismo, aunque los valores máximos de expresión alcanzaron niveles superiores en el caso de la isoforma corta, la isoforma larga cuenta con una mediana ligeramente mayor.

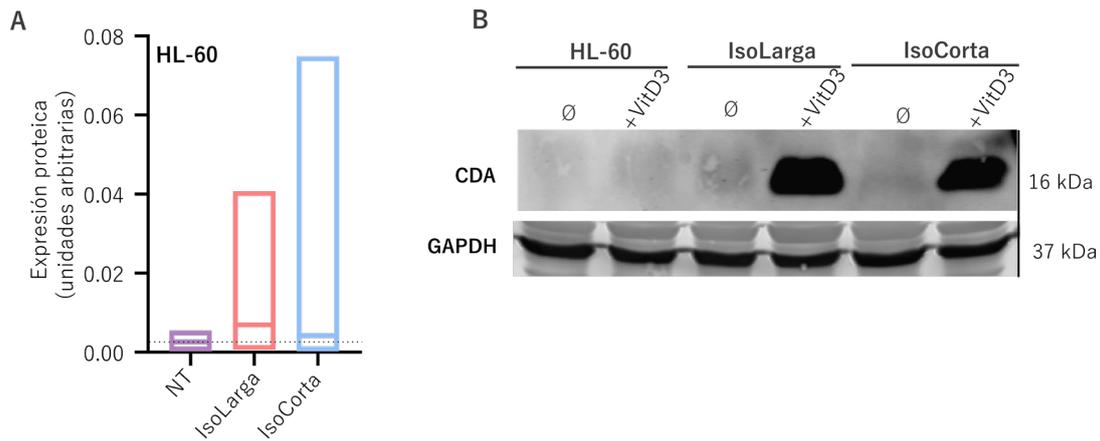


Figura 50. Las células HL-60 transducidas con LAPTM4B incrementan la expresión de CDA a nivel proteico. Se extrajo proteína de las células HL-60 sin transducir y transducidas con la isoforma larga o corta de LAPTM4B y posteriormente, se evaluó el nivel de proteína mediante Westerns blot. **A)** El gráfico de barras representa los máximos y mínimos y la línea horizontal la mediana de cuatro experimentos independientes. **B)** Membrana representativa de un Western blot tras el tratamiento de vitamina D3.

Debido a la dificultad encontrada para detectar esta proteína, tratamos la línea de interés HL-60 con uno de los inductores de CDA, la vitamina D3 (Watanabe & Uchida, 1996), para asegurarnos de su correcta detección. Consecuentemente, el tratamiento con vitamina D3 indujo la expresión de CDA potencialmente en las células transducidas con LAPTM4B frente a las células control donde no se aprecia dicho incremento (**Figura 50B**). Según estos análisis, la expresión proteica de LAPTM4B en HL-60 promueve la expresión de CDA también a nivel proteico y la induce específicamente bajo el tratamiento con vitamina D3.

Gracias a la disponibilidad de muestras primarias de LMA, analizamos la expresión de CDA en aquellas muestras en las que previamente habíamos evaluado la expresión de LAPTM4B. Como podemos observar en la **Figura 51A**, se puede apreciar una tendencia a la sobreexpresión de CDA en las células derivadas de pacientes frente a las células de población sana, a pesar de que dicha comparación no resultó significativa.

Una vez confirmada la regulación positiva entre la expresión de LAPTM4B y CDA en la línea HL-60, así como, la mayor expresión de CDA en muestras primarias de LMA frente a la muestra sana, quisimos explorar dicha regulación en el contexto de LMA. Con este fin hemos representado la expresión a nivel de ARNm de

LAPTM4B y CDA obtenida para cada muestra (**Figura 51B**). De este resultado tan heterogéneo inter e intramuestral, podemos concluir la ausencia de una conexión obvia entre la expresión génica de ambos elementos en muestras primarias, donde en ocasiones una alta expresión de la isoforma corta de LAPTM4B implica una expresión significativa de CDA, como podríamos observar en la muestra 14 de LMA, mientras que, en otros casos como en las muestras 6 o 16, una alta expresión de la isoforma corta no implica un incremento de CDA.

Asimismo, esta figura nos permite observar de forma alternativa el patrón de expresión de ambas isoformas de *LAPTM4B* en muestras sanas y en LMA. En suma, la presencia de la isoforma corta de *LAPTM4B* es mucho más notable en pacientes de LMA, mientras que la expresión de la isoforma larga de *LAPTM4B* es más limitada y parece estar especialmente patente en muestras sanas. Por último, la expresión de *CDA* también es más notoria en LMA respecto a las muestras sanas.

En conjunto, CDA parece encontrarse mayormente expresada en el contexto de la LMA, y sería especialmente inducible en presencia de LAPTM4B, sin que éste sea un requisito indispensable para su expresión.

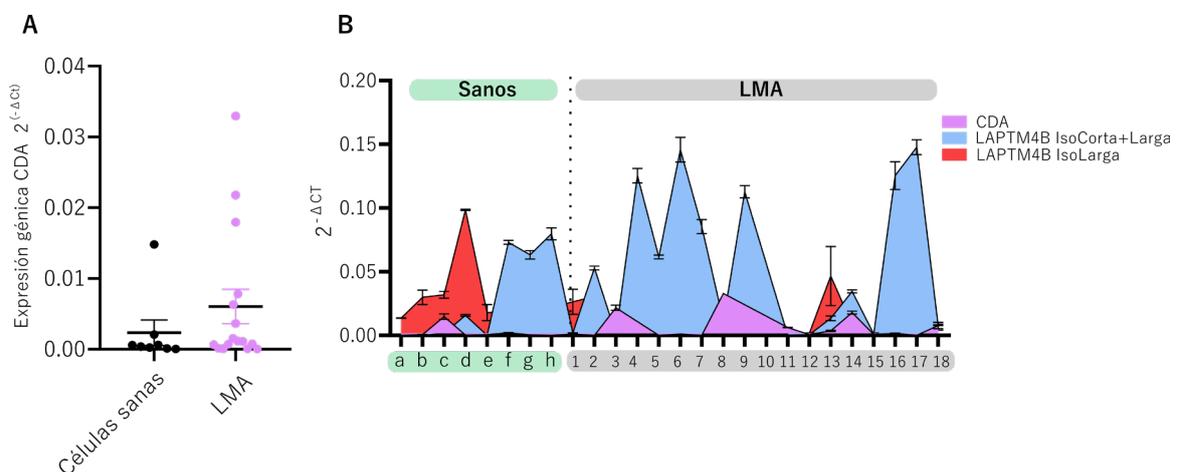


Figura 51. CDA está sobreexpresado en muestras primarias de LMA de forma independiente a la expresión de LAPTM4B en estas muestras. Expresión génica analizada mediante RT-PCR en muestras de donantes sanos (negro) en comparación con las células de LMA (lila). **A)** Expresión de CDA, la barra horizontal indica la media de todos los valores para cada caso \pm SEM. **B)** Expresión de CDA, LAPTM4B isoforma corta+larga y LAPTM4B isoforma larga respecto a GAPDH \pm SEM, cada letra se corresponde con una muestra derivada de un donante sano y cada número a una muestra de pacientes de LMA.

Una vez validada la sobreexpresión de CDA tanto en líneas celulares como en muestras primarias, tratamos a las células con tetrahidrouridina (THU), el inhibidor comercialmente disponible de CDA, con el fin de confirmar una de las posibles causas de la resistencia. Para evaluar la acción de este inhibidor sobre la viabilidad celular, tratamos diferentes líneas celulares: HL-60, MM-1, U-937, Molm-13 y K-562 con dosis crecientes del mismo. Como no se observó ningún efecto en la supervivencia celular en ninguna de las líneas evaluadas (**Figura 52A**), se comprobó su efecto en las células HL-60 transducidas. De igual forma, no se produjo muerte celular al tratar con este compuesto independientemente de la expresión de LAPTM4B (**Figura 52B**).

Descartados los efectos de la tetrahidrouridina sobre la viabilidad celular, evaluamos su acción en el contexto de la resistencia a AraC. Con dicho fin, se trataron las líneas que mostraron resistencia a AraC en presencia de LAPTM4B, HL-60 y K-562, y las células MM-1, como línea estándar de LMA, con dosis crecientes de AraC y 300 μ M de THU. Todas las líneas celulares incrementaron su sensibilidad a citarabina tras el tratamiento combinado (**Figura 52C**). Sin embargo, lo más notable es que las líneas HL-60 y K-562 transducidas disminuyeron los valores de las EC50 hasta valores similares a las parentales y que las células no transducidas no mostraron una reducción apreciable en la resistencia. En el caso de las MM-1, aunque todas las células redujeron su resistencia potencialmente tras el tratamiento combinado en comparación con AraC solo, las células no transducidas fueron las que mayor disminución sufrieron. Posiblemente indicando que la efectividad del fármaco sea inversamente proporcional a la resistencia inicial de cada tipo celular. En ninguna de las líneas evaluadas se dieron diferencias de sensibilidad entre las diferentes isoformas de LAPTM4B.

Estos resultados corroboran la implicación de CDA en la resistencia a AraC, así como, la posible implicación de LAPTM4B en este proceso, al aumentar la sensibilidad especialmente en las líneas transducidas que habían mostrado resistencia tras su sobreexpresión.

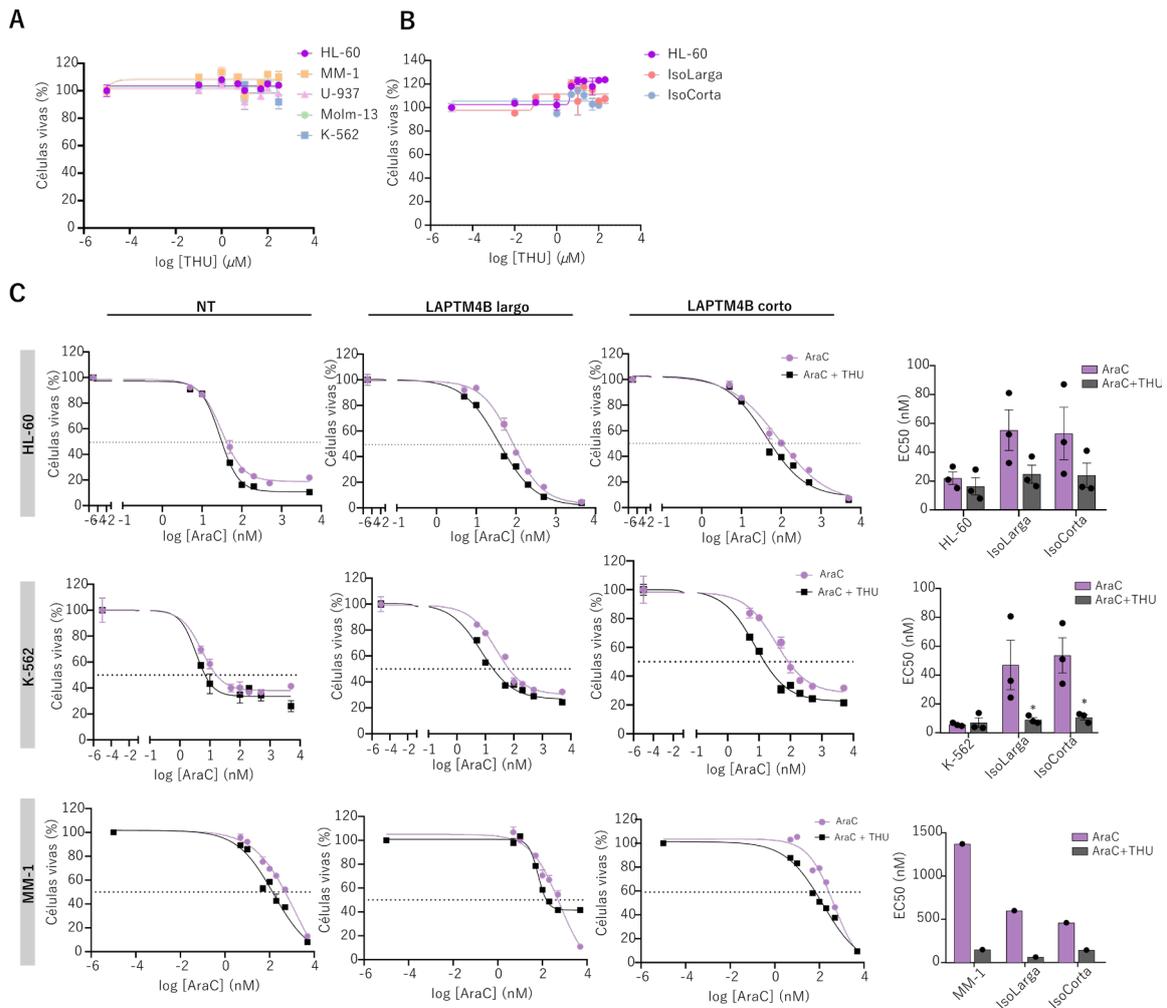


Figura 52. El inhibidor de CDA (tetrahidouridina) restaura la sensibilidad a citarabina en las células, especialmente en las células transducidas con LAPTM4B resistentes. A) Las células HL-60, MM-1, U-937, Molm-13 y K-562 parentales se trataron con diferentes dosis de tetrahidouridina durante 48h y se evaluó su viabilidad por citometría de flujo. Se muestra un histograma representativo. **B)** Igual que en A, pero en este caso la línea HL-60 sin transducir y transducidas con LAPTM4B (largo o corto). **C)** Las células HL-60, MM-1 y K-562 no transducidas (NT) y transducidas con LAPTM4B se trataron 48h con 300 μ M de tetrahidouridina y dosis progresivas de citarabina para evaluar la viabilidad mediante citometría de flujo y calcular el valor de la EC50. Los datos representan una réplica representativa de las EC50 en las distintas líneas, en la que cada punto indica la media de triplicados de un experimento independiente \pm SEM y los valores numéricos de las EC50 calculadas \pm SEM (n=3, n=1 para MM-1).

Para finalizar, con el propósito de ampliar la información respecto a CDA y LAPTM4B, decidimos analizar su expresión génica en la línea HL-60 bajo el tratamiento de citarabina y tetrahidouridina (de forma independiente y en conjunto), y de vitamina D3. Como resultado se obtuvo que el nivel de *CDA* aumenta al tratar con citarabina, la combinación de citarabina y tetrahidouridina, o con vitamina D3 (**Figura 53A**). Aunque este efecto se da tanto en las líneas transducidas como las parentales, resulta mucho más apreciable en las parentales,

donde la acción de la citarabina aumentó la expresión de *CDA* de forma individual, y en co-tratamiento con THU resultó significativa en todas sus combinaciones. En el caso de las células transducidas, dado que ya presentan niveles muy altos de *CDA* difícilmente podrán aumentar. Pese a ello, en la isoforma larga observamos una ligera tendencia de aumento tras el tratamiento con citarabina y especialmente con citarabina y THU. Mientras que, en la isoforma corta esta tendencia fue más patente quizá por la reproducibilidad asociada a las réplicas. En este caso, el tratamiento con AraC resultó significativo para las concentraciones más altas, y la combinación de AraC junto a THU en todas ellas. En cambio, el tratamiento individual de THU no modificó significativamente la expresión de *CDA* en ninguna de los grupos testados, contrariamente, la vitamina D3 incrementó la expresión consistentemente en todos los casos.

Del mismo modo, se evaluó la expresión de *LAPTM4B* bajo los tratamientos descritos previamente (**Figura 53B**). Aunque en las células sin transducir existe una ligera tendencia al incremento de ambas isoformas de *LAPTM4B* dependiente de la dosis de citarabina e independientemente de THU, no se dieron cambios estadísticamente significativos en ninguno de los tratamientos testados. De igual modo, el alto nivel de expresión de *LAPTM4B* de las células transducidas no permitió detectar cambios destacables en ningún caso.

En conclusión, podemos certificar que la expresión génica de *CDA* incrementa tras el tratamiento con AraC, AraC más THU y especialmente tras tratar con vitamina D3 las células HL-60 parentales y en presencia de *LAPTM4B*. En cambio, dichos tratamientos no afectaron significativamente los niveles de expresión génica de *LAPTM4B*. Aunque a día de hoy se desconoce la naturaleza de la relación entre *LAPTM4B* y *CDA*, estos resultados sugieren una posible regulación de *LAPTM4B* hacia *CDA*, puesto que se revierte el efecto de la resistencia asociado a *LAPTM4B* al tratar con el inhibidor de *CDA* (THU) (**Figura 52C**), la vitamina D3 induce *CDA* específicamente en presencia de *LAPTM4B* (**Figura 50B**), pero dicho tratamiento no modifica su expresión (**Figura 53B**).

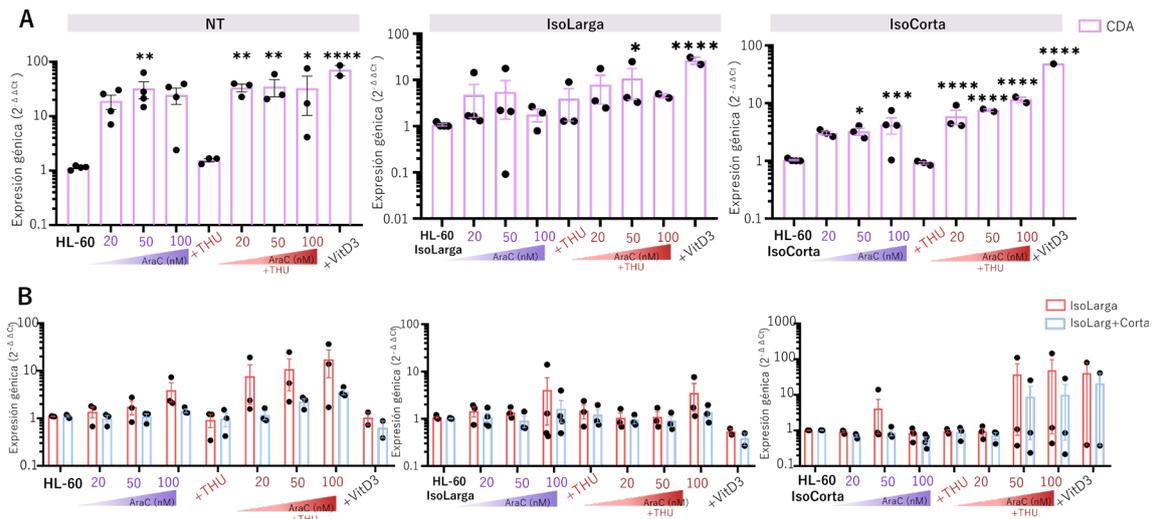


Figura 53. El tratamiento con AraC o vitamina D3 incrementa la expresión de *CDA* en HL-60. La expresión génica de **A)** *CDA* y **B)** *LAPTM4B* se analizó en las líneas HL-60 no transducidas (NT) y transducidas con *LAPTM4B* (largo o corto), en su estado basal o tratadas con AraC (20, 50 y 100nM), THU 300 μ M, la combinación de AraC y THU o 1 μ M de vitamina D3 durante 48h. La media de triplicados de tres o cuatro experimentos independientes \pm SEM se representa mediante barras donde cada punto es la media de un experimento. Los resultados se presentan como el nivel de expresión de cada gen tras normalizar con el gen de referencia GAPDH y respecto a las células no transducidas en cada caso. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

4.7. Estudio de la pérdida de función de LAPTM4B en LMA

Como mencionamos al comienzo de este trabajo, uno de los métodos para estudiar la función de LAPTM4B es mediante su sobreexpresión. Dicho proceso resultó el más interesante en base a los datos obtenidos mediante análisis bioinformáticos y con el apoyo de la literatura, donde LAPTM4B se mostró sobreexpresado en casos de LMA asociada a peor pronóstico, así como, en diversos tipos tumorales. En cambio, otra aproximación experimental para evaluar su funcionalidad sería mediante el silenciamiento génico del mismo.

En este caso, silenciar a LAPTM4B mediante el método CRISPR fue la opción escogida. Esta tecnología conocida por sus posibilidades de edición genómica, permite el silenciamiento de un gen de forma precisa y duradera. Las líneas empleadas en este caso fueron MM-1 y U-937, estas células se eligieron por su mayor resistencia a AraC, dado que en la línea HL-60, a pesar de ser la más interesante en nuestro estudio por los resultados obtenidos, sería difícil determinar si el silenciamiento de LAPTM4B afecta en la quimiorresistencia.

Se generaron cuatro guías ARNsg diferentes para silenciar LAPTM4B (**Tabla 7**) y se transdujeron en las células previamente transducidas con la enzima endonucleasa Cas9. Cabe destacar que se descartó la guía ARNsg#1 puesto que no fue posible su transducción. Posteriormente, se realizó una doble selección en base a dos genes marcadores presentes en los plásmidos empleados, que confieren resistencia al antibiótico puromicina (pLentiGuide-Puro) y blasticidina (pLentiCas9-Blast). Una vez seleccionadas las células transducidas, se analizó en diversas ocasiones su expresión génica para comprobar el silenciamiento a nivel de ARNm. Como se puede apreciar en la **Figura 54A**, la expresión génica de LAPTM4B fue variando en los diferentes experimentos o incluso en función de la guía transducida. En el caso de MM-1, aunque las guías ARNsg#2 o ARNsg#4 disminuyeron la expresión de ambas isoformas respecto al control en algún experimento, los incrementos observados en otros nos hicieron descartarlas. Asimismo, las combinaciones de diferentes guías tampoco disminuyeron la expresión como esperábamos. Mientras

que, en U-937 no se redujo de forma clara la expresión para ninguna de las guías o incluso aumentó.

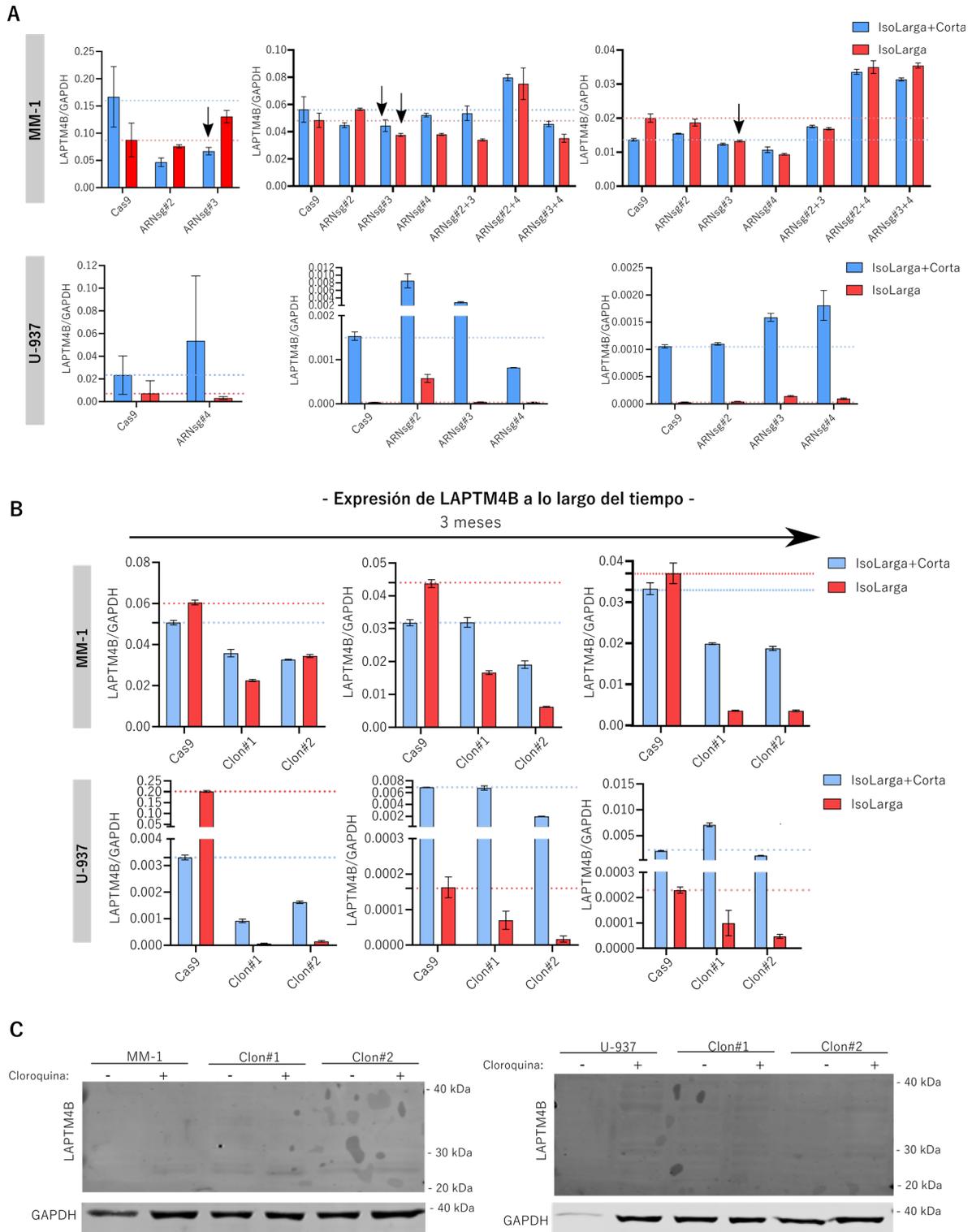


Figura 54. Validación del silenciamiento por CRISPR-Cas9. La expresión de LAPT M4B se analizó en las líneas MM-1 y U-937 Cas9 control y transducidas. **A)** Comprobación de la expresión génica de las diferentes guías de ARNsg. **B)** Expresión de los clones #1 y #2 de las células transducidas con la

ARNsg#3. Los datos reflejan el nivel de expresión de cada gen tras su normalización con el gen de referencia GAPDH. Cada gráfica corresponde a un único experimento para observar la disminución de la expresión. C) Western blot de LAPTM4B tras tratar con cloroquina 20 μ M durante 24h células MM-1 y U-937 Cas9.

A pesar de ello, se continuó el estudio en ambas líneas celulares escogiendo dos clones derivados de la guía (ARNsg#3), la cual pareció disminuir más claramente la expresión de LAPTM4B (**Figura 54A**). Con el fin de aumentar el escaso o nulo silenciamiento detectado previamente, se realizó una segunda selección en estas células. Esta selección clonal, mucho más restrictiva que la previa, aseguró una alta concentración de antibiótico en pocas unidades de células y, por tanto, se esperaba eliminar definitivamente aquellas células que hayan podido escapar a la primera selección sin transducir. Tras dejar que estas células proliferaran, se seleccionaron dos clones para cada línea celular y se volvió a analizar sus niveles de expresión, viéndose una disminución de la expresión génica, más notable en el clon#2 y en el caso de la isoforma larga, en ambas líneas celulares (**Figura 54B**). En cambio, una vez más la baja expresión proteica de LAPTM4B en LMA impidió su detección por Western blot, a pesar de tratar con cloroquina como posible inductor de la expresión de LAPTM4B (**Figura 54C**).

En el transcurso de este trabajo se ha descrito la participación de LAPTM4B en diversos aspectos relacionados con la LMA, como la quimiorresistencia. En nuestro caso, la resistencia farmacológica se ha dado específicamente frente al tratamiento más común para combatir esta enfermedad, la citarabina. Consecuentemente, analizar los efectos del silenciamiento de LAPTM4B en células quimiorresistentes de por sí se consideró la estrategia más adecuada. Para ello, células MM-1 y U-937 Cas9 y los clones seleccionados fueron tratado con dosis graduales de citarabina y se determinaron sus EC50 mediante la detección de la viabilidad por citometría de flujo. El silenciamiento de LAPTM4B produjo una disminución en la resistencia de las células MM1, sobre todo en el clon#2, correspondiente con una menor expresión de LAPTM4B (**Figura 55A**). Aunque este efecto no se detectó en la línea de linfoma U-937, podríamos afirmar que LAPTM4B participa en la generación de resistencia a citarabina en LMA.

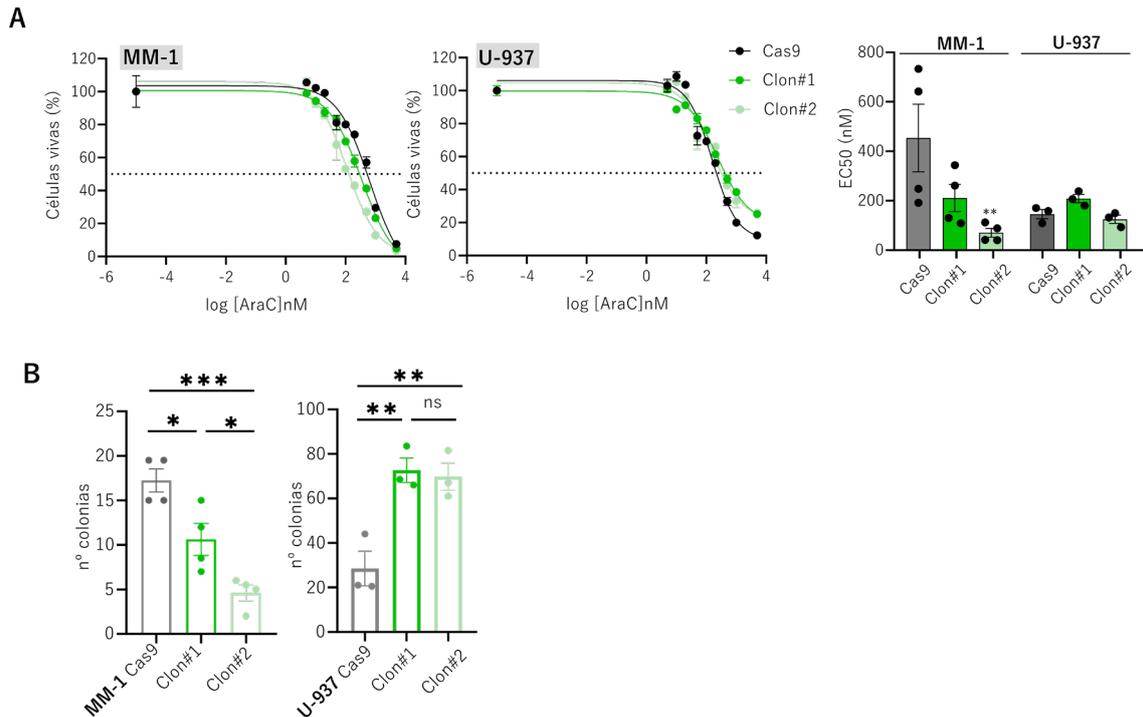


Figura 55. La represión de la expresión de LAPT4B disminuye la resistencia y la capacidad clonogénica de las células MM-1. A) Las células MM-1 y U-937 Cas9 y los clones indicados se trataron con diferentes dosis de AraC, a las 48h se evaluó la citotoxicidad por citometría de flujo y se calcularon las EC50. **B)** Las células MM-1 y U-937 Cas9 y los clones indicados se sembraron en un medio semisólido rico en citoquinas instructivas y se mantuvieron durante 10 días, en ese punto se contaron las colonias desarrolladas. Las barras indican la media de triplicados o duplicados de los experimentos independientes (n=4 para MM-1, n=3 para U-937), en las que cada punto representa la media de cada experimento \pm SEM. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Anteriormente, también se ha observado que la expresión ectópica de LAPT4B aumenta la clonogenicidad *in vivo* (Figura 38). Estos resultados nos han conducido a efectuar experimentos de clonogenicidad con LAPT4B silenciado en células de LMA. Puesto que, a pesar de no detectarlo *in vitro* (Figura 36), estos experimentos evidencian el potencial de autorrenovación y, además, se pueden correlacionar directamente con perturbaciones en los mecanismos leucémicos.

El silenciamiento de LAPT4B desencadenó de nuevo, diferentes efectos en las líneas estudiadas (Figura 55B). Mientras que la línea MM-1 sufrió una reducción del potencial clonogénico en aquellas células silenciadas, con mayor eficacia en el caso del clon#2, en la línea U-937 ocurrió el efecto contrario aumentando el potencial de generación de colonias en los dos clones estudiados.

Aunque estos experimentos resultan de utilidad para terminar de enmarcar la función de LAPTM4B en LMA, la realidad es que poco tiempo después de la realización de los experimentos se evaluó la expresión de los clones para confirmar si se mantenía el silenciamiento de LAPTM4B. Sorprendentemente, la expresión de LAPTM4B incrementó por causas desconocidas. Como se puede observar en la **Figura 56** solamente 15 días después de los experimentos, la expresión proteica de LAPTM4B parecía disminuida en los clones de MM-1 y U-937 Cas9. A pesar de los bajos niveles de proteína, en MM-1 parece que la expresión de la isoforma larga en el clon#1 sea superior al control. En cambio, en el clon#2 ambas isoformas muestran niveles más bajos de LAPTM4B que su control. Sorprendentemente, tan solo unas semanas después de esta comprobación por Western blot, se detectó un gran aumento en la expresión génica de la isoforma larga en ambas isoformas, aunque especialmente en el clon#2.

En el caso de U-937, a pesar de que la proteína LAPTM4B se detecta levemente parece mayor la expresión de ambas isoformas en las células control respecto a los clones. No obstante, la expresión génica evaluada poco después muestra un aumento de ambas isoformas en los clones de U-937 en comparación al control (**Figura 56**).

Las causas de este incremento son por el momento desconocidas, aunque podrían corresponder a la generación de resistencia a los antibióticos de una ínfima cantidad de células no transducidas, a mecanismos de compensación de la expresión generados a partir del silenciamiento de LAPTM4B o a fallos indetectables en el sistema de edición génica. Es por ello, que para poder certificar la robustez de los experimentos realizados con el sistema CRISPR, se deberá repetir el proceso de silenciamiento y garantizar un silenciamiento permanente de LAPTM4B.

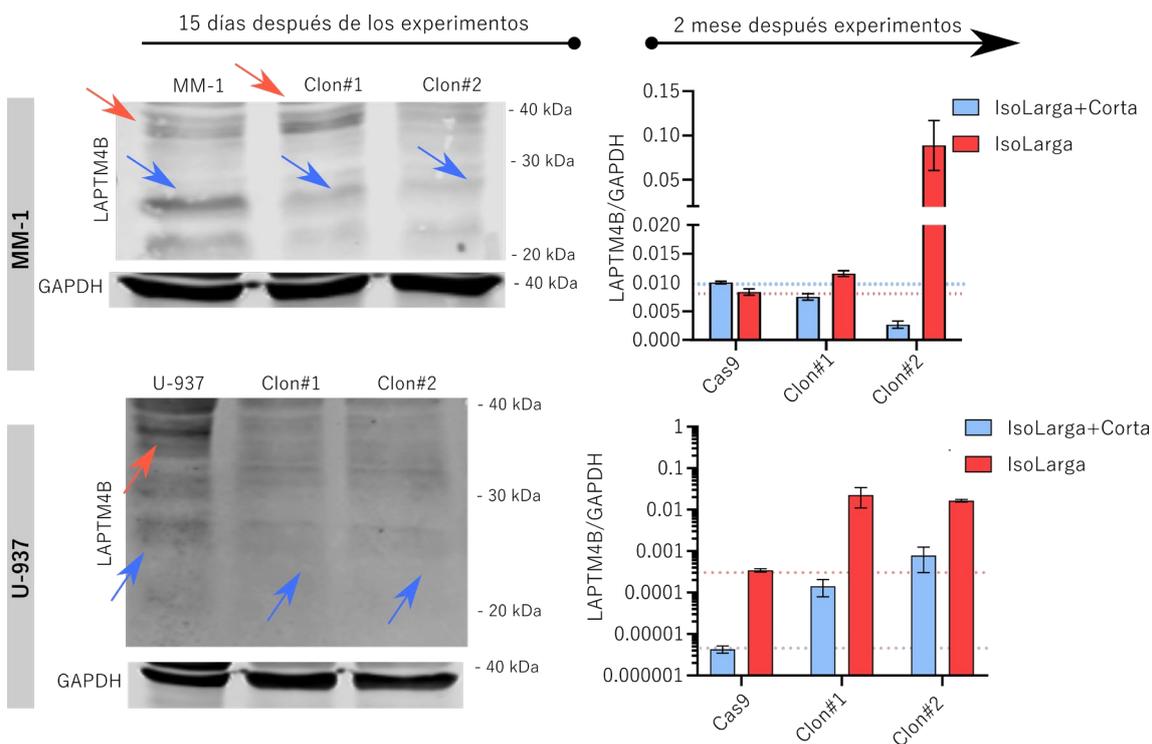


Figura 56. La expresión de LAPT4B silenciado mediante CRISPR-Cas9 se recuperó a lo largo del tiempo. La expresión de LAPT4B se analizó en las líneas MM-1 y U-937 Cas9 y en los clones seleccionados mediante RT-PCR, a nivel de ARNm y mediante Western blot, a nivel proteico. Los datos indican el nivel de expresión del gen o proteína tras normalizar con el gen/proteína de referencia GAPDH. Cada figura corresponde a un único experimento para observar la restauración de la expresión. Flechas rojas: señalan la isoforma larga, flechas azules: isoforma corta.

5. Discusión

A lo largo de este trabajo se ha descrito la implicación de LAPTM4B en la LMA. Además de observar un incremento de la expresión de la isoforma corta en pacientes de LMA, los efectos de la alta expresión, ya sea de la isoforma larga o de la corta, acrecientan la malignidad de esta enfermedad, puesto que se relacionan de forma directa con activación de vías de señalización implicadas en cáncer y con mecanismos de leucemogénesis y quimiorresistencia.

LAPTM4B como valor pronóstico y diagnóstico y el papel de las isoformas

LAPTM4B fue descrito en hepatocarcinoma y clonado por primera vez en 2003. En esos primeros estudios comienza a destacar su rol como protooncogén, junto a su función reguladora en la proliferación y supervivencia celular en ausencia de enfermedad (He et al., 2003; X. R. Liu et al., 2003; Shao et al., 2003). Mayoritariamente, debido a su relevancia clínica y probablemente a la influencia socioeconómica del cáncer en la actualidad, los artículos científicos de LAPTM4B se han centrado en su descripción en el contexto de dicha enfermedad. Este trabajo es el primero centrado en descifrar la funcionalidad de LAPTM4B en tumores hematológicos, usando la LMA como modelo, con la finalidad de que de este conocimiento proporcione las bases para una mejor comprensión de su potencial en el contexto leucémico.

La mayoría de la literatura publicada corresponde a la descripción de polimorfismos en *LAPTM4B* asociados con una mayor susceptibilidad a padecer ciertos tipos de tumores (Hashemi et al., 2016; F. Meng et al., 2013; Shaker et al., 2015; H. Tang et al., 2014; Y. Xu et al., 2012; M. Zhang et al., 2014). Dichas evidencias preliminares establecieron la relación existente entre LAPTM4B y un mal pronóstico. Sin embargo, no sólo los polimorfismos encontrados en *LAPTM4B* conllevan a una supervivencia reducida en pacientes. LAPTM4B también participa en la proliferación, migración (Q. Su et al., 2020; L. Wang et al., 2019; M. Xiao et al., 2017; Y. Yin et al., 2021), el proceso de autofagia (F. Wang et al., 2019) o en la resistencia a fármacos de las células cancerígenas (L. Li et al., 2010; Y. Meng et al., 2016; L. Wang et al., 2019). Por ello, el desarrollo de un fenotipo maligno ligado al aumento de su expresión en tumores, han resultado en la proposición de LAPTM4B

como biomarcador pronóstico en múltiples casos como, hepatocarcinoma (H. Yang et al., 2010), adenocarcinoma (L. Wang et al., 2019), cáncer de mama (L. Wang et al., 2022; M. Xiao et al., 2013), ovario (Y. Yang et al., 2008), carcinoma de cuello uterino (F. Meng, Luo, et al., 2010), glioblastoma (Dong et al., 2017) o cáncer de pulmón (Kong et al., 2016; Qiao & Hu, 2015). Asimismo, en los últimos años se destaca su empleo como marcador de diagnóstico en algunos tipos tumorales, al ser fácilmente detectable su expresión en suero (Y. Pang et al., 2021; L. Wang et al., 2022).

En lo que respecta a la LMA, en este trabajo únicamente se ha detectado un aumento de expresión de LAPTM4B en aquellos tipos asociados a un peor pronóstico, sin diferencias significativas en los tipos menos agresivos de LMA frente a muestras sanas. Además de confirmar la asociación entre la expresión de LAPTM4B y la prognosis en LMA, un reciente estudio en esta misma enfermedad revela una diferencia significativa en la expresión de LAPTM4B entre muestras sanas y pacientes de LMA sin clasificar por subtipos (Y. Huang et al., 2023). Posiblemente, esta diferencia respecto a nuestro estudio sea atribuida al empleo de una muestra poblacional más amplia. En el contexto de los tumores sólidos, la sobreexpresión de LAPTM4B se ha registrado comúnmente en todos los subtipos tumorales (L. Zhou et al., 2018), pese a ello, niveles crecientes de expresión se han relacionado inversamente con el pronóstico o con estados avanzados de enfermedad en determinadas ocasiones como en cáncer de ovario (M. Yin et al., 2011), gástrico (X. Cheng et al., 2015) o cáncer de mama (S. Li et al., 2017). En conjunto, estos resultados destacan especialmente el valor pronóstico de LAPTM4B en LMA. Mientras que, a diferencia de otros tumores, su valor como marcador diagnóstico en LMA todavía es muy limitado y serán necesarios más estudios para poder validarlo.

A lo largo de los años, la isoforma estudiada ha sido mayoritariamente la larga (35kDa), considerada como la canónica. Asimismo, en ciertos trabajos no se especificaba a cuál de las dos se hacía referencia, probablemente debido a la dificultad de discriminar las isoformas por su similitud. En cambio, en 2020 un llamativo estudio apuntaba que, contrariamente a lo clásicamente establecido, la isoforma corta (24kDa) presenta una amplia expresión tanto en tejidos sanos como

en tumores, a diferencia de la larga, que es difícilmente detectada a excepción del cerebro (K. Zhou et al., 2020). Por otro lado, la única referencia que aborda LAPTM4B en el contexto leucémico únicamente se ha centrado en explorar la funcionalidad y expresión de la isoforma larga (Y. Huang et al., 2023). No obstante, en este trabajo se han abordado ambas isoformas por primera vez en LMA y se ha podido deducir una sobreexpresión génica de la isoforma corta de LAPTM4B en pacientes de LMA, en línea con el estudio de Zhou et al. (K. Zhou et al., 2020).

Pese a las diferencias de expresión observadas entre las dos isoformas de LAPTM4B en LMA, en términos de carcinogénesis o mantenimiento de la enfermedad, no se han detectado cambios entre ellas. En concordancia con el estudio llevado a cabo por R. Milkereit, nuestros resultados mostraron que la isoforma larga se encuentra ampliamente distribuida en las células. En cambio, la isoforma corta quedaría más limitada a los orgánulos de la vía endocítica (R. Milkereit & Rotin, 2011; K. Zhou et al., 2020). Probablemente, cada una de las isoformas podría estar asociada a funciones lisosomales específicas como consecuencia de su distribución celular, consecuencia de la variación estructural en sus respectivas colas amino terminales. Dado que a lo largo de nuestro trabajo hemos detectado diferencias en la isoforma corta de LAPTM4B respecto a la larga, fundamentalmente en el contexto lisosomal y debido a su distribución intracelular, ésta podría responder mejor a estímulos cuya diana de acción sea el lisosoma o elementos ligados al mismo, como podrían ser los componentes de la maquinaria autofágica.

Según está expuesto en la literatura, una alta expresión de LAPTM4B en condiciones de estrés metabólico, podría contribuir a un aumento de la supervivencia celular, incrementado el flujo autofágico (Ji et al., 2022; Y. Li et al., 2011, 2012; Maki et al., 2015). Asimismo, LAPTM4B actúa como moderador de los mecanismos de muerte celular por regulación de la vía de los esfingolípidos, concretamente expulsando ceramida de los endosomas tardíos (Blom et al., 2015; Dichlberger et al., 2021). Estos mecanismos de protección en condiciones de estrés, junto al reclutamiento del transportador de leucina hasta los lisosomas llevado a cabo por la isoforma corta de LAPTM4B, permite la activación de mTOR

(Cormerais et al., 2020; Deleyto-Seldas & Efeyan, 2021; R. Milkereit et al., 2015; K. Zhou et al., 2018). En suma, tal y como recoge la **Figura 57**, estos datos sugieren que LAPT4B participaría en la regulación de la vía mTOR/TFEB, como se ha detallado en otros contextos ajenos al cáncer (Gu et al., 2020), y explican la modulación de la isoforma corta de LAPT4B por la disponibilidad de nutrientes (K. Zhou et al., 2020).

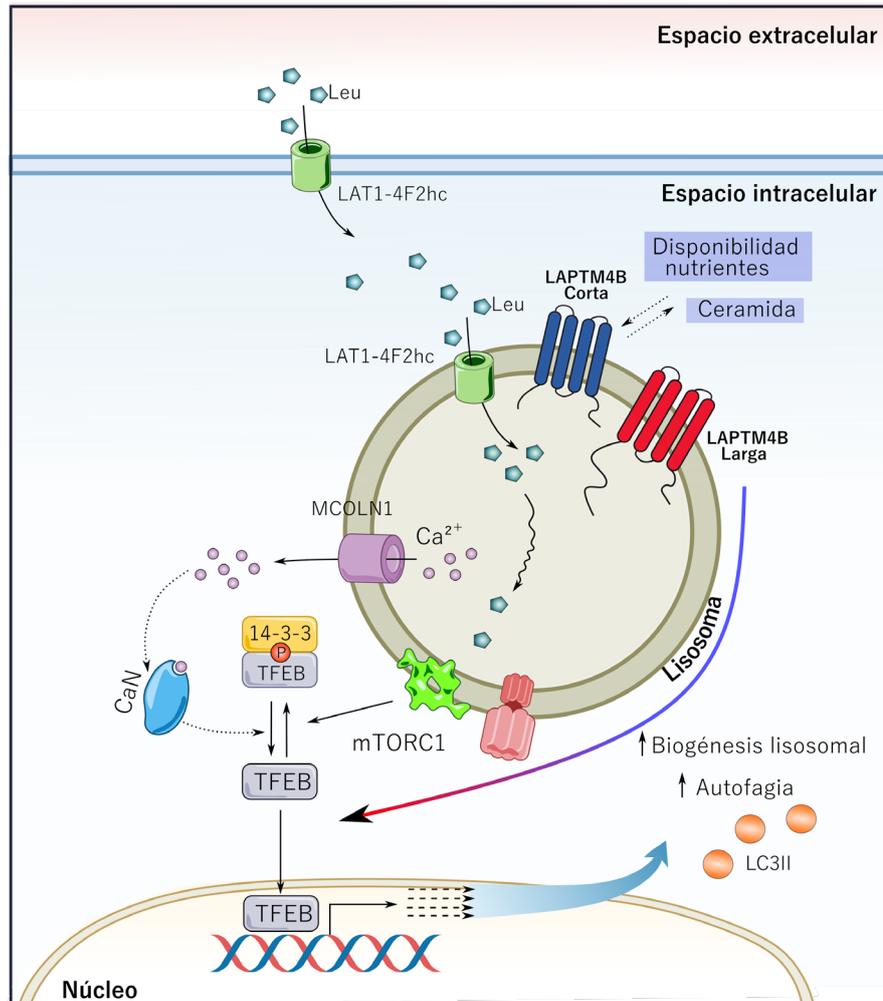


Figura 57. Papel de las isoformas de LAPT4B en LMA. Basado en (Blom et al., 2015; R. Milkereit et al., 2015; K. Zhou et al., 2020).

LAPT4B en LMA. Implicación de la señalización intracelular.

En el contexto leucémico, recientemente se ha demostrado que el efecto proliferativo de las células leucémicas se produce en presencia de LAPT4B y que

podría estar modulado por la proteína ribosomal RPS9, asociada con un aumento de la señalización de Stat3 (Y. Huang et al., 2023). Opuestamente, en nuestro trabajo dicha vía de señalización no resultó sobreactivada en presencia de LAPTM4B, probablemente debido al abordaje técnico empleado y a su expresión como efecto colateral de la activación de RPS9, mientras sí lo hicieron las vías de las MAPK y de PI3k/Akt. Es decir, la sobreexpresión de LAPTM4B aumenta potencialmente la señalización de la vía de las MAPK. De forma similar, Zhou et al., observaron el mismo efecto en hepatocarcinoma tras la sobreexpresión de la isoforma larga de LAPTM4B, sugiriendo que el incremento de MAPK en la señalización potencia las capacidades cancerígenas de las células (R. L. Zhou et al., 2015) o induce la autofagia (Ji et al., 2022).

En resumen, nuestros resultados sugieren que la actividad señalizadora iniciada por LAPTM4B, activaría los RTQ y potenciará la capacidad mitogénica de las células mediante la sobreactivación de la vía Ras-Raf-MAPK (Kolch, 2000). Curiosamente, tras explorar la inhibición de esta vía de señalización como potencial diana de acción frente a pacientes de LMA, hemos podido observar una regulación cruzada entre las vías de señalización MEK/Erk y PI3k/Akt. Este hecho podría explicarse por la adición de Ly294-002 a sitios de unión del ATP presentes en MEK o Erk, o simplemente debido a la continuidad innata del funcionamiento biológico, donde ningún proceso es un hecho aislado, y la inhibición de PI3K puede producir la inhibición de MEK/Erk (Duff et al., 2021). Si bien, otra teoría por explorar sería evaluar si la interacción de LAPTM4B con la subunidad p85 α de PI3K (R. L. Zhou et al., 2015), establece una conexión entre las vías de señalización PI3K/mTOR y Ras/Erk. Por tal motivo, la inhibición del eje de señalización PI3k, aguas arriba tanto de Ras como de Akt, podría proporcionar una ventana terapéutica más prometedora que la inhibición de la actividad de una de las vías de señalización exclusivamente en LMA con alta expresión de LAPTM4B (Will et al., 2014). Alternativamente, la combinación de inhibidores para ambas vías podría resultar útil para reducir los efectos derivados de una señalización sobreactivada (Ebi et al., 2013), así como, para evitar la resistencia farmacológica (Dunn et al., 2022).

Dado que la mayoría de los efectos transformadores son claramente detectables por una mayor capacidad de proliferación y autorrenovación *in vivo*, nos llevan a pensar que, en efecto, el microambiente tumoral o la presión derivada del mismo, potencia el efecto oncogénico de LAPTM4B. Estas conclusiones se correlacionan con las observadas en cáncer de mama, donde se ha demostrado que la sobreexpresión de LAPTM4B no aumenta la viabilidad de las células a nivel basal, sin embargo, dicha sobreexpresión ejerce efectos en el crecimiento celular bajo condiciones de estrés (Y. Li et al., 2011). En este proceso, los lisosomas jugarían un papel importante dado que en ellos se produce la activación de mTORC1 y es el espacio físico donde podrían interaccionar mTORC1 y Erk, apoyando de nuevo, la regulación entre ambas vías (Mendoza et al., 2011). Finalmente, podríamos afirmar que el aumento en la señalización de las MAPK y su interacción con la vía PI3K/Akt derivado de una alta expresión de LAPTM4B, resultaría en una LMA de mayor agresividad detectada mayormente por su mayor proliferación y autorrenovación en modelos animales (**Figura 58**).

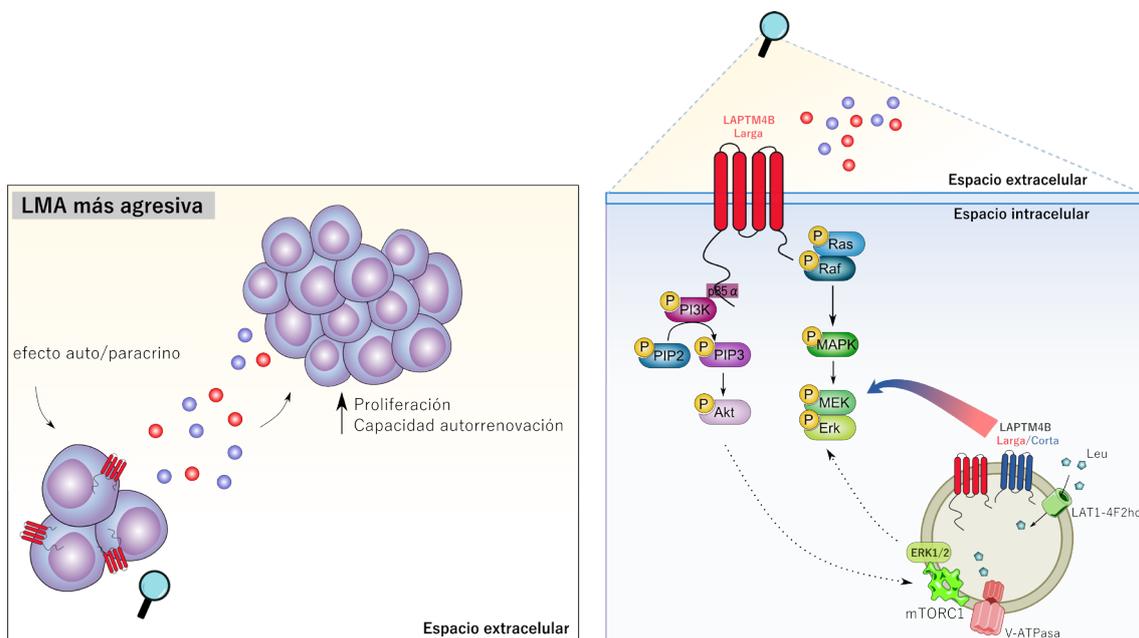


Figura 58. Efecto de la señalización derivada de una alta expresión de LAPTM4B en LMA.

LAPTM4B y la quimiorresistencia

A pesar de los avances en investigación, la leucemia mieloide aguda continúa siendo una enfermedad de mal pronóstico, mayoritariamente debido a la alta frecuencia de recaídas letales (Thol & Ganser, 2020; Trumpp & Haas, 2022). En el trabajo actual, la expresión ectópica de LAPTM4B confirma los datos derivados del análisis de expresión génica incrementada en el momento de la recaída frente al del diagnóstico. La relación entre LAPTM4B y la resistencia farmacológica ha sido recogida en numerosas ocasiones en la bibliografía (de Ronde et al., 2013; Y. Li et al., 2010; M. Yin et al., 2011; L. Zhou et al., 2011) y podría estar en parte explicada por su ubicación cromosómica 8q22, región conocida por estar asociada con un peor pronóstico y una mayor resistencia farmacológica (G. Hu et al., 2009; Y. Li et al., 2010; E. Pang et al., 2005). En nuestro modelo de estudio, nos encontramos por primera vez frente a un aumento de resistencia a citarabina en líneas de LMA con alta expresión de LAPTM4B. Si bien LAPTM4B se ha asociado con resistencia a diferentes compuestos como antraciclinas (Y. Li et al., 2010) o a combinaciones quimioterapéuticas basadas en cisplatino en tumores sólidos (M. Yin et al., 2011), y aparece en diferentes firmas génicas posiblemente ligadas a resistencia en leucemia (Farge et al., 2017; Y.-H. Wang et al., 2020), aún no se había comprobado su relación con la resistencia a citarabina. El hecho de que la citarabina sea el componente principal del régimen 7+3 (Rowe, 2022), correspondiente al tratamiento más empleado frente a la LMA, resalta el valor de estos hallazgos.

En este contexto, se han descrito un gran repertorio de estrategias terapéuticas con el objetivo de evitar o revertir la resistencia ligada a LMA. Muchas de las cuales, han fracasado antes de llegar a la clínica, como los inhibidores del transportador ABCB1 (Shaffer et al., 2012). En base a los precedentes de otros grupos de investigación y a las observaciones realizadas durante el trabajo experimental, se proponen las siguientes terapias combinadas como tratamiento frente a la quimiorresistencia asociada a LAPTM4B siguiendo el modelo descrito en la **Figura 59**.

A pesar de que LAPTM4B esté implicado en la regulación de la autofagia, y a su vez, estos procesos puedan actuar como como potenciadores de una mayor tolerancia al

estrés metabólico y genotóxico (Y. Li et al., 2011, 2012), la ausencia de reversión de la quimiorresistencia descarta el proceso de la autofagia como actor principal de dicho proceso. Anteriormente, el tratamiento combinado de cloroquina con citarabina u otros agentes quimioterapéuticos se ha empleado en el caso del cáncer consiguiendo un efecto inhibitorio aditivo en LMA (Grønningsæter et al., 2021). Al igual que en nuestro trabajo, no se produjo sinergia entre ambos fármacos o no se rescata el fenotipo sensible en todos ellos (Cheong et al., 2016; N. Visser et al., 2021). Sin embargo, no existían evidencias previas respecto al empleo de esta combinación en el caso de cáncer con sobreexpresión de LAPTM4B, lo que resultaba de interés para desvelar si la función fisiológica de LAPTM4B interfiere en cómo se producen los procesos cancerosos. En este trabajo se expone que la modulación de la autofagia por parte de LAPTM4B podría estar involucrada de forma indirecta en la resistencia, sin ser la causa principal de la misma. Dicha participación explicaría la acción adyuvante de la cloroquina en la citotoxicidad mediada por citarabina, como se ha observado junto a otros tratamientos quimioterapéuticos (Balic et al., 2014; J. R. Hwang et al., 2020; N. Zhang et al., 2017).

Siguiendo líneas de razonamiento similar, resulta de gran interés que CDA sea una diana de acción viable para revertir la quimiorresistencia asociada a las células leucémicas (Frances & Cordelier, 2020; Heo et al., 2022). Pero todavía más interesante resulta el efecto preferente de su inhibición en las células con sobreexpresión de LAPTM4B. En condiciones normales, la citidina desaminasa se encarga del reciclaje de pirimidinas, tanto para la síntesis de nuevos nucleótidos como para proporcionar carbón y nitrógeno a las células (Frances & Cordelier, 2020). Apoyando los efectos observados en LMA, CDA ha sido descrita a lo largo de los años por su relación con la resistencia a fármacos (Gao et al., 2021; Kreis et al., 1977; Momparler et al., 1996; Riva et al., 1992; Ye et al., 2015; Yusa et al., 1992), aunque no exenta de controversia respecto a si es su alta (Schröder et al., 1998) o baja expresión (Fanciullino et al., 2018; Kulsoom et al., 2018), la asociada a un peor pronóstico o mayor toxicidad en LMA. Por su parte, el fármaco tetrahidrouridina

inhibe la desaminación llevada a cabo por CDA en presencia de AraC (Camiener, 1968). A pesar de su buena biodisponibilidad y perfil farmacocinético (Beumer et al., 2008; Holleran et al., 2015; Riccardi et al., 1982), tanto su administración de forma individual como las combinaciones con AraC relatadas en la literatura, han sido escasas o con resultados poco esclarecedores en términos de supervivencia (Kreis et al., 1977, 1991; Wong et al., 1979). Estas evidencias sugieren que el tratamiento combinado podría ser efectivo únicamente en determinados subgrupos de pacientes. Por lo tanto, se pone de manifiesto la imperante necesidad de evaluar en detalle los efectos de dicho tratamiento en términos de supervivencia en LMA, así como, el explorar otras vías terapéuticas tal como el silenciamiento de CDA, descrito anteriormente en leucemia mieloide crónica (Wei et al., 2018)

Acercando la experimentación a las causas de resistencia previamente descritas para LAPTM4B, ha quedado patente en este trabajo que la inhibición de la muerte celular por apoptosis constituye otro fenómeno de resistencia (Öksüzöglü & Kozalak, 2021; Safa, 2022). El conocimiento previo de LAPTM4B como inhibidor de la apoptosis (L. Li et al., 2011; F. Meng et al., 2015; Y. Meng et al., 2016; H. Wang et al., 2023), podría explicar la efectividad inesperada del tratamiento empleado. Dado que la senescencia se ha descrito recientemente como un proceso dual y dinámico, por su papel como supresor de tumores, así como, debido a su efecto potenciador de los mecanismos oncogénicos (J. Yang et al., 2021), inicialmente nos centramos en demostrar fallidamente que dichas células quimiorresistentes eran senescentes. En cambio, los daños en el ADN producidos por la quimioterapia o por procesos intrínsecos de las células tumorales (Barnieh et al., 2021), conducen a la generación de resistencia al tratamiento. Consecuentemente, tras el empleo de inhibidores de ATR se pueden dar fenómenos de resensibilización a los fármacos (Stefanski et al., 2019). En resumen, el efecto diferencial de esta terapia podría deberse a mayores daños del material genético asociados a una alta expresión de LAPTM4B y producidos como consecuencia de la quimioterapia o como consecuencia de la activación de resistencia a muerte celular.

Aunque probablemente muchos de los efectos derivados de la actividad de LAPTM4B contribuyan de forma colateral a la adquisición o mantenimiento de la quimiorresistencia a citarabina, el silenciamiento de LAPTM4B *per se* podría resultar de gran utilidad para resensibilizar las células a la quimioterapia, ya sea mediante el empleo de la técnica de edición genómica CRISPR-Cas9 como en nuestro caso, o mediante ARN de interferencia (L. Li et al., 2010; Q. Su et al., 2020). Mientras que, su inhibición farmacológica con moléculas dirigidas de forma específica podría ser una prometedora estrategia para disminuir la resistencia o idealmente, restituir la sensibilidad. Finalmente, el uso de inmunoterapia sería una terapia innovadora a considerar, dado que LAPTM4B se ha considerado un antígeno específico de tumor (Shi et al., 2014), aunque todavía existe un gran desconocimiento acerca de ello.

A pesar de que eludir la quimiorresistencia en LMA requerirá de un amplio estudio de LAPTM4B y de los mecanismos que propician la resistencia, en este estudio queda patente su participación en los mismos y se presentan algunas de las posibles vías de acción para hacerles frente (**Figura 59**).

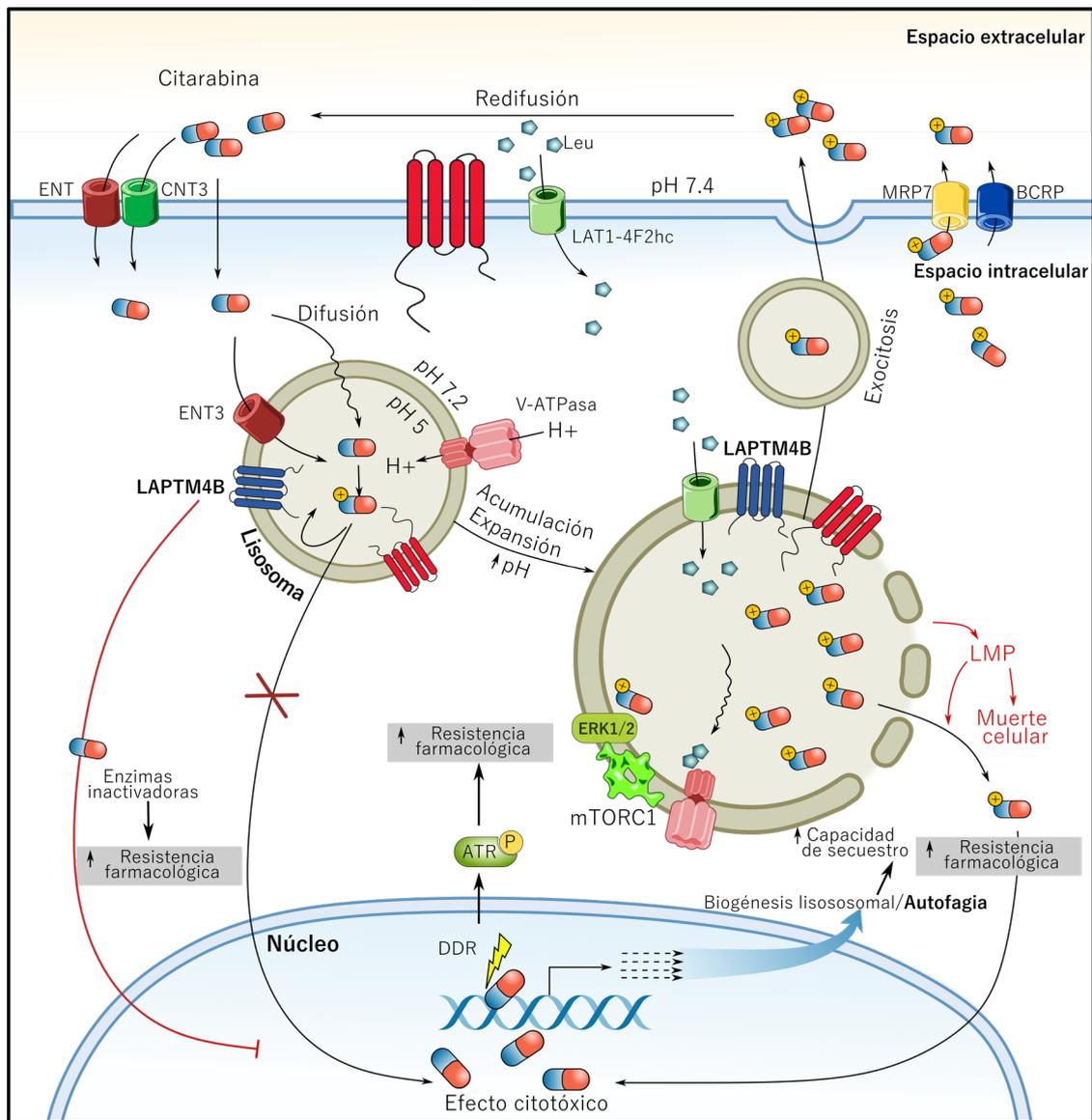


Figura 59. Modelo de las posibles vías de quimiorresistencia ligadas a LAPTMB en LMA.

LAPTMB como diana terapéutica o su implicación en el diseño de fármacos.

La sobreexpresión de LAPTMB detectada en LMA y sus efectos derivados, patentes tanto en esta enfermedad como en otros tumores, indicarían que la regulación de esta proteína mediante el desarrollo de nuevas estrategias podría generar importantes beneficios clínicos en el área del cáncer (Figura 60). Hasta la fecha, las investigaciones clínicas relacionados con LAPTMB mayoritariamente se han centrado en descifrar el papel diagnóstico y pronóstico de la expresión de

LAPTM4B. A pesar de que estos estudios han revelado su importante papel como biomarcador en múltiples tipos tumorales, todavía no existen en la clínica terapias dirigidas específicamente a la inhibición de LAPTM4B.

Posiblemente, la estrategia farmacológica más cercana a la inhibición directa de LAPTM4B ha sido el ETS (etilglioxal bistiosemicarbazón), el cual reduce la proliferación celular, la metástasis y el crecimiento tumoral por inducción de la apoptosis en carcinoma hepatocelular (M. Li et al., 2016). Este estudio quedó relegado al olvido, y la ausencia de más estudios o ensayos clínicos acerca de este compuesto no trae buenos presagios, por lo que se necesitarán nuevas aproximaciones para la inhibición de LAPTM4B. Idealmente, explorar en detalle los efectos del silenciamiento de nuestro gen de interés, podría ser de utilidad para el tratamiento de LMA con una alta expresión del mismo. A pesar de las limitaciones técnicas de nuestro estudio, la disminución en la resistencia a AraC y la reducción en la capacidad clonogénica observada tras el silenciamiento de LAPTM4B, similar a lo descrito por el Huang y su equipo en LMA (Y. Huang et al., 2023), señalan el importante papel de LAPTM4B en leucemia. Asimismo, el silenciamiento de una de las isoformas respecto a la otra podrá desenmascarar las funciones individualmente y ayudará a revelar si existe un mecanismo de compensación de la función entre ellas.

Otra estrategia indirecta para reducir las capacidades malignas y la agresividad asociada a la alta actividad señalizadora, sería mediante el empleo de inhibidores de la señalización. Debido a las graves consecuencias derivadas de la alteración de ciertas vías de señalización en cáncer, se han desarrollado compuestos específicos contra algunos de sus componentes, como los receptores tirosina quinasa el caso del imatinib, que bloquea a BCR-ABL en leucemia mieloide crónica (Druker et al., 2001). Particularmente, LAPTM4B se encuentra involucrado en diferentes vías de señalización como las de EGFR (X. Tan et al., 2015), AP4 (Y. Meng et al., 2018), PI3K/Akt (X.-C. Xu et al., 2021), Stat3 (Y. Huang et al., 2023), mTORC1 (K. Zhou et al., 2020) y en la vía de las MAPK, la más relevante en nuestro trabajo. Por tanto, se deduce que el bloqueo de la misma podría producir grandes beneficios y reducir la malignidad de la LMA. Adicionalmente, la inhibición de la autofagia mediante

cloroquina u otros inhibidores de la misma, ayudaría a reducir la resistencia a muerte celular ligada a LAPTM4B y causar la muerte celular de las células leucémicas (Y. Li et al., 2011, 2012).

Posiblemente, para enfrentar el gran problema de la quimiorresistencia existente en LMA, la aproximación más común sería el empleo de terapias combinadas para mejorar su efectividad (Ayoub, 2021; Mokhtari et al., 2017). A pesar de que, en nuestro caso, el empleo de inhibidores de la señalación de MAPK junto a citarabina no revirtió la resistencia farmacológica, quizás redefiniendo los tratamientos o las dosis empleadas se consiga obtener un beneficio terapéutico (L. Wang et al., 2019; X.-C. Xu et al., 2021). Esta estrategia ofrece una amplia ventana terapéutica en LMA según los datos de señalización y quimiorresistencia derivados de este trabajo, en conjunto con los obtenidos de las bases de datos.

En nuestras manos, la inhibición de la enzima CDA junto al agente citotóxico citarabina parece ser la estrategia más directa para eliminar dicha resistencia. Asimismo, a falta de muchas preguntas por responder acerca de CDA y LAPTM4B, complementar esta terapia con el empleo de agentes diferenciadores comúnmente usados en LMA, como la vitamina D3 (Mejer et al., 1990), podría provocar efectos más notables en aquellas células con mayor expresión de LAPTM4B, debido a su estado menos diferenciado (Y. Meng et al., 2016; Ng et al., 2016). Mientras que combinar inhibidores de autofagia o de ATR junto a quimioterapia, será de gran ayuda para detener el comienzo o revertir la quimiorresistencia. Pese a todo lo expuesto, todavía quedan muchos enigmas por solventar y validar los modelos presentados *in vivo* será de gran ayuda para poder resolverlos.

Adicionalmente, el desarrollo de terapias alterativas como el uso de anticuerpos monoclonales frente a LAPTM4B o su inhibición mediante péptidos podrían aguardar grandes beneficios (Karami Fath et al., 2022; Lu et al., 2021). En la misma línea, la modulación de receptores u otras proteínas fácilmente atacables, situadas aguas arriba de LAPTM4B, podría resultar beneficiosa. Un ejemplo sería incrementar la expresión del microARN miR-188-5p mediante la modulación de su

proteína de unión SBF2-AS1 (Tian et al., 2019), con el fin de disminuir la acción de LAPTM4B sobre el que ejerce una regulación negativa (H. Zhang et al., 2015). Sin embargo, serán necesarios estudios más profundos sobre el papel de LAPTM4B y sus interacciones proteicas en leucemia para desarrollar terapias efectivas ante esta proteína.

En conjunto, los datos actuales apuntan hacia un creciente interés clínico de LAPTM4B en LMA, sugiriendo que la expresión del mismo puede ser útil como biomarcador con valor diagnóstico y especialmente pronóstico, con carácter predictivo de las recaídas en LMA o incluso, que su uso como diana terapéutica puede ser beneficiosa para ciertos pacientes.

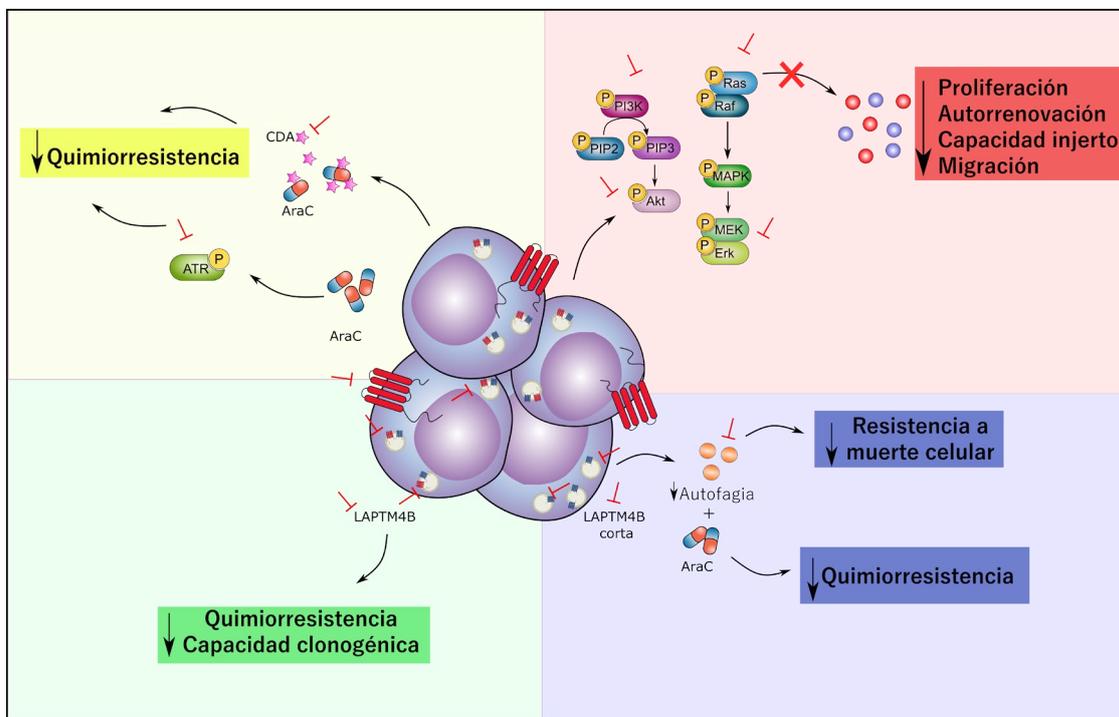


Figura 60. Posibles estrategias terapéuticas dirigidas a LAPTM4B y sus efectos en el contexto leucémico.

6. Conclusiones

En base a todo lo expuesto hasta ahora, se pueden extraer cinco grandes conclusiones de esta tesis doctoral que se detallan a continuación.

- 1) La isoforma corta de LAPTM4B está sobreexpresada en LMA, mientras que la expresión de la isoforma larga es limitada y similar a la de donantes sanos.
- 2) Existe una distribución celular diferente respecto a ambas isoformas de LAPTM4B. La isoforma larga se encuentra tanto en las membranas celulares como en lisosomas, mientras que la corta únicamente se ha detectado en los lisosomas. Este hecho otorga una mayor sensibilidad a la isoforma corta ante tratamientos dirigidos a los lisosomas.
- 3) LAPTM4B tiene un papel relevante en los procesos de autofagia y regulación de nutrientes, debido a su participación en la modulación de la actividad de mTORC/TFEB, aunque estas funciones parecen más atribuibles a la isoforma corta.
- 4) En el contexto leucémico no se han observado diferencias funcionales evidentes entre ambas isoformas. La señalización por LAPTM4B está mediada por la vía de las MAPK e induce la expresión de un fenotipo de resistencia a quimioterapia tanto a nivel funcional como genético, debido posiblemente a diferentes factores como daños en el ADN, la desestabilización de la vía de activación de los fármacos o incluso a la afectación del proceso de autofagia. Asimismo, aumenta la capacidad regenerativa de la leucemia y la migración de las células leucémicas *in vivo*.
- 5) Teniendo en cuenta la expresión diferencial de LAPTM4B y su asociación con un mal pronóstico en LMA, podría existir una ventana terapéutica para su inhibición. Además, se ha demostrado que LAPTM4B es un biomarcador de peor pronóstico o de mayor riesgo a la quimiorresistencia en LMA.

7. Bibliografía

- Aasebø, E., Bartaula-Brevik, S., Hernandez-Valladares, M., & Bruserud, Ø. (2018). Vacuolar ATPase as a possible therapeutic target in human acute myeloid leukemia. *Expert Review of Hematology*, *11*(1), 13–24. <https://doi.org/10.1080/17474086.2018.1407239>
- Abeyta, M. J., Clark, A. T., Rodriguez, R. T., Bodnar, M. S., Pera, R. A., & Firpo, M. T. (2004). Unique gene expression signatures of independently-derived human embryonic stem cell lines. *Human Molecular Genetics*, *13*(6), 601–608. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh068>
- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. (2019). *Informe de posicionamiento terapéutico de GEMTUZUMAB OZOGAMICINA (MYLOTARG®) en el tratamiento de pacientes con leucemia mieloide aguda de novo que exprese CD33 previamente no tratados*. <https://www.aemps.gob.es/medicamentosUsoHumano/informesPublicos/docs/IPT-gemtuzumab-ozogamicina-Mylotarg-LMA.pdf>
- Agliano, A., Martin-Padura, I., Mancuso, P., Marighetti, P., Rabascio, C., Pruneri, G., Shultz, L. D., & Bertolini, F. (2008). Human acute leukemia cells injected in NOD/LtSz-*scid*/IL-2R γ null mice generate a faster and more efficient disease compared to other NOD/*scid*-related strains. *International Journal of Cancer*, *123*(9), 2222–2227. <https://doi.org/10.1002/ijc.23772>
- Ali, S., Dunmore, H.-M., Karres, D., Hay, J. L., Salmonsson, T., Gisselbrecht, C., Sarac, S. B., Bjerrum, O. W., Hovgaard, D., Barbachano, Y., Nagercoil, N., & Pignatti, F. (2019). The EMA Review of Mylotarg (Gemtuzumab Ozogamicin) for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia. *The Oncologist*, *24*(5), e171–e179. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2019-0025>
- Allison, A. C. (1974). Lysosomes in cancer cells. *Journal of Clinical Pathology*, *27*(Supplement 7), 43–50. https://doi.org/10.1136/jcp.27.suppl_7.43
- American Cancer Society. (2022). *Cancer Facts and Figures 2022*. <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2022/2022-cancer-facts-and-figures.pdf>
- Arber, D. A., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M. J., Le Beau, M. M., Bloomfield, C. D., Cazzola, M., & Vardiman, J. W. (2016). The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, *127*(20), 2391–2405. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-03-643544>
- Asou, H., Tashiro, S., Hamamoto, K., Otsuji, A., Kita, K., & Kamada, N. (1991). Establishment of a human acute myeloid leukemia cell line (Kasumi-1) with 8;21 chromosome translocation. *Blood*, *77*(9), 2031–2036. <https://doi.org/10.1182/blood.V77.9.2031.2031>

- Assaf, N., Lefebvre, C., Raggiueneau, V., Guignedoux, G., Marceau-Renaut, A., Chevalier, S., Tondeur, S., Bories, D., Benramdane, R., Rousselot, P., & Terré, C. (2022). AML with inv(16)/t(16;16) and high-risk cytogenetic abnormalities: atypical features and unfavorable outcome. *Hematology*, *27*(1), 636–641. <https://doi.org/10.1080/16078454.2022.2078027>
- Baba, K., Kuwada, S., Nakao, A., Li, X., Okuda, N., Nishida, A., Mitsuda, S., Fukuoka, N., Kakeya, H., & Kataoka, T. (2020). Different localization of lysosomal-associated membrane protein 1 (LAMP1) in mammalian cultured cell lines. *Histochemistry and Cell Biology*, *153*(4), 199–213. <https://doi.org/10.1007/s00418-019-01842-z>
- Bagger, F. O., Sasivarevic, D., Sohi, S. H., Laursen, L. G., Pundhir, S., Sønderby, C. K., Winther, O., Rapin, N., & Porse, B. T. (2016). BloodSpot: a database of gene expression profiles and transcriptional programs for healthy and malignant haematopoiesis. *Nucleic Acids Research*, *44*(D1), D917–D924. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1101>
- Bainton, D. F. (1981). The discovery of lysosomes. *Journal of Cell Biology*, *91*(3), 66s–76s. <https://doi.org/10.1083/jcb.91.3.66s>
- Bala, S., & Szabo, G. (2018). TFEB, a master regulator of lysosome biogenesis and autophagy, is a new player in alcoholic liver disease. *Digestive Medicine Research*, *1*, 16. <https://doi.org/10.21037/dmr.2018.09.03>
- Balic, A., Sørensen, M. D., Trabulo, S. M., Sainz, B., Cioffi, M., Vieira, C. R., Miranda-Lorenzo, I., Hidalgo, M., Kleeff, J., Erkan, M., & Heeschen, C. (2014). Chloroquine Targets Pancreatic Cancer Stem Cells via Inhibition of CXCR4 and Hedgehog Signaling. *Molecular Cancer Therapeutics*, *13*(7), 1758–1771. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0948>
- Barnieh, F. M., Loadman, P. M., & Falconer, R. A. (2021). Progress towards a clinically-successful ATR inhibitor for cancer therapy. *Current Research in Pharmacology and Drug Discovery*, *2*, 100017. <https://doi.org/10.1016/j.crphar.2021.100017>
- Becker, M. W., & Jordan, C. T. (2011). Leukemia stem cells in 2010: Current understanding and future directions. *Blood Reviews*, *25*(2), 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2010.11.001>
- Begna, K. H., Kittur, J., Gangat, N., Alkhateeb, H., Patnaik, M. S., Al-Kali, A., Elliott, M. A., Hogan, W. J., Litzow, M. R., Pardhanani, A., Hanson, C. A., Ketterling, R. P., & Tefferi, A. (2022). European LeukemiaNet-defined primary refractory acute myeloid leukemia: the value of allogeneic hematopoietic stem cell transplant and overall response. *Blood Cancer Journal*, *12*(1), 7. <https://doi.org/10.1038/s41408-022-00606-8>

- Bennett, J. M., Catovsky, D., Daniel, M.-T., Flandrin, G., Galton, D. A., Gralnick, H. R., & Sultan, C. (1976). Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group. *British Journal of Haematology*, 33(4), 451–458. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1976.tb03563.x>
- Berg, A. L., Rowson-Hodel, A., Wheeler, M. R., Hu, M., Free, S. R., & Carraway, K. L. (2022). Engaging the Lysosome and Lysosome-Dependent Cell Death in Cancer. In H. N. Mayrovitz (Ed.), *Breast Cancer* (pp. 195–230). Exon Publications. <https://doi.org/10.36255/exon-publications-breast-cancer-lysosome>
- Bernard, J., Weil, M., Boiron, M., Jacquillat, C., Flandrin, G., & Gemon, M. F. (1973). Acute promyelocytic leukemia: results of treatment by daunorubicin. *Blood*, 41(4), 489–496. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4510926>
- Besser, D., Bromberg, J. F., Darnell, J. E., & Hanafusa, H. (1999). A Single Amino Acid Substitution in the v-Eyk Intracellular Domain Results in Activation of Stat3 and Enhances Cellular Transformation. *Molecular and Cellular Biology*, 19(2), 1401–1409. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.2.1401>
- Beumer, J. H., Eiseman, J. L., Parise, R. A., Florian, J. A., Joseph, E., D'Argenio, D. Z., Parker, R. S., Kay, B., Covey, J. M., & Egorin, M. J. (2008). Plasma pharmacokinetics and oral bioavailability of 3,4,5,6-tetrahydrouridine, a cytidine deaminase inhibitor, in mice. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 62(3), 457–464. <https://doi.org/10.1007/s00280-007-0625-2>
- Blom, T., Li, S., Dichlberger, A., Bäck, N., Kim, Y. A., Loizides-Mangold, U., Riezman, H., Bittman, R., & Ikonen, E. (2015). LAPTM4B facilitates late endosomal ceramide export to control cell death pathways. *Nature Chemical Biology*, 11(10), 799–806. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1889>
- Bonnet, D., & Dick, J. E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Medicine*, 3(7), 730–737. <https://doi.org/10.1038/nm0797-730>
- Bortolozzi, R., Bresolin, S., Rampazzo, E., Paganin, M., Maule, F., Mariotto, E., Boso, D., Minuzzo, S., Agnusdei, V., Viola, G., te Kronnie, G., Cazzaniga, G., Basso, G., & Persano, L. (2018). AKR1C enzymes sustain therapy resistance in paediatric T-ALL. *British Journal of Cancer*, 118(7), 985–994. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0014-0>
- Braicu, C., Buse, M., Busuioc, C., Drula, R., Gulei, D., Raduly, L., Rusu, A., Irimie, A., Atanasov, A. G., Slaby, O., Ionescu, C., & Berindan-Neagoe, I. (2019). A Comprehensive Review on MAPK: A Promising Therapeutic Target in Cancer. *Cancers*, 11(10), 1618. <https://doi.org/10.3390/cancers11101618>

- Bryder, D., Rossi, D. J., & Weissman, I. L. (2006). Hematopoietic Stem Cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell. *The American Journal of Pathology*, *169*(2), 338–346. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.060312>
- Bullinger, L., Döhner, K., Kranz, R., Stirner, C., Fröhling, S., Scholl, C., Kim, Y. H., Schlenk, R. F., Tibshirani, R., Döhner, H., & Pollack, J. R. (2008). An FLT3 gene-expression signature predicts clinical outcome in normal karyotype AML. *Blood*, *111*(9), 4490–4495. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-09-115055>
- Burke, M. J., Burns, L., Linden, M. A., Lindgren, B., Verneris, M. R., Weisdorf, D., & Ustun, C. (2013). How do we define complete remission for acute myeloid leukemia in the current era? Results of an international survey. *American Journal of Hematology*, *88*(9), 826–827. <https://doi.org/10.1002/ajh.23497>
- Cabukusta, B., & Neefjes, J. (2018). Mechanisms of lysosomal positioning and movement. *Traffic*, *19*(10), 761–769. <https://doi.org/10.1111/tra.12587>
- Camienner, G. W. (1968). Studies of the enzymatic deamination of ara-cytidine—V. *Biochemical Pharmacology*, *17*(9), 1981–1991. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(68\)90114-7](https://doi.org/10.1016/0006-2952(68)90114-7)
- Cancer Stem Cells. (2018). In G. Papaccio & V. Desiderio (Eds.), *Cancer Stem Cell* (Vol. 1692). Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7401-6>
- Cao, M., Luo, X., Wu, K., & He, X. (2021). Targeting lysosomes in human disease: from basic research to clinical applications. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *6*(1), 379. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00778-y>
- Cargnello, M., Tcherkezian, J., & Roux, P. P. (2015). The expanding role of mTOR in cancer cell growth and proliferation. *Mutagenesis*, *30*(2), 169–176. <https://doi.org/10.1093/mutage/geu045>
- Carroll, D., & St. Clair, D. K. (2018). Hematopoietic Stem Cells: Normal Versus Malignant. *Antioxidants and Redox Signaling*, *29*(16), 1612–1632. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7326>
- Chang, H., & Zou, Z. (2020). Targeting autophagy to overcome drug resistance: further developments. *Journal of Hematology and Oncology*, *13*(1), 159. <https://doi.org/10.1186/s13045-020-01000-2>
- Chen, Y., Hua, Y., Li, X., Arslan, I. M., Zhang, W., & Meng, G. (2020). Distinct Types of Cell Death and the Implication in Diabetic Cardiomyopathy. *Frontiers in Pharmacology*, *11*, 42. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00042>
- Cheng, X., Zheng, Z., Bu, Z., Wu, X., Zhang, L., Xing, X., Wang, X., Hu, Y., Du, H., Li, L., Li, S., Zhou, R., Wen, X.-Z., & Ji, J.-F. (2015). LAPTM4B-35, a Cancer-Related Gene, Is Associated with Poor Prognosis in TNM Stages I-III Gastric Cancer Patients. *PLoS ONE*, *10*(4), e0121559. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121559>

- Cheng, X.-J., Xu, W., Zhang, Q.-Y., & Zhou, R.-L. (2008). Relationship between LAPTM4B gene polymorphism and susceptibility of colorectal and esophageal cancers. *Annals of Oncology*, *19*(3), 527–532. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdm469>
- Cheong, J.-W., Kim, Y., Eom, J. I., Jeung, H.-K., & Min, Y. H. (2016). Enhanced autophagy in cytarabine arabinoside-resistant U937 leukemia cells and its potential as a target for overcoming resistance. *Molecular Medicine Reports*, *13*(4), 3433–3440. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.4949>
- Chow, Y.-P., Alias, H., & Jamal, R. (2017). Meta-analysis of gene expression in relapsed childhood B-acute lymphoblastic leukemia. *BMC Cancer*, *17*(1), 120. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3103-1>
- Chu, C., Niu, X., Ou, X., & Hu, C. (2019). LAPTM4B knockdown increases the radiosensitivity of EGFR-overexpressing radioresistant nasopharyngeal cancer cells by inhibiting autophagy. *Oncotargets and Therapy*, *12*, 5661–5677. <https://doi.org/10.2147/OTT.S207810>
- Cormerais, Y., Vučetić, M., Parks, S. K., & Pouyssegur, J. (2020). Amino Acid Transporters Are a Vital Focal Point in the Control of mTORC1 Signaling and Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(1), 23. <https://doi.org/10.3390/ijms22010023>
- Cornet-Masana, J. M., Banús-Mulet, A., Carbó, J. M., Torrente, M. Á., Guijarro, F., Cuesta-Casanovas, L., Esteve, J., & Risueño, R. M. (2019). Dual lysosomal-mitochondrial targeting by antihistamines to eradicate leukaemic cells. *EBioMedicine*, *47*, 221–234. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.08.021>
- Cros, E., Jordheim, L., Dumontet, C., & Galmarini, C. M. (2004). Problems Related to Resistance to Cytarabine in Acute Myeloid Leukemia. *Leukemia and Lymphoma*, *45*(6), 1123–1132. <https://doi.org/10.1080/1042819032000159861>
- Crowther, D., Powles, R. L., Bateman, C. J. T., Beard, M. E. J., Gauci, C. L., Wrigley, P. F. M., Malpas, J. S., Fairley, G. H., & Scott, R. B. (1973). Management of Adult Acute Myelogenous Leukaemia. *British Medical Journal*, *1*(5846), 131–137. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.5846.131>
- Cuesta-Casanovas, L. (2022). *El Receptor de Prolactina como nueva diana terapéutica en la Leucemia Mieloide Aguda*. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Cuesta-Casanovas, L., Delgado-Martínez, J., Cornet-Masana, J. M., Carbó, J. M., Clément-Demange, L., & Risueño, R. M. (2022). Lysosome-mediated chemoresistance in acute myeloid leukemia. *Cancer Drug Resistance*, *5*(1), 233–244. <https://doi.org/10.20517/cdr.2021.122>
- D’Arcy, M. S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International*, *43*(6), 582–592. <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>

- Davidson, S. M., & Vander Heiden, M. G. (2017). Critical Functions of the Lysosome in Cancer Biology. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 57(1), 481–507. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010715-103101>
- de Araujo, M. E. G., Liebscher, G., Hess, M. W., & Huber, L. A. (2020). Lysosomal size matters. *Traffic*, 21(1), 60–75. <https://doi.org/10.1111/tra.12714>
- de Beauchamp, L., Himonas, E., & Helgason, G. V. (2022). Mitochondrial metabolism as a potential therapeutic target in myeloid leukaemia. *Leukemia*, 36(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41375-021-01416-w>
- de Duve, C. (1949). [Experimental diabetes]. *Le Scalpel*, 102(31), 723–729. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18138791>
- de Duve, C. (2005). The lysosome turns fifty. *Nature Cell Biology*, 7(9), 847–849. <https://doi.org/10.1038/ncb0905-847>
- De Duve, C., De Barse, T., Poole, B., Trouet, A., Tulkens, P., & Van Hoof, F. (1974). Lysosomotropic agents. *Biochemical Pharmacology*, 23(18), 2495–2531. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(74\)90174-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(74)90174-9)
- De Kouchkovsky, I., & Abdul-Hay, M. (2016). ‘Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update.’ *Blood Cancer Journal*, 6(7), e441. <https://doi.org/10.1038/bcj.2016.50>
- de Ronde, J. J., Lips, E. H., Mulder, L., Vincent, A. D., Wesseling, J., Nieuwland, M., Kerkhoven, R., Vrancken Peeters, M.-J. T., Sonke, G. S., Rodenhuis, S., & Wessels, L. F. (2013). SERPINA6, BEX1, AGTR1, SLC26A3, and LAPTM4B are markers of resistance to neoadjuvant chemotherapy in HER2-negative breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 137(1), 213–223. <https://doi.org/10.1007/s10549-012-2340-x>
- de Thé, H., Pandolfi, P. P., & Chen, Z. (2017). Acute Promyelocytic Leukemia: A Paradigm for Oncoprotein-Targeted Cure. *Cancer Cell*, 32(5), 552–560. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.10.002>
- Dean, P. N., & Jett, J. H. (1974). Mathematical analysis of DNA distributions derived from flow microfluorometry. *Journal of Cell Biology*, 60(2), 523–527. <https://doi.org/10.1083/jcb.60.2.523>
- Degos, L. (1992). All-trans retinoic acid (ATRA) therapeutical effect in acute promyelocytic leukemia. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 46(5–7), 201–209. [https://doi.org/10.1016/0753-3322\(92\)90083-J](https://doi.org/10.1016/0753-3322(92)90083-J)
- Deleyto-Seldas, N., & Efeyan, A. (2021). The mTOR–Autophagy Axis and the Control of Metabolism. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 655731. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.655731>

- Denton, D., & Kumar, S. (2019). Autophagy-dependent cell death. *Cell Death and Differentiation*, 26(4), 605–616. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0252-y>
- DeSantes, K. B., & Sondel, P. M. (2009). Immunotherapy of Cancer. In *Oncology of Infancy and Childhood* (pp. 209–240). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-3431-5.00007-8>
- Dhillon, S. (2019). Gilteritinib: First Global Approval. *Drugs*, 79(3), 331–339. <https://doi.org/10.1007/s40265-019-1062-3>
- Di Francia, R., Crisci, S., De Monaco, A., Cafiero, C., Re, A., Iaccarino, G., De Filippi, R., Frigeri, F., Corazzelli, G., Micera, A., & Pinto, A. (2021). Response and Toxicity to Cytarabine Therapy in Leukemia and Lymphoma: From Dose Puzzle to Pharmacogenomic Biomarkers. *Cancers*, 13(5), 966. <https://doi.org/10.3390/cancers13050966>
- Di Micco, R., Krizhanovsky, V., Baker, D., & d'Adda di Fagagna, F. (2021). Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 22(2), 75–95. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00314-w>
- Dibble, C. C., & Cantley, L. C. (2015). Regulation of mTORC1 by PI3K signaling. *Trends in Cell Biology*, 25(9), 545–555. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.06.002>
- Dice, J. F. (2006). Biogenesis, Structure and Function of Lysosomes. In R. A. Meyers (Ed.), *Reviews in Cell Biology and Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.1002/3527600906.mcb.200300122>
- Dice, J. F. (2007). Chaperone-Mediated Autophagy. *Autophagy*, 3(4), 295–299. <https://doi.org/10.4161/auto.4144>
- Dichlberger, A., Zhou, K., Bäck, N., Nyholm, T., Backman, A., Mattjus, P., Ikonen, E., & Blom, T. (2021). LAPT4B controls the sphingolipid and ether lipid signature of small extracellular vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1866(2), 158855. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2020.158855>
- Dick, J. E. (2008). Stem cell concepts renew cancer research. *Blood*, 112(13), 4793–4807. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-08-077941>
- Dielschneider, R., Eisenstat, H., Johnston, J. B., & Gibson, S. B. (2014). Lysosome Membrane Permeabilization Causes Cell Death in Primary Chronic Lymphocytic Leukemia Cells. *Blood*, 124(21), 930. <https://doi.org/10.1182/blood.V124.21.930.930>
- DiNardo, C. D., & Cortes, J. E. (2016). Mutations in AML: prognostic and therapeutic implications. *Hematology*, 2016(1), 348–355. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2016.1.348>

- DiNardo, C. D., Garcia-Manero, G., Pierce, S., Nazha, A., Bueso-Ramos, C., Jabbour, E., Ravandi, F., Cortes, J., & Kantarjian, H. (2016). Interactions and relevance of blast percentage and treatment strategy among younger and older patients with acute myeloid leukemia (AML) and myelodysplastic syndrome (MDS). *American Journal of Hematology*, *91*(2), 227–232. <https://doi.org/10.1002/ajh.24252>
- Ding, L., Ley, T. J., Larson, D. E., Miller, C. A., Koboldt, D. C., Welch, J. S., Ritchey, J. K., Young, M. A., Lamprecht, T., McLellan, M. D., McMichael, J. F., Wallis, J. W., Lu, C., Shen, D., Harris, C. C., Dooling, D. J., Fulton, R. S., Fulton, L. L., Chen, K., ... DiPersio, J. F. (2012). Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature*, *481*(7382), 506–510. <https://doi.org/10.1038/nature10738>
- Djehiche, B., Segalen, J., & Chambon, Y. (1996). Inhibition of autophagy of fetal rabbit gonoducts by puromycin, tunicamycin and chloroquin in organ culture. *Tissue and Cell*, *28*(1), 115–121. [https://doi.org/10.1016/S0040-8166\(96\)80050-4](https://doi.org/10.1016/S0040-8166(96)80050-4)
- Döhner, H., Estey, E. H., Amadori, S., Appelbaum, F. R., Büchner, T., Burnett, A. K., Dombret, H., Fenaux, P., Grimwade, D., Larson, R. A., Lo-Coco, F., Naoe, T., Niederwieser, D., Ossenkoppele, G. J., Sanz, M. A., Sierra, J., Tallman, M. S., Löwenberg, B., & Bloomfield, C. D. (2010). Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*, *115*(3), 453–474. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-07-235358>
- Döhner, H., Estey, E. H., Grimwade, D., Amadori, S., Appelbaum, F. R., Büchner, T., Dombret, H., Ebert, B. L., Fenaux, P., Larson, R. A., Levine, R. L., Lo-Coco, F., Naoe, T., Niederwieser, D., Ossenkoppele, G. J., Sanz, M., Sierra, J., Tallman, M. S., Tien, H. F., ... Bloomfield, C. D. (2017). Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*, *129*(4), 424–447. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2016-08-733196>
- Döhner, H., Weisdorf, D. J., & Bloomfield, C. D. (2015). Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*, *373*(12), 1136–1152. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1406184>
- Dong, X., Tamura, K., Kobayashi, D., Ando, N., Sumita, K., & Maehara, T. (2017). LAPTM4B-35 is a novel prognostic factor for glioblastoma. *Journal of Neuro-Oncology*, *132*(2), 295–303. <https://doi.org/10.1007/s11060-017-2369-0>
- Druker, B. J., Talpaz, M., Resta, D. J., Peng, B., Buchdunger, E., Ford, J. M., Lydon, N. B., Kantarjian, H., Capdeville, R., Ohno-Jones, S., & Sawyers, C. L. (2001). Efficacy and Safety of a Specific Inhibitor of the BCR-ABL Tyrosine Kinase in Chronic Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*, *344*(14), 1031–1037. <https://doi.org/10.1056/NEJM200104053441401>

- DuBridges, R. B., Tang, P., Hsia, H. C., Leong, P. M., Miller, J. H., & Calos, M. P. (1987). Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Molecular and Cellular Biology*, 7(1), 379–387. <https://doi.org/10.1128/mcb.7.1.379-387.1987>
- Duff, A., Kavege, L., Baquier, J., & Hu, T. (2021). A PI3K inhibitor-induced growth inhibition of cancer cells is linked to MEK-ERK pathway. *Anti-Cancer Drugs*, 32(5), 517–525. <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000001024>
- Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R. J., Nguyen, M., Trono, D., & Naldini, L. (1998). A Third-Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System. *Journal of Virology*, 72(11), 8463–8471. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.11.8463-8471.1998>
- Dunn, E., Chitcholtan, K., Sykes, P., & Garrill, A. (2022). The Anti-Proliferative Effect of PI3K/mTOR and ERK Inhibition in Monolayer and Three-Dimensional Ovarian Cancer Cell Models. *Cancers*, 14(2), 395. <https://doi.org/10.3390/cancers14020395>
- Dupéré-Richer, D., Kinal, M., Ménasché, V., Nielsen, T. H., del Rincon, S., Pettersson, F., & Miller, W. H. (2013). Vorinostat-induced autophagy switches from a death-promoting to a cytoprotective signal to drive acquired resistance. *Cell Death and Disease*, 4(2), e486. <https://doi.org/10.1038/cddis.2012.210>
- Ebi, H., Costa, C., Faber, A. C., Nishtala, M., Kotani, H., Juric, D., Della Pelle, P., Song, Y., Yano, S., Mino-Kenudson, M., Benes, C. H., & Engelman, J. A. (2013). PI3K regulates MEK/ERK signaling in breast cancer via the Rac-GEF, P-Rex1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(52), 21124–21129. <https://doi.org/10.1073/pnas.1314124110>
- Ellison, R. R., Holland, J. F., Weil, M., Jacquillat, C., Boiron, M., Bernard, J., Sawitsky, A., Rosner, F., Gussoff, B., Silver, R. T., Karanas, A., Cuttner, J., Spurr, C. L., Hayes, D. M., Blom, J., Leone, L. A., Haurani, F., Kyle, R., Hutchinson, J. L., ... Moon, J. H. (1968). Arabinosyl Cytosine: A Useful Agent in the Treatment of Acute Leukemia in Adults. *Blood*, 32(4), 507–523. <https://doi.org/10.1182/blood.V32.4.507.507>
- El-Shaqanqery, H. E., Mohamed, R. H., & Sayed, A. A. (2021). Mitochondrial Effects on Seeds of Cancer Survival in Leukemia. *Frontiers in Oncology*, 11, 745924. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.745924>
- Eskelinen, E.-L. (2006). Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(5–6), 495–502. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2006.08.005>
- Essner, E., & Novikoff, A. B. (1961). Localization of acid phosphatase activity in hepatic lysosomes by means of electron microscopy. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 9(4), 773–784. <https://doi.org/10.1083/jcb.9.4.773>

- Estey, E. H. (2020). Acute myeloid leukemia: 2021 update on risk-stratification and management. *American Journal of Hematology*, *95*(11), 1368–1398. <https://doi.org/10.1002/ajh.25975>
- Estey, E. H., & Döhner, H. (2006). Acute myeloid leukaemia. *The Lancet*, *368*(9550), 1894–1907. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69780-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69780-8)
- Fajardo-Orduña, G. R., Ledesma-Martínez, E., Aguiñiga-Sánchez, I., Mora-García, M. de L., Weiss-Steider, B., & Santiago-Osorio, E. (2021). Inhibitors of Chemoresistance Pathways in Combination with Ara-C to Overcome Multidrug Resistance in AML. A Mini Review. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(9), 4955. <https://doi.org/10.3390/ijms22094955>
- Fanciullino, R., Farnault, L., Donnette, M., Imbs, D.-C., Roche, C., Venton, G., Berda-Haddad, Y., Ivanov, V., Ciccolini, J., Ouafik, L., Lacarelle, B., & Costello, R. (2018). CDA as a predictive marker for life-threatening toxicities in patients with AML treated with cytarabine. *Blood Advances*, *2*(5), 462–469. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2017014126>
- Farge, T., Saland, E., de Toni, F., Aroua, N., Hosseini, M., Perry, R., Bosc, C., Sugita, M., Stuani, L., Fraisse, M., Scotland, S., Larrue, C., Boutzen, H., Féliu, V., Nicolau-Travers, M.-L., Cassant-Sourdy, S., Broin, N., David, M., Serhan, N., ... Sarry, J.-E. (2017). Chemotherapy-Resistant Human Acute Myeloid Leukemia Cells Are Not Enriched for Leukemic Stem Cells but Require Oxidative Metabolism. *Cancer Discovery*, *7*(7), 716–735. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-0441>
- Fedele, A. O., & Proud, C. G. (2020). Chloroquine and bafilomycin A mimic lysosomal storage disorders and impair mTORC1 signalling. *Bioscience Reports*, *40*(4), BSR20200905. <https://doi.org/10.1042/BSR20200905>
- Fehrenbacher, N., Bastholm, L., Kirkegaard-Sørensen, T., Rafn, B., Bøttzauw, T., Nielsen, C., Weber, E., Shirasawa, S., Kallunki, T., & Jäättelä, M. (2008). Sensitization to the Lysosomal Cell Death Pathway by Oncogene-Induced Down-regulation of Lysosome-Associated Membrane Proteins 1 and 2. *Cancer Research*, *68*(16), 6623–6633. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0463>
- Fenton, C., & Perry, C. M. (2005). Gemtuzumab Ozogamicin. *Drugs*, *65*(16), 2405–2427. <https://doi.org/10.2165/00003495-200565160-00014>
- Fernandez, C., Santos-Silva, M. C., López, A., Matarraz, S., Jara-Acevedo, M., Ciudad, J., Gutierrez, M. L., Sánchez, M. L., Salvador-Osuna, C., Berruezo, M. J., Díaz-Arias, J. Á., Palomo-Hernández, A. M., Colado, E., González, N., Gallardo, D., Asensio, A., García-Sánchez, R., Saldaña, R., Cerveró, C., ... Orfao, A. (2013). Newly diagnosed adult AML and MPAL patients frequently show clonal residual hematopoiesis. *Leukemia*, *27*(11), 2149–2156. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.109>

- Florkin, M. (1974). [Homage to Albert Claude and Christian de Duve, Nobel Prize laureates in medicine and physiology, 1974]. *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie*, 82(5), 807–815. <https://doi.org/10.3109/13813457409072328>
- Frances, A., & Cordelier, P. (2020). The Emerging Role of Cytidine Deaminase in Human Diseases: A New Opportunity for Therapy? *Molecular Therapy*, 28(2), 357–366. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.11.026>
- Gallagher, R., Collins, S., Trujillo, J., McCredie, K., Ahearn, M., Tsai, S., Metzgar, R., Aulakh, G., Ting, R., Ruscetti, F., & Gallo, R. (1979). Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 54(3), 713–733. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/288488>
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E. S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D. W., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Antonov, A. V., Arama, E., Baehrecke, E. H., Barlev, N. A., Bazan, N. G., Bernassola, F., Bertrand, M. J. M., Bianchi, K., ... Kroemer, G. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death and Differentiation*, 25(3), 486–541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>
- Ganzel, C., Sun, Z., Cripe, L. D., Fernandez, H. F., Douer, D., Rowe, J. M., Paietta, E. M., Ketterling, R., O'Connell, M. J., Wiernik, P. H., Bennett, J. M., Litzow, M. R., Luger, S. M., Lazarus, H. M., & Tallman, M. S. (2018). Very poor long-term survival in past and more recent studies for relapsed AML patients: The ECOG-ACRIN experience. *American Journal of Hematology*, 93(8), 1074–1081. <https://doi.org/10.1002/ajh.25162>
- Gao, Y., Zens, P., Su, M., Gemperli, C. A., Yang, H., Deng, H., Yang, Z., Xu, D., Hall, S. R. R., Berezowska, S., Dorn, P., Peng, R.-W., Schmid, R. A., Wang, W., & Marti, T. M. (2021). Chemotherapy-induced CDA expression renders resistant non-small cell lung cancer cells sensitive to 5'-deoxy-5-fluorocytidine (5'-DFCR). *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 40(1), 138. <https://doi.org/10.1186/s13046-021-01938-2>
- Geest, C. R., & Coffey, P. J. (2009). MAPK signaling pathways in the regulation of hematopoiesis. *Journal of Leukocyte Biology*, 86(2), 237–250. <https://doi.org/10.1189/jlb.0209097>
- Ghandi, M., Huang, F. W., Jané-Valbuena, J., Kryukov, G. V., Lo, C. C., McDonald, E. R., Barretina, J., Gelfand, E. T., Bielski, C. M., Li, H., Hu, K., Andreev-Drakhlin, A. Y., Kim, J., Hess, J. M., Haas, B. J., Aguet, F., Weir, B. A., Rothberg, M. V., Paolella, B. R., ... Sellers, W. R. (2019). Next-generation characterization of the Cancer Cell Line Encyclopedia. *Nature*, 569(7757), 503–508. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1186-3>

- Greaves, M., & Maley, C. C. (2012). Clonal evolution in cancer. *Nature*, *481*(7381), 306–313. <https://doi.org/10.1038/nature10762>
- Grønningsæter, I. S., Reikvam, H., Aasebø, E., Bartaula-Brevik, S., Hernandez-Valladares, M., Selheim, F., Berven, F. S., Tvedt, T. H., Bruserud, Ø., & Hatfield, K. J. (2021). Effects of the autophagy-inhibiting agent chloroquine on acute myeloid leukemia cells; characterization of patient heterogeneity. *Journal of Personalized Medicine*, *11*(8), 779. <https://doi.org/10.3390/jpm11080779>
- Gu, S., Tan, J., Li, Q., Liu, S., Ma, J., Zheng, Y., Liu, J., Bi, W., Sha, P., Li, X., Wei, M., Cao, N., & Yang, H.-T. (2020). Downregulation of LAPTM4B Contributes to the Impairment of the Autophagic Flux via Unopposed Activation of mTORC1 Signaling During Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Circulation Research*, *127*(7), e148–e165. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.316388>
- Guerra, V. A., DiNardo, C., & Konopleva, M. (2019). Venetoclax-based therapies for acute myeloid leukemia. *Best Practice and Research Clinical Haematology*, *32*(2), 145–153. <https://doi.org/10.1016/j.beha.2019.05.008>
- Guo, M., Joiakim, A., & Reiners, J. J. (2000). Suppression of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-mediated aryl hydrocarbon receptor transformation and CYP1A1 induction by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *Biochemical Pharmacology*, *60*(5), 635–642. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(00\)00379-8](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(00)00379-8)
- Hackl, H., Steinleitner, K., Lind, K., Hofer, S., Tomic, N., Pavlovic, S., Suvajdzic, N., Sill, H., & Wieser, R. (2015). A gene expression profile associated with relapse of cytogenetically normal acute myeloid leukemia is enriched for leukemia stem cell genes. *Leukemia and Lymphoma*, *56*(4), 1126–1128. <https://doi.org/10.3109/10428194.2014.944523>
- Haferlach, T., Kern, W., Schoch, C., Schnittger, S., Sauerland, M. C., Heinecke, A., Büchner, T., & Hiddemann, W. (2004). A new prognostic score for patients with acute myeloid leukemia based on cytogenetics and early blast clearance in trials of the German AML Cooperative Group. *Haematologica*, *89*(4), 408–418.
- Haferlach, T., Kohlmann, A., Wicczorek, L., Basso, G., te Kronnie, G., Béné, M. C., de Vos, J., Hernández, J. M., Hofmann, W. K., Mills, K. I., Gilkes, A., Chiaretti, S., Shurtleff, S. A., Kipps, T. J., Rassenti, L. Z., Yeoh, A. E., Papenhausen, P. R., Liu, W. M., Williams, P. M., & Foà, R. (2010). Clinical utility of microarray-based gene expression profiling in the diagnosis and subclassification of leukemia: report from the International Microarray Innovations in Leukemia Study Group. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *28*(15), 2529–2537. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.23.4732>

- Halaby, R. (2019). Influence of lysosomal sequestration on multidrug resistance in cancer cells. *Cancer Drug Resistance*, 2(1), 31–42. <https://doi.org/10.20517/cdr.2018.23>
- Hämälistö, S., & Jäättelä, M. (2016). Lysosomes in cancer—living on the edge (of the cell). *Current Opinion in Cell Biology*, 39, 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2016.02.009>
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hashemi, M., Rezaei, M., Narouie, B., Simforoosh, N., Basiri, A., Ziaee, S. A. M., Bahari, G., & Taheri, M. (2016). Association between *LAPTM4B* gene polymorphism and prostate cancer susceptibility in an Iranian population. *Molecular and Cellular Oncology*, 3(6), e1169342. <https://doi.org/10.1080/23723556.2016.1169342>
- Hasserjian, R. P., Campigotto, F., Klepeis, V., Fu, B., Wang, S. A., Bueso-Ramos, C., Cascio, M. J., Rogers, H. J., Hsi, E. D., Soderquist, C., Bagg, A., Yan, J., Ochs, R., Orazi, A., Moore, F., Mahmoud, A., George, T. I., Foucar, K., Odem, J., ... Arber, D. A. (2014). *De novo* acute myeloid leukemia with 20–29% blasts is less aggressive than acute myeloid leukemia with $\geq 30\%$ blasts in older adults: a Bone Marrow Pathology Group study. *American Journal of Hematology*, 89(11), E193–E199. <https://doi.org/10.1002/ajh.23808>
- Hawley, R. G., Ramezani, A., & Hawley, T. S. (2006). Hematopoietic Stem Cells. In *Methods Enzymol.* 2 (Vol. 419, pp. 149–179). [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(06\)19007-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(06)19007-2)
- He, J., Shao, G., & Zhou, R. (2003). [Effects of the novel gene, LAPTM4B, highly expression in hepatocellular carcinoma on cell proliferation and tumorigenesis of NIH3T3 cells]. *Beijing Da Xue Xue Bao. Yi Xue Ban = Journal of Peking University. Health Sciences*, 35(4), 348–352. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12947546>
- Heo, H., Kim, J.-H., Lim, H. J., Kim, J.-H., Kim, M., Koh, J., Im, J.-Y., Kim, B.-K., Won, M., Park, J.-H., Shin, Y.-J., Yun, M. R., Cho, B. C., Kim, Y. S., Kim, S.-Y., & Kim, M. (2022). DNA methylome and single-cell transcriptome analyses reveal CDA as a potential druggable target for ALK inhibitor-resistant lung cancer therapy. *Experimental and Molecular Medicine*, 54(8), 1236–1249. <https://doi.org/10.1038/s12276-022-00836-7>

- Heuser, J. (1989). Changes in lysosome shape and distribution correlated with changes in cytoplasmic pH. *Journal of Cell Biology*, *108*(3), 855–864. <https://doi.org/10.1083/JCB.108.3.855>
- Hogan, L. E., Meyer, J. A., Yang, J., Wang, J., Wong, N., Yang, W., Condos, G., Hunger, S. P., Raetz, E., Saffery, R., Relling, M. V., Bhojwani, D., Morrison, D. J., & Carroll, W. L. (2011). Integrated genomic analysis of relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia reveals therapeutic strategies. *Blood*, *118*(19), 5218–5226. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-04-345595>
- Holleran, J. L., Beumer, J. H., McCormick, D. L., Johnson, W. D., Newman, E. M., Doroshow, J. H., Kummur, S., Covey, J. M., Davis, M., & Eiseman, J. L. (2015). Oral and intravenous pharmacokinetics of 5-fluoro-2'-deoxycytidine and THU in cynomolgus monkeys and humans. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, *76*(4), 803–811. <https://doi.org/10.1007/s00280-015-2857-x>
- Hraběta, J., Belhajová, M., Šubrťová, H., Merlos Rodrigo, M. A., Heger, Z., & Eckschlager, T. (2020). Drug Sequestration in Lysosomes as One of the Mechanisms of Chemoresistance of Cancer Cells and the Possibilities of Its Inhibition. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(12), 4392. <https://doi.org/10.3390/ijms21124392>
- Hu, G., Chong, R. A., Yang, Q., Wei, Y., Blanco, M. A., Li, F., Reiss, M., Au, J. L.-S., Haffty, B. G., & Kang, Y. (2009). MTDH Activation by 8q22 Genomic Gain Promotes Chemoresistance and Metastasis of Poor-Prognosis Breast Cancer. *Cancer Cell*, *15*(1), 9–20. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.11.013>
- Hu, X.-M., Li, Z.-X., Lin, R.-H., Shan, J.-Q., Yu, Q.-W., Wang, R.-X., Liao, L.-S., Yan, W.-T., Wang, Z., Shang, L., Huang, Y., Zhang, Q., & Xiong, K. (2021). Guidelines for Regulated Cell Death Assays: A Systematic Summary, A Categorical Comparison, A Prospective. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*, 634690. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.634690>
- Huang, L., Zhou, K., Yang, Y., Shang, Z., Wang, J., Wang, D., Wang, N., Xu, D., & Zhou, J. (2012). FLT3-ITD-associated gene-expression signatures in NPM1-mutated cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *International Journal of Hematology*, *96*(2), 234–240. <https://doi.org/10.1007/s12185-012-1115-9>
- Huang, W., Sun, G., Wang, Q., & Long, Z. (2022). The research progress of targeted therapy in acute myeloid leukemia based on bibliometric analysis. *Frontiers in Oncology*, *12*, 957370. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.957370>
- Huang, Y., Peng, M., Qin, H., Li, Y., Pei, L., Liu, X., & Zhao, X. (2023). LAPTM4B promotes AML progression through regulating RPS9/STAT3 axis. *Cellular Signalling*, *106*, 110623. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2023.110623>
- Hughes, P. J., Marcinkowska, E., Gocek, E., Studzinski, G. P., & Brown, G. (2010). Vitamin D3-driven signals for myeloid cell differentiation—Implications for

- differentiation therapy. *Leukemia Research*, 34(5), 553–565.
<https://doi.org/10.1016/j.leukres.2009.09.010>
- Huygens, C., Liénart, S., Dedobbeleer, O., Stockis, J., Gauthy, E., Coulie, P. G., & Lucas, S. (2015). Lysosomal-associated Transmembrane Protein 4B (LAPTM4B) Decreases Transforming Growth Factor β 1 (TGF- β 1) Production in Human Regulatory T Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 290(33), 20105–20116. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.655340>
- Hwang, H. J., Ha, H., Lee, B. S., Kim, B. H., Song, H. K., & Kim, Y. K. (2022). LC3B is an RNA-binding protein to trigger rapid mRNA degradation during autophagy. *Nature Communications*, 13(1), 1436.
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-29139-1>
- Hwang, J. R., Kim, W. Y., Cho, Y.-J., Ryu, J.-Y., Choi, J.-J., Jeong, S. Y., Kim, M.-S., Kim, J. H., Paik, E. S., Lee, Y.-Y., Han, H.-D., & Lee, J.-W. (2020). Chloroquine reverses chemoresistance via upregulation of p21WAF1/CIP1 and autophagy inhibition in ovarian cancer. *Cell Death and Disease*, 11(12), 1034.
<https://doi.org/10.1038/s41419-020-03242-x>
- Hwang, S. M. (2020). Classification of acute myeloid leukemia. *Blood Research*, 55(S1), S1–S4. <https://doi.org/10.5045/br.2020.S001>
- Inpanathan, S., & Botelho, R. J. (2019). The Lysosome Signaling Platform: Adapting With the Times. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7, 113.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00113>
- Iulianna, T., Kuldeep, N., & Eric, F. (2022). The Achilles' heel of cancer: targeting tumors via lysosome-induced immunogenic cell death. *Cell Death and Disease*, 13(5), 509. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-04912-8>
- Ivanov, A., Pawlikowski, J., Manoharan, I., van Tuyn, J., Nelson, D. M., Rai, T. S., Shah, P. P., Hewitt, G., Korolchuk, V. I., Passos, J. F., Wu, H., Berger, S. L., & Adams, P. D. (2013). Lysosome-mediated processing of chromatin in senescence. *Journal of Cell Biology*, 202(1), 129–143.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201212110>
- Ivanova, N. B., Dimos, J. T., Schaniel, C., Hackney, J. A., Moore, K. A., & Lemischka, I. R. (2002). A Stem Cell Molecular Signature. *Science*, 298(5593), 601–604. <https://doi.org/10.1126/science.1073823>
- Jaatinen, T., Hemmoranta, H., Hautaniemi, S., Niemi, J., Nicorici, D., Laine, J., Yli-Harja, O., & Partanen, J. (2006). Global Gene Expression Profile of Human Cord Blood-Derived CD133+ Cells. *Stem Cells*, 24(3), 631–641.
<https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0185>
- Jain, V., Bose, S., Arya, A. K., & Arif, T. (2022). Lysosomes in Stem Cell Quiescence: A Potential Therapeutic Target in Acute Myeloid Leukemia. *Cancers*, 14(7), 1618. <https://doi.org/10.3390/cancers14071618>

- Janssen, M., Schmidt, C., Bruch, P.-M., Blank, M. F., Rohde, C., Waclawiczek, A., Heid, D., Renders, S., Göllner, S., Vierbaum, L., Besenbeck, B., Herbst, S. A., Knoll, M., Kolb, C., Przybylla, A., Weidenauer, K., Ludwig, A. K., Fabre, M., Gu, M., ... Dietrich, S. (2022). Venetoclax synergizes with gilteritinib in FLT3 wild-type high-risk acute myeloid leukemia by suppressing MCL-1. *Blood*, *140*(24), 2594–2610. <https://doi.org/10.1182/blood.2021014241>
- Ji, X., Ma, H., & Du, Y. (2022). Role and mechanism of action of LAPTM4B in EGFR-mediated autophagy (Review). *Oncology Letters*, *23*(4), 109. <https://doi.org/10.3892/ol.2022.13229>
- Jordan, C. (2002). Unique molecular and cellular features of acute myelogenous leukemia stem cells. *Leukemia*, *16*(4), 559–562. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402446>
- Karami Fath, M., Babakhaniyan, K., Zokaei, M., Yaghoobian, A., Akbari, S., Khorsandi, M., Soofi, A., Nabi-Afjadi, M., Zalpoor, H., Jalalifar, F., Azargoonjahromi, A., Payandeh, Z., & Alagheband Bahrami, A. (2022). Anti-cancer peptide-based therapeutic strategies in solid tumors. *Cellular and Molecular Biology Letters*, *27*(1), 33. <https://doi.org/10.1186/s11658-022-00332-w>
- Kasper, G., Vogel, A., Klamann, I., Gröne, J., Petersen, I., Weber, B., Castaños-Vélez, E., Staub, E., & Mennerich, D. (2005). The human LAPTM4b transcript is upregulated in various types of solid tumours and seems to play a dual functional role during tumour progression. *Cancer Letters*, *224*(1), 93–103. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.10.004>
- Kavčič, N., Pegan, K., & Turk, B. (2017). Lysosomes in programmed cell death pathways: from initiators to amplifiers. *Biological Chemistry*, *398*(3), 289–301. <https://doi.org/10.1515/hsz-2016-0252>
- Kayser, S., & Levis, M. J. (2022). Updates on targeted therapies for acute myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology*, *196*(2), 316–328. <https://doi.org/10.1111/bjh.17746>
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics. *British Journal of Cancer*, *26*(4), 239–257. <https://doi.org/10.1038/bjc.1972.33>
- Khoury, J. D., Solary, E., Abla, O., Akkari, Y., Alaggio, R., Apperley, J. F., Bejar, R., Berti, E., Busque, L., Chan, J. K. C., Chen, W., Chen, X., Chng, W.-J., Choi, J. K., Colmenero, I., Coupland, S. E., Cross, N. C. P., de Jong, D., Elghetany, M. T., ... Hochhaus, A. (2022). The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia*, *36*(7), 1703–1719. <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01613-1>

- Kirkegaard, T., & Jäättelä, M. (2009). Lysosomal involvement in cell death and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1793(4), 746–754. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2008.09.008>
- Kiyoi, H., Kawashima, N., & Ishikawa, Y. (2020). *FLT3* mutations in acute myeloid leukemia: Therapeutic paradigm beyond inhibitor development. *Cancer Science*, 111(2), 312–322. <https://doi.org/10.1111/cas.14274>
- Koeffler, H. P., & Golde, D. W. (1978). Acute Myelogenous Leukemia: A Human Cell Line Responsive to Colony-Stimulating Activity. *Science*, 200(4346), 1153–1154. <https://doi.org/10.1126/science.306682>
- Kohlmann, A., Kipps, T. J., Rassenti, L. Z., Downing, J. R., Shurtleff, S. A., Mills, K. I., Gilkes, A. F., Hofmann, W.-K., Basso, G., Dell’Orto, M. C., Foà, R., Chiaretti, S., De Vos, J., Rauhut, S., Papenhausen, P. R., Hernández, J. M., Lumberras, E., Yeoh, A. E., Koay, E. S., ... Haferlach, T. (2008). An international standardization programme towards the application of gene expression profiling in routine leukaemia diagnostics: the Microarray Innovations in LEukemia study prephase. *British Journal of Haematology*, 142(5), 802–807. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.07261.x>
- Kolch, W. (2000). Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochemical Journal*, 351(2), 289–305. <https://doi.org/10.1042/bj3510289>
- Kong, F., Gao, F., Chen, J., Sun, Y., Zhang, Y., Liu, H., Li, X., Yang, P., Zheng, R., Liu, G., & Jia, Y. (2016). Overexpressed LAPT4B-35 is a risk factor for cancer recurrence and poor prognosis in non-small-cell lung cancer. *Oncotarget*, 7(35), 56193–56199. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10907>
- Korolchuk, V. I., Saiki, S., Lichtenberg, M., Siddiqi, F. H., Roberts, E. A., Imarisio, S., Jahreiss, L., Sarkar, S., Futter, M., Menzies, F. M., O’Kane, C. J., Deretic, V., & Rubinsztein, D. C. (2011). Lysosomal positioning coordinates cellular nutrient responses. *Nature Cell Biology*, 13(4), 453–460. <https://doi.org/10.1038/NCB2204>
- Koukourakis, M. I., Kalamida, D., Giatromanolaki, A., Zois, C. E., Sivridis, E., Pouliliou, S., Mitrakas, A., Gatter, K. C., & Harris, A. L. (2015). Autophagosome Proteins LC3A, LC3B and LC3C Have Distinct Subcellular Distribution Kinetics and Expression in Cancer Cell Lines. *PLoS ONE*, 10(9), e0137675. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137675>
- Kreis, W., Budman, D. R., Chan, K., Allen, S. L., Schulman, P., Lichtman, S., Weiselberg, L., Schuster, M., Freeman, J., & Akerman, S. (1991). Therapy of refractory/relapsed acute leukemia with cytosine arabinoside plus tetrahydrouridine (an inhibitor of cytidine deaminase)--a pilot study. *Leukemia*, 5(11), 991–998.

- Kreis, W., Hession, C., Soricelli, A., & Scully, K. (1977). Combinations of tetrahydrouridine and cytosine arabinoside in mouse tumors. *Cancer Treatment Reports*, 61(7), 1355–1364. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/589601>
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Green, D. R., Hengartner, M., Knight, R. A., Kumar, S., Lipton, S. A., Malorni, W., Nuñez, G., Peter, M. E., Tschopp, J., Yuan, J., ... Melino, G. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death and Differentiation*, 16(1), 3–11. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.150>
- Kulsoom, B., Shamsi, T. S., & Afsar, N. A. (2018). Gene expression of hENT1, dCK, CDA, dCMPD and topoisomerase II α as an indicator of chemotherapy response in AML treated with cytarabine and daunorubicin. *Cancer Management and Research*, 10, 5573–5589. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S181299>
- Kun-Rodrigues, C., Orme, T., Carmona, S., Hernandez, D. G., Ross, O. A., Eicher, J. D., Shepherd, C., Parkkinen, L., Darwent, L., Heckman, M. G., Scholz, S. W., Troncoso, J. C., Pletnikova, O., Dawson, T., Rosenthal, L., Ansorge, O., Clarimon, J., Lleo, A., Morenas-Rodriguez, E., ... Bras, J. (2019). A comprehensive screening of copy number variability in dementia with Lewy bodies. *Neurobiology of Aging*, 75, 223.e1–223.e10. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2018.10.019>
- Kuznetsov, G., Brostrom, M. A., & Brostrom, C. O. (1992). Demonstration of a calcium requirement for secretory protein processing and export. Differential effects of calcium and dithiothreitol. *Journal of Biological Chemistry*, 267(6), 3932–3939. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)50615-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)50615-9)
- Lagunas-Rangel, F. A., Chávez-Valencia, V., Gómez-Guijosa, M. Á., & Cortes-Penagos, C. (2017). Acute Myeloid Leukemia-Genetic Alterations and Their Clinical Prognosis. *International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research*, 11(4), 328–339. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29340131>
- Lane, S. W., & Gilliland, D. G. (2010). Leukemia stem cells. *Seminars in Cancer Biology*, 20(2), 71–76. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2009.12.001>
- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M. A., & Dick, J. E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, 367(6464), 645–648. <https://doi.org/10.1038/367645a0>
- Lasica, M., & Anderson, M. A. (2021). Review of Venetoclax in CLL, AML and Multiple Myeloma. *Journal of Personalized Medicine*, 11(6), 463. <https://doi.org/10.3390/jpm11060463>

- Lebovitz, C. B., Robertson, A. G., Goya, R., Jones, S. J., Morin, R. D., Marra, M. A., & Gorski, S. M. (2015). Cross-cancer profiling of molecular alterations within the human autophagy interaction network. *Autophagy*, *11*(9), 1668–1687. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1067362>
- Lee, Y.-K., & Lee, J.-A. (2016). Role of the mammalian ATG8/LC3 family in autophagy: differential and compensatory roles in the spatiotemporal regulation of autophagy. *BMB Reports*, *49*(8), 424–430. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2016.49.8.081>
- Levin, M., Stark, M., Ofran, Y., & Assaraf, Y. G. (2021). Deciphering molecular mechanisms underlying chemoresistance in relapsed AML patients: towards precision medicine overcoming drug resistance. *Cancer Cell International*, *21*(1), 53. <https://doi.org/10.1186/s12935-021-01746-w>
- Ley, T. J., Ding, L., Walter, M. J., McLellan, M. D., Lamprecht, T., Larson, D. E., Kandoth, C., Payton, J. E., Baty, J., Welch, J., Harris, C. C., Lichti, C. F., Townsend, R. R., Fulton, R. S., Dooling, D. J., Koboldt, D. C., Schmidt, H., Zhang, Q., Osborne, J. R., ... Wilson, R. K. (2010). *DNMT3A* Mutations in Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*, *363*(25), 2424–2433. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1005143>
- Ley, T., Miller, C., Ding, L., Raphael, B., Mungall, A., Robertson, A., Hoadley, K., Triche, T., Laird, P., Baty, J., Fulton, L., Fulton, R., Heath, S., Kalicki-Veizer, J., Kandoth, C., Klco, J., Koboldt, D., Kanchi, K., Kulkarni, S., ... Eley, G. (2013). Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult De Novo Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*, *368*(22), 2059–2074. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1301689>
- Li, L., Shan, Y., Yang, H., Zhang, S., Lin, M., Zhu, P., Chen, X.-Y., Yi, J., McNutt, M. A., Shao, G.-Z., & Zhou, R.-L. (2011). Upregulation of LAPT4B-35 Promotes Malignant Transformation and Tumorigenesis in L02 Human Liver Cell Line. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, *294*(7), 1135–1142. <https://doi.org/10.1002/ar.21421>
- Li, L., Wei, X. H., Pan, Y. P., Li, H. C., Yang, H., He, Q. H., Pang, Y., Shan, Y., Xiong, F. X., Shao, G. Z., & Zhou, R. L. (2010). LAPT4B: A novel cancer-associated gene motivates multidrug resistance through efflux and activating PI3K/AKT signaling. *Oncogene*, *29*(43), 5785–5795. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.303>
- Li, M., Zhou, R., Shan, Y., Li, L., Wang, L., & Liu, G. (2016). Targeting a novel cancer-driving protein (LAPT4B-35) by a small molecule (ETS) to inhibit cancer growth and metastasis. *Oncotarget*, *7*(36), 58531–58542. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11325>
- Li, S., Wang, L., Meng, Y., Chang, Y., Xu, J., & Zhang, Q. (2017). Increased levels of LAPT4B, VEGF and survivin are correlated with tumor progression and

- poor prognosis in breast cancer patients. *Oncotarget*, 8(25), 41282–41293. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17176>
- Li, X., Lu, Y., Pan, T., & Fan, Z. (2010). Roles of autophagy in cetuximab-mediated cancer therapy against EGFR. *Autophagy*, 6(8), 1066–1077. <https://doi.org/10.4161/auto.6.8.13366>
- Li, Y., Iglehart, J. D., Richardson, A. L., & Wang, Z. C. (2012). The amplified cancer gene LAPTM4B promotes tumor growth and tolerance to stress through the induction of autophagy. *Autophagy*, 8(2), 273–274. <https://doi.org/10.4161/auto.8.2.18941>
- Li, Y., Zhang, Q., Tian, R., Wang, Q., Zhao, J. J., Iglehart, J. D., Wang, Z. C., & Richardson, A. L. (2011). Lysosomal Transmembrane Protein LAPTM4B Promotes Autophagy and Tolerance to Metabolic Stress in Cancer Cells. *Cancer Research*, 71(24), 7481–7489. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-0940>
- Li, Y., Zou, L., Li, Q., Haibe-Kains, B., Tian, R., Li, Y., Desmedt, C., Sotiriou, C., Szallasi, Z., Iglehart, J. D., Richardson, A. L., & Wang, Z. C. (2010). Amplification of LAPTM4B and YWHAZ contributes to chemotherapy resistance and recurrence of breast cancer. *Nature Medicine*, 16(2), 214–218. <https://doi.org/10.1038/nm.2090>
- Lin, Y.-C., Lin, J.-F., Wen, S.-I., Yang, S.-C., Tsai, T.-F., Chen, H.-E., Chou, K.-Y., & Hwang, T. I.-S. (2016). Inhibition of High Basal Level of Autophagy Induces Apoptosis in Human Bladder Cancer Cells. *Journal of Urology*, 195(4 Part 1), 1126–1135. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2015.10.128>
- Liu, D., Yang, Y., Liu, Q., & Wang, J. (2011). Inhibition of autophagy by 3-MA potentiates cisplatin-induced apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma cells. *Medical Oncology*, 28(1), 105–111. <https://doi.org/10.1007/s12032-009-9397-3>
- Liu, H. (2021). Emerging agents and regimens for AML. *Journal of Hematology and Oncology*, 14(1), 49. <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01062-w>
- Liu, J., Zhou, R., Zhang, N., Rui, J., & Jin, C. (2000). Biological function of a novel gene overexpressed in human hepatocellular carcinoma. *Chinese Medical Journal*, 113, 881–885. <https://mednexus.org/doi/epdf/10.3760/cma.j.issn.0366-6999.2000.10.104>
- Liu, R., Chen, Y., Liu, G., Li, C., Song, Y., Cao, Z., Li, W., Hu, J., Lu, C., & Liu, Y. (2020). PI3K/AKT pathway as a key link modulates the multidrug resistance of cancers. *Cell Death and Disease*, 11(9), 797. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-02998-6>
- Liu, X. R., Zhou, R. L., Zhang, Q., Zhang, Y., Shao, G., Jin, Y. Y., Zhang, S., Lin, M., Rui, J. A., & Ye, D. X. (2003). [Identification and characterization of LAPTM4B encoded by a human hepatocellular carcinoma-associated novel

- gene]. *Journal of Peking University. Health Sciences*, 35(4), 340–347.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12947545/>
- Liu, X.-R., Zhou, R.-L., Zhang, Q.-Y., Zhang, Y., Jin, Y.-Y., Lin, M., Rui, J.-A., & Ye, D.-X. (2004). Structure analysis and expressions of a novel tetra-transmembrane protein, lysosoma-associated protein transmembrane 4 β associated with hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, 10(11), 1555–1559. <https://doi.org/10.3748/wjg.v10.i11.1555>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Loke, J., Buka, R., & Craddock, C. (2021). Allogeneic Stem Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia: Who, When, and How? *Frontiers in Immunology*, 12, 659595. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.659595>
- Lozzio, C. B., & Lozzio, B. B. (2016). Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood*, 128(16), 321–334. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-08-736025>
- Lu, X., Liang, H., Orvig, C., & Chen, Z.-F. (2021). Peptide and Small Molecule Inhibitors Targeting Myeloid Cell Leukemia 1 (Mcl-1) as Novel Antitumor Agents. *Current Molecular Medicine*, 21(5), 426–439. <https://doi.org/10.2174/1566524020666200929121016>
- Lücking, U., Wortmann, L., Wengner, A. M., Lefranc, J., Lienau, P., Briem, H., Siemeister, G., Bömer, U., Denner, K., Schäfer, M., Koppitz, M., Eis, K., Bartels, F., Bader, B., Bone, W., Moosmayer, D., Holton, S. J., Eberspächer, U., Grudzinska-Goebel, J., ... von Nussbaum, F. (2020). Damage Incorporated: Discovery of the Potent, Highly Selective, Orally Available ATR Inhibitor BAY 1895344 with Favorable Pharmacokinetic Properties and Promising Efficacy in Monotherapy and in Combination Treatments in Preclinical Tumor Models. *Journal of Medicinal Chemistry*, 63(13), 7293–7325. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00369>
- Luzio, J. P., Pryor, P. R., & Bright, N. A. (2007). Lysosomes: fusion and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(8), 622–632. <https://doi.org/10.1038/NRM2217>
- Machado, E. R., Annunziata, I., van de Vlekkert, D., Grosveld, G. C., & d'Azzo, A. (2021). Lysosomes and Cancer Progression: A Malignant Liaison. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 642494. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.642494>
- Madan, V., & Koeffler, H. P. (2020). Differentiation therapy of myeloid leukemia: four decades of development. *Haematologica*, 106(1), 26–38. <https://doi.org/10.3324/haematol.2020.262121>

- Mahapatra, K. K., Mishra, S. R., Behera, B. P., Patil, S., Gewirtz, D. A., & Bhutia, S. K. (2021). The lysosome as an imperative regulator of autophagy and cell death. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 78(23), 7435–7449. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03988-3>
- Mahmud, H., Kornblau, S. M., ter Elst, A., Scherpen, F. J. G., Qiu, Y. H., Coombes, K. R., & de Bont, E. S. J. M. (2016). Epidermal growth factor receptor is expressed and active in a subset of acute myeloid leukemia. *Journal of Hematology and Oncology*, 9(1), 64. <https://doi.org/10.1186/s13045-016-0294-x>
- Maki, Y., Fujimoto, J., Lang, W., Xu, L., Behrens, C., Wistuba, I. I., & Kadara, H. (2015). LAPT4B is associated with poor prognosis in NSCLC and promotes the NRF2-mediated stress response pathway in lung cancer cells. *Scientific Reports*, 5(1), 13846. <https://doi.org/10.1038/srep13846>
- Martelli, M. P., Martino, G., Cardinali, V., Falini, B., Martinelli, G., & Cerchione, C. (2020). Enasidenib and ivosidenib in AML. *Minerva Medica*, 111(5), 411–426.
- Martínez, M., Martínez, N., & Silva, W. (2017). Measurement of the Intracellular Calcium Concentration with Fura-2 AM Using a Fluorescence Plate Reader. *Bio Protocol*, 7(14), e2411. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2411>
- Matsunaga, T., Kezuka, C., Morikawa, Y., Suzuki, A., Endo, S., Iguchi, K., Miura, T., Nishinaka, T., Terada, T., El-Kabbani, O., Hara, A., & Ikari, A. (2015). Up-Regulation of Carbonyl Reductase 1 Renders Development of Doxorubicin Resistance in Human Gastrointestinal Cancers. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 38(9), 1309–1319. <https://doi.org/10.1248/bpb.b15-00176>
- Matsuo, Y., MacLeod, R., Uphoff, C., Drexler, H., Nishizaki, C., Katayama, Y., Kimura, G., Fujii, N., Omoto, E., Harada, M., & Orita, K. (1997). Two acute monocytic leukemia (AML-M5a) cell lines (MOLM-13 and MOLM-14) with interclonal phenotypic heterogeneity showing MLL-AF9 fusion resulting from an occult chromosome insertion, ins(11;9)(q23;p22p23). *Leukemia*, 11(9), 1469–1477. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2400768>
- Mauthe, M., Orhon, I., Rocchi, C., Zhou, X., Luhr, M., Hijlkema, K.-J., Coppes, R. P., Engedal, N., Mari, M., & Reggiori, F. (2018). Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy*, 14(8), 1435–1455. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1474314>
- McBride, B. F., Yang, T., Liu, K., Urban, T. J., Giacomini, K. M., Kim, R. B., & Roden, D. M. (2009). The Organic Cation Transporter, OCTN1, Expressed in the Human Heart, Potentiates Antagonism of the HERG Potassium Channel. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 54(1), 63–71. <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e3181abc288>
- McGavin, J. K., & Spencer, C. M. (2001). Gemtuzumab ozogamicin. *Drugs*, 61(9), 1317–1322. <https://doi.org/10.2165/00003495-200161090-00007>

- Medeiros, B. C. (2018). Is there a standard of care for relapsed AML? *Best Practice and Research Clinical Haematology*, 31(4), 384–386. <https://doi.org/10.1016/j.beha.2018.09.006>
- Medina, D. L. (2021). Lysosomal calcium and autophagy. In *International review of cell and molecular biology* (Vol. 362, pp. 141–170). <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2021.03.002>
- Medina, D. L., di Paola, S., Peluso, I., Armani, A., de Stefani, D., Venditti, R., Montefusco, S., Scotto-Rosato, A., Prezioso, C., Forrester, A., Settembre, C., Wang, W., Gao, Q., Xu, H., Sandri, M., Rizzuto, R., de Matteis, M. A., & Ballabio, A. (2015). Lysosomal calcium signalling regulates autophagy through calcineurin and TFEB. *Nature Cell Biology*, 17(3), 288–299. <https://doi.org/10.1038/ncb3114>
- Mejer, J. N., Mortensen, B. T., & Christensen, I. J. (1990). Modulation of the effect of 1-β-D-Arabinofuranosylcytosine based on changes of Cytidine Deaminase activity in HL60 Cells. *Medical Oncology and Tumor Pharmacotherapy*, 7(1), 25–29. <https://doi.org/10.1007/BF03000487>
- Mendoza, M. C., Er, E. E., & Blenis, J. (2011). The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends in Biochemical Sciences*, 36(6), 320–328. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.03.006>
- Meng, F., Chen, X., Song, H., & Lou, G. (2015). LAPTM4B Down Regulation Inhibits the Proliferation, Invasion and Angiogenesis of HeLa Cells In Vitro. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 37(3), 890–900. <https://doi.org/10.1159/000430216>
- Meng, F., Li, H., Zhou, R., Luo, C., Hu, Y., & Lou, G. (2013). LAPTM4B gene polymorphism and endometrial carcinoma risk and prognosis. *Biomarkers*, 18(2), 136–143. <https://doi.org/10.3109/1354750X.2012.752526>
- Meng, F., Luo, C., Hu, Y., Yin, M., Lin, M., Lou, G., & Zhou, R. (2010). Overexpression of LAPTM4B-35 in Cervical Carcinoma. *International Journal of Gynecological Pathology*, 29(6), 587–593. <https://doi.org/10.1097/PGP.0b013e3181e0898e>
- Meng, F., Yin, M., Song, H., Yang, H., Lou, G., & Zhou, R. (2010). LAPTM4B-35 Overexpression Is an Independent Prognostic Marker in Endometrial Carcinoma. *International Journal of Gynecologic Cancer*, 20(5), 745–750. <https://doi.org/10.1111/IGC.0b013e3181e02f90>
- Meng, Y., Wang, L., Chen, D., Chang, Y., Zhang, M., Xu, J.-J., Zhou, R., & Zhang, Q.-Y. (2016). LAPTM4B: an oncogene in various solid tumors and its functions. *Oncogene*, 35(50), 6359–6365. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.189>
- Meng, Y., Wang, L., Xu, J., & Zhang, Q. (2018). AP4 positively regulates LAPTM4B to promote hepatocellular carcinoma growth and metastasis, while reducing

- chemotherapy sensitivity. *Molecular Oncology*, 12(3), 373–390.
<https://doi.org/10.1002/1878-0261.12171>
- Mercadante, A. A., & Kasi, A. (2022). Genetics, Cancer Cell Cycle Phases. In *StatPearls* (Treasure Island).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK563158/>
- Metzeler, K. H., Hummel, M., Bloomfield, C. D., Spiekermann, K., Braess, J., Sauerland, M.-C., Heinecke, A., Radmacher, M., Marcucci, G., Whitman, S. P., Maharry, K., Paschka, P., Larson, R. A., Berdel, W. E., Büchner, T., Wörmann, B., Mansmann, U., Hiddemann, W., Böhlender, S. K., & Buske, C. (2008). An 86-probe-set gene-expression signature predicts survival in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood*, 112(10), 4193–4201.
<https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-134411>
- Milkereit, R. J. (2014). *Lysosomal Targeting and Functions of the LAPTM4 Family of Proteins by Proteins*. University of Toronto.
- Milkereit, R., Persaud, A., Vanoaica, L., Guetg, A., Verrey, F., & Rotin, D. (2015). LAPTM4b recruits the LAT1-4F2hc Leu transporter to lysosomes and promotes mTORC1 activation. *Nature Communications*, 6(1), 7250.
<https://doi.org/10.1038/ncomms8250>
- Milkereit, R., & Rotin, D. (2011). A Role for the Ubiquitin Ligase Nedd4 in Membrane Sorting of LAPTM4 Proteins. *PLoS ONE*, 6(11), e27478.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027478>
- Mindell, J. A. (2012). Lysosomal Acidification Mechanisms. *Annual Review of Physiology*, 74(1), 69–86. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-012110-142317>
- Mirfakhraie, R., Noorazar, L., Mohammadian, M., Hajifathali, A., Gholizadeh, M., Salimi, M., Sankanian, G., Roshandel, E., & Mehdizadeh, M. (2022). Treatment Failure in Acute Myeloid Leukemia: Focus on the Role of Extracellular Vesicles. *Leukemia Research*, 112, 106751.
<https://doi.org/10.1016/j.leukres.2021.106751>
- Mizushima, N., & Yoshimori, T. (2007). How to Interpret LC3 Immunoblotting. *Autophagy*, 3(6), 542–545. <https://doi.org/10.4161/auto.4600>
- Moarii, M., & Papaemmanuil, E. (2017). Classification and risk assessment in AML: integrating cytogenetics and molecular profiling. *Hematology*, 2017(1), 37–44.
<https://doi.org/10.1182/asheducation-2017.1.37>
- Molica, M., & Perrone, S. (2022). Molecular targets for the treatment of AML in the forthcoming 5th World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours. *Expert Review of Hematology*, 15(11), 973–986.
<https://doi.org/10.1080/17474086.2022.2140137>

- Momparler, R. L., Laliberté, J., Eliopoulos, N., Beauséjour, C., & Cournoyer, D. (1996). Transfection of murine fibroblast cells with human cytidine deaminase cDNA confers resistance to cytosine arabinoside. *Anti-Cancer Drugs*, 7(3), 266–274. <https://doi.org/10.1097/00001813-199605000-00005>
- Mondet, J., Lo Presti, C., Chevalier, S., Bertrand, A., Tondeur, S., Blanchet, S., Mc Leer, A., Pernet-Gallay, K., & Mossuz, P. (2021). Mitochondria in human acute myeloid leukemia cell lines have ultrastructural alterations linked to deregulation of their respiratory profiles. *Experimental Hematology*, 98, 53-62.e3. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2021.03.001>
- Montesinos, P., Recher, C., Vives, S., Zarzycka, E., Wang, J., Bertani, G., Heuser, M., Calado, R. T., Schuh, A. C., Yeh, S.-P., Daigle, S. R., Hui, J., Pandya, S. S., Gianolio, D. A., de Botton, S., & Döhner, H. (2022). Ivosidenib and Azacitidine in *IDH1* -Mutated Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 386(16), 1519–1531. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2117344>
- Mori, M., Kaneko, N., Ueno, Y., Yamada, M., Tanaka, R., Saito, R., Shimada, I., Mori, K., & Kuromitsu, S. (2017). Gilteritinib, a FLT3/AXL inhibitor, shows antileukemic activity in mouse models of FLT3 mutated acute myeloid leukemia. *Investigational New Drugs*, 35(5), 556–565. <https://doi.org/10.1007/s10637-017-0470-z>
- Morrison, D. J., Hogan, L. E., Condos, G., Bhatla, T., Germino, N., Moskowitz, N. P., Lee, L., Bhojwani, D., Horton, T. M., Belitskaya-Levy, I., Greenberger, L. M., Horak, I. D., Grupp, S. A., Teachey, D. T., Raetz, E. A., & Carroll, W. L. (2012). Endogenous knockdown of survivin improves chemotherapeutic response in ALL models. *Leukemia*, 26(2), 271–279. <https://doi.org/10.1038/leu.2011.199>
- Morrison, S. J., & Weissman, I. L. (1994). The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity*, 1(8), 661–673. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(94\)90037-X](https://doi.org/10.1016/1074-7613(94)90037-X)
- Mosquera Orgueira, A., Peleteiro Raíndo, A., Cid López, M., Díaz Arias, J. Á., González Pérez, M. S., Antelo Rodríguez, B., Alonso Vence, N., Bao Pérez, L., Ferreiro Ferro, R., Albors Ferreiro, M., Abuín Blanco, A., Fontanes Trabazo, E., Cerchione, C., Martinnelli, G., Montesinos Fernández, P., Mateo Pérez Encinas, M., & Luis Bello López, J. (2021). Personalized Survival Prediction of Patients With Acute Myeloblastic Leukemia Using Gene Expression Profiling. *Frontiers in Oncology*, 11, 657191. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.657191>
- Mrschik, M., & Ryan, K. M. (2015). Lysosomal proteins in cell death and autophagy. *FEBS Journal*, 282(10), 1858–1870. <https://doi.org/10.1111/febs.13253>

- Murphy, T., & Yee, K. W. L. (2017). Cytarabine and daunorubicin for the treatment of acute myeloid leukemia. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 18(16), 1765–1780. <https://doi.org/10.1080/14656566.2017.1391216>
- Nakagawa, T., Matozaki, S., Murayama, T., Nishimura, R., Tsutsumi, M., Kawaguchi, R., Yokoyama, Y., Hikiji, K., Isobe, T., & Chihara, K. (2008). Establishment of a leukaemic cell line from a patient with acquisition of chromosomal abnormalities during disease progression in myelodysplastic syndrome. *British Journal of Haematology*, 85(3), 469–476. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1993.tb03334.x>
- Napoli, J. L., Martin, C. A., & Horst, R. L. (1991). Induction, inhibition, and analysis of vitamin D metabolism in cultured cells. In *Methods in Enzymology* (Vol. 206, pp. 491–501). [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(91\)06118-M](https://doi.org/10.1016/0076-6879(91)06118-M)
- Nath, S., Bhattacharyya, J., Sarma, P. P., Saxena, R., Sazawal, S., Barman, M. P., & Saikia, K. K. (2020). The Prognostic Impact of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) in Patients with Acute Myeloid Leukaemia. *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion*, 36(4), 749–753. <https://doi.org/10.1007/s12288-020-01274-z>
- Ndiaye, K., Carrière, P. D., Sirois, J., Silversides, D. W., & Lussier, J. G. (2015). Differential expression of lysosome-associated protein transmembrane-4 beta (LAPTM4B) in granulosa cells of ovarian follicles and in other bovine tissues. *Journal of Ovarian Research*, 8(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s13048-015-0148-0>
- Nepstad, I., Hatfield, K. J., Grønningsæter, I. S., & Reikvam, H. (2020). The PI3K-Akt-mTOR Signaling Pathway in Human Acute Myeloid Leukemia (AML) Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(8), 2907. <https://doi.org/10.3390/ijms21082907>
- Ng, S. W., Mitchell, A., Kennedy, J. A., Chen, W. C., McLeod, J., Ibrahimova, N., Arruda, A., Popescu, A., Gupta, V., Schimmer, A. D., Schuh, A. C., Yee, K. W., Bullinger, L., Herold, T., Görlich, D., Büchner, T., Hiddemann, W., Berdel, W. E., Wörmann, B., ... Wang, J. C. (2016). A 17-gene stemness score for rapid determination of risk in acute leukaemia. *Nature*, 540(7633), 433–437. <https://doi.org/10.1038/nature20598>
- Nishimura, Y., Sameni, M., & Sloane, B. F. (1998). Malignant transformation alters intracellular trafficking of lysosomal cathepsin D in human breast epithelial cells. *Pathology and Oncology Research*, 4(4), 283–296. <https://doi.org/10.1007/BF02905219>
- Novershtern, N., Subramanian, A., Lawton, L. N., Mak, R. H., Haining, W. N., McConkey, M. E., Habib, N., Yosef, N., Chang, C. Y., Shay, T., Frampton, G. M., Drake, A. C., Leskov, I., Nilsson, B., Preffer, F., Dombkowski, D., Evans, J. W., Liefeld, T., Smutko, J. S., ... Ebert, B. L. (2011). Densely Interconnected

- Transcriptional Circuits Control Cell States in Human Hematopoiesis. *Cell*, 144(2), 296–309. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.01.004>
- O'Brien, J. A., & Rizzieri, D. A. (2013). Leukemic Stem Cells: A Review. *Cancer Investigation*, 31(4), 215–220. <https://doi.org/10.3109/07357907.2012.700986>
- Öksüzöğlü, E., & Kozalak, G. (2021). Inhibition of apoptosis may lead to the development of bortezomib resistance in multiple myeloma cancer cells. *Turkish Journal of Biochemistry*, 46(1), 65–71. <https://doi.org/10.1515/tjb-2019-0521>
- Padmakumar, D., Chandraprabha, V. R., Gopinath, P., Vimala Devi, A. R., Anitha, G. R., Sreelatha, M. M., Padmakumar, A., & Sreedharan, H. (2021). A concise review on the molecular genetics of acute myeloid leukemia. *Leukemia Research*, 111, 106727. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2021.106727>
- Pan, L., Chen, S., Weng, C., Call, G., Zhu, D., Tang, H., Zhang, N., & Xie, T. (2007). Stem Cell Aging Is Controlled Both Intrinsically and Extrinsically in the Drosophila Ovary. *Cell Stem Cell*, 1(4), 458–469. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.09.010>
- Pang, E., Hu, Y., Chan, K. Y., Lai, P. B., Squire, J. A., Macgregor, P. F., Beheshti, B., Albert, M., Leung, T. W., & Wong, N. (2005). Karyotypic imbalances and differential gene expressions in the acquired doxorubicin resistance of hepatocellular carcinoma cells. *Laboratory Investigation*, 85(5), 664–674. <https://doi.org/10.1038/LABINVEST.3700254>
- Pang, Y., Zhang, S., Yang, H., & Zhou, R. L. (2021). [Serum LAPTM4B-35 protein as a novel diagnostic marker for hepatocellular carcinoma]. *Journal of Peking University*, 53(4), 710–715.
- Panina, S. B., Pei, J., & Kirienko, N. V. (2021). Mitochondrial metabolism as a target for acute myeloid leukemia treatment. *Cancer and Metabolism*, 9(1), 17. <https://doi.org/10.1186/S40170-021-00253-W>
- Pastor-Anglada, M., & Pérez-Torras, S. (2018). Emerging Roles of Nucleoside Transporters. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 606. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00606>
- Paunovic, V., Kotic, M., Misirkic-Marjanovic, M., Trajkovic, V., & Harhaji-Trajkovic, L. (2021). Dual targeting of tumor cell energy metabolism and lysosomes as an anticancer strategy. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1868(4), 118944. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118944>
- Peng, C., Zhou, R.-L., Shao, G.-Z., Rui, J.-A., Wang, S.-B., Lin, M., Zhang, S., & Gao, Z.-F. (2005). Expression of lysosome-associated protein transmembrane 4B-35 in cancer and its correlation with the differentiation status of hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, 11(18), 2704. <https://doi.org/10.3748/wjg.v11.i18.2704>

- Perera, R. M., & Zoncu, R. (2016). The Lysosome as a Regulatory Hub. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 32(1), 223–253. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-CELLBIO-111315-125125>
- Perl, A. E., Altman, J. K., Cortes, J., Smith, C., Litzow, M., Baer, M. R., Claxton, D., Erba, H. P., Gill, S., Goldberg, S., Jurcic, J. G., Larson, R. A., Liu, C., Ritchie, E., Schiller, G., Spira, A. I., Strickland, S. A., Tibes, R., Ustun, C., ... Levis, M. (2017). Selective inhibition of FLT3 by gilteritinib in relapsed or refractory acute myeloid leukaemia: a multicentre, first-in-human, open-label, phase 1–2 study. *The Lancet Oncology*, 18(8), 1061–1075. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30416-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30416-3)
- Platt, F. M., d’Azzo, A., Davidson, B. L., Neufeld, E. F., & Tiffet, C. J. (2018). Lysosomal storage diseases. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(1), 27. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0025-4>
- Pourrajab, F., Zare-Khormizi, M. R., Hashemi, A. S., & Hekmatimoghaddam, S. (2020). Genetic Characterization and Risk Stratification of Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Management and Research*, 12, 2231–2253. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S242479>
- Puissant, A., Robert, G., Fenouille, N., Luciano, F., Cassuto, J.-P., Raynaud, S., & Auberger, P. (2010). Resveratrol Promotes Autophagic Cell Death in Chronic Myelogenous Leukemia Cells via JNK-Mediated p62/SQSTM1 Expression and AMPK Activation. *Cancer Research*, 70(3), 1042–1052. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3537>
- Qiao, M., & Hu, G. (2015). Lysosome-associated protein transmembrane-4 β -35 is a novel independent prognostic factor in small cell lung cancer. *Tumor Biology*, 36(10), 7493–7499. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3467-2>
- ¿Qué es el cáncer? - NCI. (2021). <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>
- Quentmeier, H., Reinhardt, J., Zaborski, M., & Drexler, H. G. (2003). FLT3 mutations in acute myeloid leukemia cell lines. *Leukemia*, 17(1), 120–124. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402740>
- Rafiq, S., McKenna, S. L., Muller, S., Tschan, M. P., & Humbert, M. (2021). Lysosomes in acute myeloid leukemia: potential therapeutic targets? *Leukemia*, 35(10), 2759–2770. <https://doi.org/10.1038/s41375-021-01388-x>
- Ragu, S., Matos-Rodrigues, G., & Lopez, B. S. (2020). Replication Stress, DNA Damage, Inflammatory Cytokines and Innate Immune Response. *Genes*, 11(4), 409. <https://doi.org/10.3390/genes11040409>
- Ralph, P., Moore, M. A., & Nilsson, K. (1976). Lysozyme synthesis by established human and murine histiocytic lymphoma cell lines. *Journal of Experimental Medicine*, 143(6), 1528–1533. <https://doi.org/10.1084/jem.143.6.1528>

- Randazzo, O., Papini, F., Mantini, G., Gregori, A., Parrino, B., Liu, D. S., Cascioferro, S., Carbone, D., Peters, G. J., Frampton, A. E., Garajova, I., & Giovannetti, E. (2020). “Open Sesame?”: Biomarker Status of the Human Equilibrative Nucleoside Transporter-1 and Molecular Mechanisms Influencing its Expression and Activity in the Uptake and Cytotoxicity of Gemcitabine in Pancreatic Cancer. *Cancers*, *12*(11), 3206. <https://doi.org/10.3390/cancers12113206>
- Rapin, N., Bagger, F. O., Jendholm, J., Mora-Jensen, H., Krogh, A., Kohlmann, A., Thiede, C., Borregaard, N., Bullinger, L., Winther, O., Theilgaard-Mönch, K., & Porse, B. T. (2014). Comparing cancer vs normal gene expression profiles identifies new disease entities and common transcriptional programs in AML patients. *Blood*, *123*(6), 894–904. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-02-485771>
- Ratajczak, M. Z., Zuba-Surma, E., Kucia, M., Reza, R., Wojakowski, W., & Ratajczak, J. (2006). The pleiotropic effects of the SDF-1–CXCR4 axis in organogenesis, regeneration and tumorigenesis. *Leukemia*, *20*(11), 1915–1924. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404357>
- Rehman, Z., Fahim, A., Bhatti, A., Sadia, H., & John, P. (2019). Co-expression of HIF-1 α , MDR1 and LAPTM4B in peripheral blood of solid tumors. *PeerJ*, *7*(2), e6309. <https://doi.org/10.7717/peerj.6309>
- Riccardi, R., Chabner, B., Glaubiger, D. L., Wood, J., & Poplack, D. G. (1982). Influence of tetrahydrouridine on the pharmacokinetics of intrathecally administered 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine. *Cancer Research*, *42*(5), 1736–1739.
- Riva, C., Barra, Y., Carcassonne, Y., Cano, J. P., & Ruslum, Y. (1992). Effect of tetrahydrouridine on metabolism and transport of 1- β -D-arabinofuranosylcytosine in human cells. *Chemotherapy*, *38*(5), 358–366. <https://doi.org/10.1159/000239026>
- Roloff, G. W., Odenike, O., Bajel, A., Wei, A. H., Foley, N., & Uy, G. L. (2022). Contemporary Approach to Acute Myeloid Leukemia Therapy in 2022. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*, *42*(42), 568–583. https://doi.org/10.1200/EDBK_349605
- Roussel, X., Daguindau, E., Berceanu, A., Desbrosses, Y., Warda, W., Neto da Rocha, M., Trad, R., Deconinck, E., Deschamps, M., & Ferrand, C. (2020). Acute Myeloid Leukemia: From Biology to Clinical Practices Through Development and Pre-Clinical Therapeutics. *Frontiers in Oncology*, *10*, 599933. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.599933>
- Rowe, J. M. (2022). The “7+3” regimen in acute myeloid leukemia. *Haematologica*, *107*(1), 3–3. <https://doi.org/10.3324/haematol.2021.280161>

- Ruiz-Rodado, V., Lita, A., & Larion, M. (2022). Advances in measuring cancer cell metabolism with subcellular resolution. *Nature Methods*, *19*(9), 1048–1063. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01572-6>
- Safa, A. R. (2022). Drug and apoptosis resistance in cancer stem cells (CSCs): A puzzle with many pieces. *Cancer Drug Resistance*, *5*(4), 850–872. <https://doi.org/10.20517/cdr.2022.20>
- Saftig, P. (2006). Physiology of the lysosome. In *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS*. Oxford PharmaGenesis. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11604/>
- Salaroglio, I. C., Mungo, E., Gazzano, E., Kopecka, J., & Riganti, C. (2019). ERK is a Pivotal Player of Chemo-Immune-Resistance in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(10), 2505. <https://doi.org/10.3390/ijms20102505>
- Sant, M., Allemani, C., Tereanu, C., De Angelis, R., Capocaccia, R., Visser, O., Marcos-Gragera, R., Maynadié, M., Simonetti, A., Lutz, J.-M., & Berrino, F. (2010). Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. *Blood*, *116*(19), 3724–3734. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-05-282632>
- Sardiello, M., Palmieri, M., di Ronza, A., Medina, D. L., Valenza, M., Gennarino, V. A., di Malta, C., Donaudy, F., Embrione, V., Polishchuk, R. S., Banfi, S., Parenti, G., Cattaneo, E., & Ballabio, A. (2009). A Gene Network Regulating Lysosomal Biogenesis and Function. *Science*, *325*(5939), 473–477. <https://doi.org/10.1126/science.1174447>
- Sarry, J.-E., Murphy, K., Perry, R., Sanchez, P. V., Secreto, A., Keefer, C., Swider, C. R., Strzelecki, A.-C., Cavelier, C., Récher, C., Mansat-De Mas, V., Delabesse, E., Danet-Desnoyers, G., & Carroll, M. (2011). Human acute myelogenous leukemia stem cells are rare and heterogeneous when assayed in NOD/SCID/IL2R γ c-deficient mice. *Journal of Clinical Investigation*, *121*(1), 384–395. <https://doi.org/10.1172/JCI41495>
- Saunders, N. A., Simpson, F., Thompson, E. W., Hill, M. M., Endo-Munoz, L., Leggatt, G., Minchin, R. F., & Guminski, A. (2012). Role of intratumoural heterogeneity in cancer drug resistance: molecular and clinical perspectives. *EMBO Molecular Medicine*, *4*(8), 675–684. <https://doi.org/10.1002/emmm.201101131>
- Schaaf, M. B., Houbaert, D., Meçe, O., To, S. K., Ganne, M., Maes, H., & Agostinis, P. (2019). Lysosomal Pathways and Autophagy Distinctively Control Endothelial Cell Behavior to Affect Tumor Vasculature. *Frontiers in Oncology*, *9*, 171. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00171>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J.,

- Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, *9*(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schneider, Y.-J., Octave, J.-N., & Trouet, A. (1985). Chapter 10 The Role of Endocytosis and Lysosomes in Cell Physiology. In *Current Topics in Membranes and Transport* (Vol. 24, Issue C, pp. 413–458). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0070-2161\(08\)60332-9](https://doi.org/10.1016/S0070-2161(08)60332-9)
- Schoch, C., Kern, W., Kohlmann, A., Hiddemann, W., Schnittger, S., & Haferlach, T. (2005). Acute myeloid leukemia with a complex aberrant karyotype is a distinct biological entity characterized by genomic imbalances and a specific gene expression profile. *Genes, Chromosomes and Cancer*, *43*(3), 227–238. <https://doi.org/10.1002/gcc.20193>
- Schröder, J. K., Kirch, C., Seeber, S., & Schütte, J. (1998). Structural and functional analysis of the cytidine deaminase gene in patients with acute myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology*, *103*(4), 1096–1103. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2141.1998.01084.X>
- Sebolt-Leopold, J. S., Dudley, D. T., Herrera, R., Van Becelaere, K., Wiland, A., Gowan, R. C., Teclé, H., Barrett, S. D., Bridges, A., Przybranowski, S., Leopold, W. R., & Saltiel, A. R. (1999). Blockade of the MAP kinase pathway suppresses growth of colon tumors in vivo. *Nature Medicine*, *5*(7), 810–816. <https://doi.org/10.1038/10533>
- Seo, I., Jha, B. K., Lim, J.-G., Suh, S.-I., Suh, M.-H., & Baek, W.-K. (2014). Identification of lysosomotropic compounds based on the distribution and size of lysosomes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *450*(1), 189–194. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2014.05.091>
- Serrano-Puebla, A., & Boya, P. (2018). Lysosomal membrane permeabilization as a cell death mechanism in cancer cells. *Biochemical Society Transactions*, *46*(2), 207–215. <https://doi.org/10.1042/BST20170130>
- Settembre, C., Di Malta, C., Polito, V. A., Arcibibia, M. G., Vetrini, F., Erdin, S., Erdin, S. U., Huynh, T., Medina, D., Colella, P., Sardiello, M., Rubinsztein, D. C., & Ballabio, A. (2011). TFEB Links Autophagy to Lysosomal Biogenesis. *Science*, *332*(6036), 1429–1433. <https://doi.org/10.1126/science.1204592>
- Shaffer, B. C., Gillet, J.-P., Patel, C., Baer, M. R., Bates, S. E., & Gottesman, M. M. (2012). Drug resistance: Still a daunting challenge to the successful treatment of AML. *Drug Resistance Updates*, *15*(1–2), 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2012.02.001>
- Shaker, O., Taha, F., Salah, M., & El-Marzouky, M. (2015). LAPTM4B Gene Expression And Polymorphism As Diagnostic Markers Of Breast Cancer In

- Egyptian Patients. *Journal of Medical Biochemistry*, 34(4), 393–401.
<https://doi.org/10.2478/jomb-2014-0067>
- Shallis, R. M., Wang, R., Davidoff, A., Ma, X., & Zeidan, A. M. (2019). Epidemiology of acute myeloid leukemia: Recent progress and enduring challenges. *Blood Reviews*, 36, 70–87. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2019.04.005>
- Shao, G.-Z., Zhou, R.-L., Zhang, Q.-Y., Zhang, Y., Liu, J.-J., Rui, J.-A., Wei, X., & Ye, D.-X. (2003). Molecular cloning and characterization of LAPTM4B, a novel gene upregulated in hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 22(32), 5060–5069. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206832>
- Shi, G., Zhou, C., Wang, D., Ma, W., & Zhang, S. (2014). LAPTM4B-35 protein is a weak tumor-associated antigen candidate. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 7(2), 491–495. <https://doi.org/10.3892/etm.2013.1427>
- Shin, D.-Y. (2022). Human acute myeloid leukemia stem cells: evolution of concept. *Blood Research*, 57(S1), 67–74. <https://doi.org/10.5045/br.2022.2021221>
- Shlush, L. I., & Mitchell, A. (2015). AML evolution from preleukemia to leukemia and relapse. *Best Practice and Research Clinical Haematology*, 28(2–3), 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.beha.2015.10.004>
- Sironi, J., Aranda, E., Nordström, L. U., & Schwartz, E. L. (2019). Lysosome Membrane Permeabilization and Disruption of the Molecular Target of Rapamycin (mTOR)-Lysosome Interaction Are Associated with the Inhibition of Lung Cancer Cell Proliferation by a Chloroquinoline Analog. *Molecular Pharmacology*, 95(1), 127–138. <https://doi.org/10.1124/mol.118.113118>
- Sonneveld, P., Mulder, J. A., & van Bekkum, D. W. (1981). Cytotoxicity of doxorubicin for normal hematopoietic and acute myeloid leukemia cells of the rat. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 5(3), 167–173. <https://doi.org/10.1007/BF00258475>
- Stauber, J., Grealley, J. M., & Steidl, U. (2021). Preleukemic and leukemic evolution at the stem cell level. *Blood*, 137(8), 1013–1018. <https://doi.org/10.1182/blood.2019004397>
- Stefanski, C. D., Keffler, K., McClintock, S., Milac, L., & Prosperi, J. R. (2019). APC loss affects DNA damage repair causing doxorubicin resistance in breast cancer cells. *Neoplasia*, 21(12), 1143–1150. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2019.09.002>
- Steube, K. G., Teepe, D., Meyer, C., Zaborski, M., & Drexler, H. G. (1997). A model system in haematology and immunology: The human monocytic cell line MONO-MAC-1. *Leukemia Research*, 21(4), 327–335. [https://doi.org/10.1016/S0145-2126\(96\)00129-4](https://doi.org/10.1016/S0145-2126(96)00129-4)
- Stölzel, F., Mohr, B., Kramer, M., Oelschlägel, U., Bochtler, T., Berdel, W. E., Kaufmann, M., Baldus, C. D., Schäfer-Eckart, K., Stuhlmann, R., Einsele, H.,

- Krause, S. W., Serve, H., Hänel, M., Herbst, R., Neubauer, A., Sohlbach, K., Mayer, J., Middeke, J. M., ... Ehninger, G. (2016). Karyotype complexity and prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood Cancer Journal*, *6*(1), e386. <https://doi.org/10.1038/bcj.2015.114>
- Stubbins, R. J., & Karsan, A. (2021). Differentiation therapy for myeloid malignancies: beyond cytotoxicity. *Blood Cancer Journal*, *11*(12), 193. <https://doi.org/10.1038/s41408-021-00584-3>
- Su, L., Hu, Z., & Yang, Y. (2021). Role of CXCR4 in the progression and therapy of acute leukaemia. *Cell Proliferation*, *54*(7), e13076. <https://doi.org/10.1111/cpr.13076>
- Su, Q., Luo, H., Zhang, M., Gao, L., & Zhao, F. (2020). LAPTM4B promotes the progression of nasopharyngeal cancer. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, *21*(3), 305–312. <https://doi.org/10.17305/bjbms.2020.4738>
- Sukhai, M. A., Prabha, S., Hurren, R., Rutledge, A. C., Lee, A. Y., Sriskanthadevan, S., Sun, H., Wang, X., Skrtic, M., Seneviratne, A., Cusimano, M., Jhas, B., Gronda, M., MacLean, N., Cho, E. E., Spagnuolo, P. A., Sharmeen, S., Gebbia, M., Urbanus, M., ... Schimmer, A. D. (2013). Lysosomal disruption preferentially targets acute myeloid leukemia cells and progenitors. *Journal of Clinical Investigation*, *123*(1), 315–328. <https://doi.org/10.1172/JCI64180>
- Sukhai, M. A., Spagnuolo, P. A., Weir, S., Kasper, J., Patton, L., & Schimmer, A. D. (2011). New sources of drugs for hematologic malignancies. *Blood*, *117*(25), 6747–6755. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-02-315283>
- Suzuki, T., Nakagawa, M., Yoshikawa, A., Sasagawa, N., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., Nishino, I., Ishiura, S., & Nonaka, I. (2002). The First Molecular Evidence That Autophagy Relates Rimmed Vacuole Formation in Chloroquine Myopathy. *Journal of Biochemistry*, *131*(5), 647–651. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a003147>
- Tan, B. T., Park, C. Y., Ailles, L. E., & Weissman, I. L. (2006). The cancer stem cell hypothesis: a work in progress. *Laboratory Investigation*, *86*(12), 1203–1207. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700488>
- Tan, V. P., & Miyamoto, S. (2016). Nutrient-sensing mTORC1: Integration of metabolic and autophagic signals. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *95*, 31–41. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2016.01.005>
- Tan, X., Sun, Y., Thapa, N., Liao, Y., Hedman, A. C., & Anderson, R. A. (2015). LAPTM4B is a PtdIns(4,5)P₂ effector that regulates EGFR signaling, lysosomal sorting, and degradation. *The EMBO Journal*, *34*(4), 475–490. <https://doi.org/10.15252/embj.201489425>
- Tang, H., Tian, H., Yue, W., Li, L., Li, S., Gao, C., Si, L., Qi, L., Lu, M., & Hu, W. (2014). LAPTM4B polymorphism is associated with non-small cell lung cancer

- susceptibility and prognosis. *Oncology Reports*, 31(5), 2454–2460.
<https://doi.org/10.3892/or.2014.3116>
- Tang, T., Yang, Z., Wang, D., Yang, X., Wang, J., Li, L., Wen, Q., Gao, L., Bian, X., & Yu, S. (2020). The role of lysosomes in cancer development and progression. *Cell and Bioscience*, 10(1), 131. <https://doi.org/10.1186/s13578-020-00489-x>
- Tanida, I., Ueno, T., & Kominami, E. (2008). LC3 and Autophagy. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 445, pp. 77–88). Humana Press.
https://doi.org/10.1007/978-1-59745-157-4_4
- Tao, D., Liang, J., Pan, Y., Zhou, Y., Feng, Y., Zhang, L., Xu, J., Wang, H., He, P., Yao, J., Zhao, Y., Ning, Q., Wang, W., Jiang, W., Zheng, J., & Wu, X. (2019). *In Vitro* and *In Vivo* Study on the Effect of Lysosome-associated Protein Transmembrane 4 Beta on the Progression of Breast Cancer. *Journal of Breast Cancer*, 22(3), 375–386. <https://doi.org/10.4048/jbc.2019.22.e43>
- Tasseff, R., Jensen, H. A., Congleton, J., Dai, D., Rogers, K. V., Sagar, A., Bunaciu, R. P., Yen, A., & Varner, J. D. (2017). An Effective Model of the Retinoic Acid Induced HL-60 Differentiation Program. *Scientific Reports*, 7(1), 14327.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-14523-5>
- Tavor, S., Petit, I., Porozov, S., Avigdor, A., Dar, A., Leider-Trejo, L., Shemtov, N., Deutsch, V., Naparstek, E., Nagler, A., & Lapidot, T. (2004). CXCR4 Regulates Migration and Development of Human Acute Myelogenous Leukemia Stem Cells in Transplanted NOD/SCID Mice. *Cancer Research*, 64(8), 2817–2824.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-3693>
- Taylor, J., Xiao, W., & Abdel-Wahab, O. (2017). Diagnosis and classification of hematologic malignancies on the basis of genetics. *Blood*, 130(4), 410–423.
<https://doi.org/10.1182/blood-2017-02-734541>
- Thol, F., & Ganser, A. (2020). Treatment of Relapsed Acute Myeloid Leukemia. *Current Treatment Options in Oncology*, 21(8), 66. <https://doi.org/10.1007/s11864-020-00765-5>
- Thol, F., Schlenk, R. F., Heuser, M., & Ganser, A. (2015). How I treat refractory and early relapsed acute myeloid leukemia. *Blood*, 126(3), 319–327.
<https://doi.org/10.1182/blood-2014-10-551911>
- Thomas, D., & Majeti, R. (2017). Biology and relevance of human acute myeloid leukemia stem cells. *Blood*, 129(12), 1577–1585.
<https://doi.org/10.1182/blood-2016-10-696054>
- Tian, Y.-J., Wang, Y.-H., Xiao, A.-J., Li, P.-L., Guo, J., Wang, T.-J., & Zhao, D.-J. (2019). Long noncoding RNA SBF2-AS1 act as a ceRNA to modulate cell proliferation via binding with miR-188-5p in acute myeloid leukemia. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 47(1), 1730–1737.
<https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1608221>

- Trumpp, A., & Haas, S. (2022). Cancer stem cells: The adventurous journey from hematopoietic to leukemic stem cells. *Cell*, *185*(8), 1266–1270. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.03.025>
- Tyner, J. W., Tognon, C. E., Bottomly, D., Wilmot, B., Kurtz, S. E., Savage, S. L., Long, N., Schultz, A. R., Traer, E., Abel, M., Agarwal, A., Blucher, A., Borate, U., Bryant, J., Burke, R., Carlos, A., Carpenter, R., Carroll, J., Chang, B. H., ... Druker, B. J. (2018). Functional genomic landscape of acute myeloid leukaemia. *Nature*, *562*(7728), 526–531. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0623-z>
- Vakiti, A., & Mewawalla, P. (2022). Acute Myeloid Leukemia. In *StatPearls* (Treasure Island).
- Van Dyke, R. W. (1996). Acidification of lysosomes and endosomes. In J. B. Lloyd & R. W. Mason (Eds.), *Biology of the Lysosome. Subcellular Biochemistry* (Vol. 27, pp. 331–360). Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5833-0_10
- Varisli, L., Cen, O., & Vlahopoulos, S. (2020). Dissecting pharmacological effects of chloroquine in cancer treatment: interference with inflammatory signaling pathways. *Immunology*, *159*(3), 257–278. <https://doi.org/10.1111/imm.13160>
- Vergarajauregui, S., Martina, J. A., & Puertollano, R. (2011). LAPTMs regulate lysosomal function and interact with mucolipin 1: new clues for understanding mucopolipidosis type IV. *Journal of Cell Science*, *124*(3), 459–468. <https://doi.org/10.1242/JCS.076240>
- Visser, N., Lourens, H. J., Huls, G., Bremer, E., & Wiersma, V. R. (2021). Inhibition of Autophagy Does Not Re-Sensitize Acute Myeloid Leukemia Cells Resistant to Cytarabine. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(5), 2337. <https://doi.org/10.3390/ijms22052337>
- Visser, O., Trama, A., Maynadié, M., Stiller, C., Marcos-Gragera, R., De Angelis, R., Mallone, S., Tereanu, C., Allemani, C., Ricardi, U., Schouten, H. C., Zielonk, N., Van Eycken, E., Sundseth, H., Hedelin, G., Bouvier, A. M., Mounier, M., Woronoff, A. S., Buemi, A., ... White, C. (2012). Incidence, survival and prevalence of myeloid malignancies in Europe. *European Journal of Cancer*, *48*(17), 3257–3266. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.05.024>
- Wang, B., Gu, Y., Hui, K., Huang, J., Xu, S., Wu, S., Li, L., Fan, J., Wang, X., Hsieh, J.-T., He, D., & Wu, K. (2018). AKR1C3, a crucial androgenic enzyme in prostate cancer, promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis through activating ERK signaling. *Urologic Oncology*, *36*(10), 472.e11-472.e20. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2018.07.005>
- Wang, F., Gómez-Sintes, R., & Boya, P. (2018). Lysosomal membrane permeabilization and cell death. *Traffic*, *19*(12), 918–931. <https://doi.org/10.1111/tra.12613>

- Wang, F., Wu, H., Zhang, S., Lu, J., Lu, Y., Zhan, P., Fang, Q., Wang, F., Zhang, X., Xie, C., & Yin, Z. (2019). LAPT_M4B facilitates tumor growth and induces autophagy in hepatocellular carcinoma. *Cancer Management and Research*, *11*, 2485–2497. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S201092>
- Wang, H., Wang, Q., Wu, Y., Lou, J., Zhu, S., & Xu, Y. (2023). Autophagy-related gene LAPT_M4B promotes the progression of renal clear cell carcinoma and is associated with immunity. *Frontiers in Pharmacology*, *14*, 1118217. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1118217>
- Wang, L., Meng, Y., & Zhang, Q.-Y. (2019). LAPT_M4B is a novel diagnostic and prognostic marker for lung adenocarcinoma and associated with mutant EGFR. *BMC Cancer*, *19*(1), 293. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5506-7>
- Wang, L., Wang, Y., & Zhang, Q. (2022). Serum LAPT_M4B as a Potential Diagnostic and Prognostic Biomarker for Breast Cancer. *BioMed Research International*, *2022*, 6786351. <https://doi.org/10.1155/2022/6786351>
- Wang, Y.-H., Lin, C.-C., Yao, C.-Y., Hsu, C.-L., Hou, H.-A., Tsai, C.-H., Chou, W.-C., & Tien, H.-F. (2020). A 4-gene leukemic stem cell score can independently predict the prognosis of myelodysplastic syndrome patients. *Blood Advances*, *4*(4), 644–654. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019001185>
- Wang, Y.-H., Lin, C.-C., Yao, C.-Y., Tsai, C.-H., Hou, H.-A., Chou, W.-C., & Tien, H.-F. (2018). A Leukemic Stem Cell Signature-Based Scoring System for Predicting Prognosis in Myelodysplastic Syndrome Patients. *Blood*, *132*(Supplement 1), 1810. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-110768>
- Wang, Z.-X., Guo, M., Ren, J., Li, G., & Sun, X. (2020). Identification of Lysosome-Associated Protein Transmembrane-4 as a Novel Therapeutic Target for Osteosarcoma Treatment. *Orthopaedic Surgery*, *12*(4), 1253–1260. <https://doi.org/10.1111/os.12692>
- Watanabe, S.-I., & Uchida, T. (1996). Expression of cytidine deaminase in human solid tumors and its regulation by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1312*(2), 99–104. [https://doi.org/10.1016/0167-4889\(96\)00024-9](https://doi.org/10.1016/0167-4889(96)00024-9)
- Wei, X.-F., Feng, Y.-F., Chen, Q.-L., & Zhang, Q.-K. (2018). CDA gene silencing regulated the proliferation and apoptosis of chronic myeloid leukemia K562 cells. *Cancer Cell International*, *18*(1), 96. <https://doi.org/10.1186/s12935-018-0587-y>
- Weissman, I. L. (2000). Stem Cells. *Cell*, *100*(1), 157–168. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81692-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81692-X)
- Welch, J. S., Ley, T. J., Link, D. C., Miller, C. A., Larson, D. E., Koboldt, D. C., Wartman, L. D., Lamprecht, T. L., Liu, F., Xia, J., Kandoth, C., Fulton, R. S., McLellan, M. D., Dooling, D. J., Wallis, J. W., Chen, K., Harris, C. C., Schmidt,

- H. K., Kalicki-Weizer, J. M., ... Wilson, R. K. (2012). The Origin and Evolution of Mutations in Acute Myeloid Leukemia. *Cell*, *150*(2), 264–278. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.023>
- Will, M., Qin, A. C., Toy, W., Yao, Z., Rodrik-Outmezguine, V., Schneider, C., Huang, X., Monian, P., Jiang, X., de Stanchina, E., Baselga, J., Liu, N., Chandarlapaty, S., & Rosen, N. (2014). Rapid Induction of Apoptosis by PI3K Inhibitors Is Dependent upon Their Transient Inhibition of RAS–ERK Signaling. *Cancer Discovery*, *4*(3), 334–347. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0611>
- Winchester, B. G. (2001). Lysosomal membrane proteins. *European Journal of Paediatric Neurology*, *5*, 11–19. <https://doi.org/10.1053/ejpn.2000.0428>
- Wong, P. P., Currie, V. E., Mackey, R. W., Krakoff, I. H., Tan, C. T., Burchenal, J. H., & Young, C. W. (1979). Phase I evaluation of tetrahydrouridine combined with cytosine arabinoside. *Cancer Treatment Reports*, *63*(8), 1245–1249.
- Woods, D., & Turchi, J. J. (2013). Chemotherapy induced DNA damage response. *Cancer Biology and Therapy*, *14*(5), 379–389. <https://doi.org/10.4161/cbt.23761>
- Wu, M., & Zhang, P. (2020). EGFR-mediated autophagy in tumourigenesis and therapeutic resistance. *Cancer Letters*, *469*, 207–216. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.10.030>
- Xiao, M., Jia, S., Wang, H., Wang, J., Huang, Y., & Li, Z. (2013). Overexpression of LAPTM4B: an independent prognostic marker in breast cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, *139*(4), 661–667. <https://doi.org/10.1007/s00432-012-1368-y>
- Xiao, M., Yang, S., Meng, F., Qin, Y., Yang, Y., Jia, S., Cai, X., Li, C., Ning, X., & Huang, Y. (2017). LAPTM4B Predicts Axillary Lymph Node Metastasis in Breast Cancer and Promotes Breast Cancer Cell Aggressiveness in Vitro. *Cellular Physiology and Biochemistry*, *41*(3), 1072–1082. <https://doi.org/10.1159/000464115>
- Xiao, X.-Z., Lin, L.-Y., Zhuang, M.-K., Zhong, C.-M., & Chen, F.-L. (2021). Roles of AKR1C3 in malignancy. *Chinese Medical Journal*, *134*(9), 1052–1054. <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000001379>
- Xie, C.-R., Wang, F., Zhang, S., Wang, F.-Q., Zheng, S., Li, Z., Lv, J., Qi, H.-Q., Fang, Q.-L., Wang, X.-M., & Yin, Z.-Y. (2017). Long Noncoding RNA HCAL Facilitates the Growth and Metastasis of Hepatocellular Carcinoma by Acting as a ceRNA of LAPTM4B. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, *9*, 440–451. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.10.018>
- Xu, H., & Ren, D. (2015). Lysosomal Physiology. *Annual Review of Physiology*, *77*(1), 57–80. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021014-071649>

- Xu, X.-C., Feng, J.-G., & Tang, L.-L. (2021). Lysosomal-associated protein transmembrane-4 beta: a novel potential biomarker for cancer therapy with multiple functions. *Chinese Medical Journal*, *134*(1), 38–40. <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000001021>
- Xu, Y., Liu, Y., Zhou, R., Meng, F., Gao, Y., Yang, S., Li, X., Yang, M., & Lou, G. (2012). LAPTM4B Polymorphisms is Associated with Ovarian Cancer Susceptibility and Its Prognosis. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, *42*(5), 413–419. <https://doi.org/10.1093/jjco/hys026>
- Yamamoto, K., Venida, A., Yano, J., Biancur, D. E., Kakiuchi, M., Gupta, S., Sohn, A. S. W., Mukhopadhyay, S., Lin, E. Y., Parker, S. J., Banh, R. S., Paulo, J. A., Wen, K. W., Debnath, J., Kim, G. E., Mancias, J. D., Fearon, D. T., Perera, R. M., & Kimmelman, A. C. (2020). Autophagy promotes immune evasion of pancreatic cancer by degrading MHC-I. *Nature*, *581*(7806), 100–105. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2229-5>
- Yang, C., & Wang, X. (2021). Lysosome biogenesis: Regulation and functions. *Journal of Cell Biology*, *220*(6), e202102001. <https://doi.org/10.1083/jcb.202102001>
- Yang, H., Xiong, F. X., Lin, M., Yang, Y., Nie, X., & Zhou, R. L. (2010). LAPTM4B-35 overexpression is a risk factor for tumor recurrence and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, *136*(2), 275–281. <https://doi.org/10.1007/s00432-009-0659-4>
- Yang, J., Liu, M., Hong, D., Zeng, M., & Zhang, X. (2021). The Paradoxical Role of Cellular Senescence in Cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*, 2200. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.722205>
- Yang, Y., Yang, H., McNutt, M. A., Xiong, F., Nie, X., Li, L., & Zhou, R. (2008). LAPTM4B overexpression is an independent prognostic marker in ovarian carcinoma. *Oncology Reports*, *20*(5), 1077–1083. https://doi.org/10.3892/or_00000112
- Yates, J. W., Wallace, H. J., Jr, Ellison, R. R., & Holland, J. F. (1973). Cytosine arabinoside (NSC-63878) and daunorubicin (NSC-83142) therapy in acute nonlymphocytic leukemia. *Cancer Chemotherapy Reports*, *57*(4), 485–488. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4586956>
- Ye, F.-G., Song, C.-G., Cao, Z.-G., Xia, C., Chen, D.-N., Chen, L., Li, S., Qiao, F., Ling, H., Yao, L., Hu, X., & Shao, Z.-M. (2015). Cytidine Deaminase Axis Modulated by miR-484 Differentially Regulates Cell Proliferation and Chemoresistance in Breast Cancer. *Cancer Research*, *75*(7), 1504–1515. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-2341>

- Yeung, C. C. S., & Radich, J. (2017). Predicting Chemotherapy Resistance in AML. *Current Hematologic Malignancy Reports*, 12(6), 530–536. <https://doi.org/10.1007/s11899-017-0378-x>
- Yilmaz, M., Kantarjian, H., & Ravandi, F. (2021). Acute promyelocytic leukemia current treatment algorithms. *Blood Cancer Journal*, 11(6), 123. <https://doi.org/10.1038/s41408-021-00514-3>
- Yin, M., Li, C., Li, X., Lou, G., Miao, B., Liu, X., Meng, F., Zhang, H., Chen, X., Sun, M., Ling, Q., & Zhou, R. (2011). Over-expression of LAPTM4B is associated with poor prognosis and chemotherapy resistance in stages III and IV epithelial ovarian cancer. *Journal of Surgical Oncology*, 104(1), 29–36. <https://doi.org/10.1002/jso.21912>
- Yin, M., Lou, C., Zhang, W., Meng, F., Zhang, H., Ning, X., Zhou, R., Dong, X., & Lou, G. (2012). *LAPTM4B* Overexpression is a Novel Independent Prognostic Marker for Metastatic Ovarian Tumors. *International Journal of Gynecologic Cancer*, 22(1), 54–62. <https://doi.org/10.1097/IGC.0b013e318234f9ac>
- Yin, Y., Fan, Y., Yu, G., & Du, Y. (2021). LAPTM4B promotes the progression of bladder cancer by stimulating cell proliferation and invasion. *Oncology Letters*, 22(5), 765. <https://doi.org/10.3892/ol.2021.13026>
- Yoon, Y. H., Cho, K. S., Hwang, J. J., Lee, S.-J., Choi, J. A., & Koh, J.-Y. (2010). Induction of Lysosomal Dilatation, Arrested Autophagy, and Cell Death by Chloroquine in Cultured ARPE-19 Cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 51(11), 6030. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-5278>
- Yusa, K., Oh-hara, T., Tsukahara, S., & Tsuruo, T. (1992). Human immunodeficiency virus type 1 induces 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine resistance in human H9 cell line. *Journal of Biological Chemistry*, 267(24), 16848–16850. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)41861-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)41861-3)
- Yuyama, K., Sun, H., Mikami, D., Mioka, T., Mukai, K., & Igarashi, Y. (2020). Lysosomal-associated transmembrane protein 4B regulates ceramide-induced exosome release. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 34(12), 16022–16033. <https://doi.org/10.1096/FJ.202001599R>
- Zhang, H., Qi, S., Zhang, T., Wang, A., Liu, R., Guo, J., Wang, Y., & Xu, Y. (2015). miR-188-5p inhibits tumour growth and metastasis in prostate cancer by repressing LAPTM4B expression. *Oncotarget*, 6(8), 6092–6104. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3341>
- Zhang, H., Tian, B., Yu, H., Yao, H., & Gao, Z. (2014). LAPTM4B-35 protein as a potential therapeutic target in gastric cancer. *Tumor Biology*, 35(12), 12737–12742. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2599-0>

- Zhang, J., Gu, Y., & Chen, B. (2019). Mechanisms of drug resistance in acute myeloid leukemia. *OncoTargets and Therapy*, *12*, 1937–1945. <https://doi.org/10.2147/OTT.S191621>
- Zhang, M., Zhou, R., Xu, J., & Zhang, Q. (2014). Relationship Between LAPTM4B Gene Polymorphism and Susceptibility of Malignant Melanoma in Chinese Patients. *Translational Oncology*, *7*(5), 638–643. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2014.07.001>
- Zhang, N., Xie, H., Lu, W., Li, F., Li, J., & Guo, Z. (2017). Chloroquine sensitizes hepatocellular carcinoma cells to chemotherapy via blocking autophagy and promoting mitochondrial dysfunction. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, *10*(9), 10056–10065. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31966896>
- Zhang, Y., Chen, H.-X., Zhou, S.-Y., Wang, S.-X., Zheng, K., Xu, D.-D., Liu, Y.-T., Wang, X.-Y., Wang, X., Yan, H.-Z., Zhang, L., Liu, Q.-Y., Chen, W.-Q., & Wang, Y.-F. (2015). Sp1 and c-Myc modulate drug resistance of leukemia stem cells by regulating survivin expression through the ERK-MSK MAPK signaling pathway. *Molecular Cancer*, *14*(1), 56. <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0326-0>
- Zhitomirsky, B., & Assaraf, Y. G. (2016). Lysosomes as mediators of drug resistance in cancer. *Drug Resistance Updates*, *24*, 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2015.11.004>
- Zhitomirsky, B., & Assaraf, Y. G. (2017). Lysosomal accumulation of anticancer drugs triggers lysosomal exocytosis. *Oncotarget*, *8*(28), 45117. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.15155>
- Zhou, K., Dichlberger, A., Ikonen, E., & Blom, T. (2020). Lysosome Associated Protein Transmembrane 4B-24 Is the Predominant Protein Isoform in Human Tissues and Undergoes Rapid, Nutrient-Regulated Turnover. *The American Journal of Pathology*, *190*(10), 2018–2028. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2020.07.003>
- Zhou, K., Dichlberger, A., Martinez-Seara, H., Nyholm, T. K. M., Li, S., Kim, Y. A., Vattulainen, I., Ikonen, E., & Blom, T. (2018). A Ceramide-Regulated Element in the Late Endosomal Protein LAPTM4B Controls Amino Acid Transporter Interaction. *ACS Central Science*, *4*(5), 548–558. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.7b00582>
- Zhou, L., Dai, C., Tian, T., Wang, M., Lin, S., Deng, Y., Xu, P., Hao, Q., Wu, Y., Yang, T., Zhu, W., & Dai, Z. (2018). Prognostic Values of LAPTM4B-35 in Human Cancer: A Meta-analysis. *Journal of Cancer*, *9*(23), 4355–4362. <https://doi.org/10.7150/jca.26902>

- Zhou, L., He, X. D., Yu, J. C., Zhou, R. L., Shan, Y., & Rui, J. A. (2011). Overexpression of LAPTM4B-35 attenuates epirubicin-induced apoptosis of gallbladder carcinoma GBC-SD cells. *Surgery*, *150*(1), 25–31. <https://doi.org/10.1016/J.SURG.2010.12.010>
- Zhou, R. L., Li, M. J., Wei, X. H., Yang, H., Shan, Y., Li, L., & Liu, X. R. (2015). LAPTM4B Targeting as Potential Therapy for Hepatocellular Carcinoma. In H. Abdeldayem, A. El-Shaarawy, & T. Salma (Eds.), *Recent Advances in Liver Diseases and Surgery*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/61345>
- Zhu, H., Li, Q., Liao, T., Yin, X., Chen, Q., Wang, Z., Dai, M., Yi, L., Ge, S., Miao, C., Zeng, W., Qu, L., Ju, Z., Huang, G., Cang, C., & Xiong, W. (2021). Metabolomic profiling of single enlarged lysosomes. *Nature Methods*, *18*(7), 788–798. <https://doi.org/10.1038/s41592-021-01182-8>

8. Anexos

I. Tabla de pacientes de LMA

La **Tabla 9** muestra las características de los pacientes de donde proceden las muestras primarias de LMA incluidas en este trabajo.

LMA	Proc. muestra	Sexo	Edad (años)	Subtipo OMS	BSP (%)	BMO (%)	Cariotipo	Alteraciones moleculares	Riesgo	QR
#1	SP	F	60	LMA con cambios relacionados con mielodisplasia	68	36	48,XX,+8,+21[13]	Ninguna detectada	Int	No
#2	LA	M	48	LMA-NOS	63	81	46,XY[17]	Ninguna detectada	Int	No
#3	LA	F	44	LMA con mutación en <i>NPM1</i>	76	80	N/A	<i>NPM1</i> mut	Fav	No
#4	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
#5	LA	F	63	LMA con mutación en <i>NPM1</i>	100	94	N/A	<i>FLT3</i> -ITD, <i>DNMT3A</i> mut, <i>IDH2</i> mut	Int	No
#6	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
#7	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
#8	SP	M	62	<i>LMA</i> con mutación en <i>RUNX1</i>	49	81	6,XY,del(7)(?) [19]/46,XY[1]	no	Adv	No
#9	LA	M	47	LMA con mutación en <i>NPM1</i>	23	48	Normal	<i>DNMT3A</i> mut, <i>IDH2</i> mut, <i>TP53</i> mut	Adv	No
#10	SP	M	61	N/D	N/D	16	41,X- Y,add(1)(p34),add(2)(p25),-3,- 3,-5,add(6)(p25),-7,- 12,add(16)(q24),-17,-18,- 21,+4mar[cp20]	<i>TP53</i> mut	N/D	N/D

#11	LA	M	37	LMA con inv(16)(p13.1q22); <i>CBFB-MYH11</i>	98	91	47,XY,+9,inv(16)(p13;q22),der(17)t(11;17)(q13;q25)[10]	CEPBA mut, <i>FLT3</i> mut, <i>WT1</i> mut	Fav	No
#12	SP	M	74	LMA NOS con diferenciación monocítica AML	93	65	45,X,-Y[4]/46,X,-Y,+8[2]/46,XY[19]	<i>NRAS</i> mut, <i>ASXL1</i> mut	Int	No
#13	LA	F	21	LMA con t(10;11) y reordenamiento en <i>KMT2A</i>	98	98	46,XX,t(1;20;11')(p36q21;q11.2;q23),t(10;inv(11)(q13q23))(p12;q13)[20]	N/D	Adv	No
#14	LA	M	65	LMA con mutación en <i>NPM1</i>	62	80	46,XY[20]	<i>NPM1</i> mut, <i>FLT3-ITD</i>	Fav	No
#15	SP	M	71	LMA con mutación en <i>NPM1</i>	86	84	No crecimiento	<i>NPM1</i> mut, <i>FLT3-ITD</i>	Int	N/D
#16	SP	M	30	LMA con mutación en <i>NPM1</i>	62	95	No crecimiento	<i>NPM1</i> mut, <i>FLT3-ITD</i> , <i>IDH1</i> mut	Int	No
#17	SP+MO	M	48	LMA NOS sin maduración	95	85	47,XY,+11[13]/46,XY[7]	<i>IDH2</i> mut, <i>DNMT3A</i> mut, <i>NF1</i> mut	Int	Sí
#18	SP+MO	F	15	LMA con cambios relacionados con mielodisplasia	65	65	47,XX,+8[6]/46,XX[12]	<i>FLT3-ITD</i> , <i>WT1</i> mut	Adv	No

Tabla 9. Relación de pacientes de LMA incluidos en los estudios. Clasificación hecha según la clasificación de la OMS (Arber et al., 2016) y según el riesgo citogenético en función de las recomendaciones del 2017 (Döhner et al., 2017). Abreviaturas. Proc. muestra: procedencia de la muestra; BSP (%): porcentaje de blastos en sangre periférica; BMO (%): porcentaje de blastos en médula ósea; QR: quimiorrefractoriedad; MO: médula ósea; SP: sangre periférica; LA: leucoaféresis terapéutica; M: masculino; F: femenino; Adv: adverso; Int: intermedio; Fav: favorable; N/D: sin datos.

II. Publicaciones

1. Cuesta-Casanovas L, **Delgado-Martínez J**, Cornet-Masana JM, Carbó JM, Clément-Demange L, Risueño RM. *Lysosome-mediated chemoresistance in Acute Myeloid Leukemia. Cancer Drug Resistance. Cancer Drug Resist.* 2022 Mar; 5(1):233-244.
2. Carbó JM, Cornet-Masana JM, Cuesta-Casanovas L, **Delgado-Martínez J**, Banús-Mulet A, Clément-Demange L, Serra C, Catena J, Llebaria A, Esteve J, Risueño RM. *A Novel Family of Lysosomotropic Tetracyclic Compounds for Treating Leukemia. Cancers.* 2023; 15(6):1912.
3. Cuesta-Casanovas L, **Delgado-Martínez J**, Cornet-Masana JM, Carbó JM, Banús-Mulet A, Guijarro F, Esteve J, Risueño RM. *Prolactin Receptor signaling induces acquisition of chemoresistance and reduces clonogenicity in Acute Myeloid Leukemia (Under Review)*

Lysosome-mediated chemoresistance in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Drug Resistance*

Cancer Drug Resistance, 2022; 5(1), 233-244. doi: 10.20517/cdr.2021.122

Epub 2022 Mar 14.

Cuesta-Casanovas L, Delgado-Martínez J, Cornet-Masana JM, Carbó JM, Clément-Demange L, Risueño RM.

Abstract

Despite the outstanding advances in understanding the biology underlying the AML pathophysiology and the promising preclinical data published lastly, AML treatment still relies in a classic chemotherapy regimen largely unchanged for the past 5 decades. Recently, new drugs have been approved for AML but the real clinical benefit is still under evaluation. Nevertheless, primary refractory and relapse AML continue to represent the main clinical challenge, as the majority of AML patients will succumb to the disease despite achieving a complete remission during the induction phase. As such, chemoresistance represents an unmet need in this disease. Although great efforts have been made to decipher the biological basis for leukemogenesis, understanding the mechanism by which AML cells become resistant to chemotherapy is largely unknown. The identification of the signaling pathways involved in resistance may lead to new combinatory therapies or new therapeutic approaches suitable for this subset of patients. Several mechanisms of chemoresistance have been identified, including drug transporters, key secondary messengers and metabolic regulators. However, any therapeutic approach targeting chemoresistance has succeeded in clinical trial, especially due to broad secondary effects in healthy cells. Recent research has highlighted the importance of lysosomes in this phenomenon. Lysosomes' key role in resistance to chemotherapy includes the potential to sequester drugs, the central metabolic signaling role and the gene expression regulation. These results provide further evidence to support the development of new therapeutic approaches that target lysosomes in AML.

Cuesta-Casanovas *et al.* *Cancer Drug Resist* 2022;5:233-44
DOI: 10.20517/cdr.2021.122

**Cancer
Drug Resistance**

Review

Open Access



Lysosome-mediated chemoresistance in acute myeloid leukemia

Laia Cuesta-Casanovas^{1,2}, Jennifer Delgado-Martínez^{1,3}, Josep M. Cornet-Masana¹, José M. Carbó⁴, Lise Clément-Demange⁴, Ruth M. Risueño¹

A Novel Family of Lysosomotropic Tetracyclic Compounds for Treating Leukemia.

Cancers. 2023; 15(6):1912. doi: 10.3390/cancers15061912

Epub 2023 Mar 22

Carbó JM, Cornet-Masana JM, Cuesta-Casanovas L, Delgado-Martínez J, Banús-Mulet A, Clément-Demange L, Serra C, Catena J, Llebaria A, Esteve J, Risueño RM.

Abstract

Acute myeloid leukemia (AML) is a heterogeneous hematological cancer characterized by poor prognosis and frequent relapses. Aside from specific mutation-related changes, in AML, the overall function of lysosomes and mitochondria is drastically altered to fulfill the elevated biomass and bioenergetic demands. On the basis of previous results, in silico drug discovery screening was used to identify a new family of lysosome-/mitochondria-targeting compounds. These novel tetracyclic hits, with a cationic amphiphilic structure, specifically eradicate leukemic cells by inducing both mitochondrial damage and apoptosis, and simultaneous lysosomal membrane leakiness. Lysosomal leakiness does not only elicit canonical lysosome-dependent cell death, but also activates the terminal differentiation of AML cells through the Ca^{2+} -TFEB-MYC signaling axis. In addition to being an effective monotherapy, its combination with the chemotherapeutic arsenic trioxide (ATO) used in other types of leukemia is highly synergistic in AML cells, widening the therapeutic window of the treatment. Moreover, the compounds are effective in a wide panel of cancer cell lines and possess adequate pharmacological properties rendering them promising drug candidates for the treatment of AML and other neoplasias.



Article

A Novel Family of Lysosomotropic Tetracyclic Compounds for Treating Leukemia

José M. Carbó ^{1,2,†}, Josep M. Cornet-Masana ^{1,†}, Laia Cuesta-Casanovas ^{1,3}, Jennifer Delgado-Martínez ^{1,4}, Antònia Banús-Mulet ¹, Lise Clément-Demange ², Carme Serra ^{5,6}, Juanlo Catena ^{5,6}, Amadeu Llebaria ⁵, Jordi Esteve ^{1,7,8} and Ruth M. Risueño ^{1,*}

