

Evaluación del efecto de la modulación de la firma génica de mal pronóstico *ID1/ID3/IGJ* en un modelo celular de LLA-B.

José Luis Padilla Agudelo

Trabajo de Grado para Optar el Título de Magíster en Microbiología

Director

José Arturo Gutiérrez Triana

Doctor en Ciencias Naturales

Co-directora

Nataly Cruz Rodríguez

Doctora en Ciencias Biológicas

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Salud

Escuela de Microbiología

Maestría en Microbiología

Bucaramanga

2022

### **Agradecimientos**

El esfuerzo y la dedicación de este trabajo de investigación son un ejemplo y consecuencia de las personas que están detrás. Personas especiales que me acompañaron en esta etapa, aportando a mi formación tanto profesional y humana. Agradezco, a mi familia por haber sido mi apoyo a lo largo de toda mi formación académica y a lo largo de mi vida. De igual manera, quiero agradecer a mis tutores (Arturo Gutiérrez y Nataly Cruz), compañeros de estudio, profesores y personal educativo que fueron los que me acompañaron en cada paso que di.

De igual manera agradecer a la escuela de microbiología, laboratorio clínico y laboratorio de genética de la Universidad Industrial de Santander y la Fundación Cardiovascular de Colombia por permitirme llevar a cabo todos los experimentos.

Por último, pero no menos importante, quiero agradecer a todos aquellos que se involucraron en mi trabajo de investigación (Diego Fernando y Karen Pachón), y todas aquellas personas que me permitieron crear una aportación más al ámbito académico.

*“Una vez que se descarta lo imposible, lo que queda es la verdad, por improbable que parezca”*

Arthur Conan Doyle

**Tabla de Contenido**

	<b>Pág.</b>
<i>Introducción</i> .....	14
<b>1. Planteamiento del problema</b> .....	<b>16</b>
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>22</b>
2.1 <i>Objetivo General</i> .....	22
2.2 <i>Objetivos Específicos</i> .....	22
<b>3. Marco conceptual</b> .....	<b>23</b>
3.1 <i>LLA y su comportamiento a nivel mundial</i> .....	23
3.2 <i>Factores pronósticos de pacientes con LLA</i> .....	24
3.3 <i>Resistencia a la quimioterapia en pacientes con LLA-B</i> .....	25
3.4 <i>Expresión génica asociada al pronóstico de LLA-B</i> .....	27
3.5 <i>Función biológica de los genes ID1, ID3 e IGJ en procesos tumorales</i> .....	28
3.6 <i>Líneas celulares y ADN recombinante como modelo de estudio en la biología del cancer.</i> .....	29
3.7 <i>Alternativas para la integración al genoma celular</i> .....	30
3.8 <i>Sistema CRISPR/Cas9 como herramienta de edición genética</i> .....	30

<b>4. Materiales y Métodos</b> .....	34
<b>4.1 Materiales y métodos para objetivo específico 1</b>	
4.1.1 <i>Líneas Celulares</i> .....	34
4.1.2 <i>Diseño y construcción de plásmidos</i> .....	34
4.1.3 <i>Transformación Bacteriana</i> .....	36
4.1.4 <i>Manipulación de las bacterias experimentales</i> .....	37
4.1.5 <i>Plásmido del sistema transposasa (pST)</i> .....	38
4.1.6 <i>Plásmido del sistema CRISPR (pAAVS1)</i> .....	40
4.1.7 <i>Transfección celular para la integración genómica eucariota</i> .....	41
4.1.7.1 <i>Lipofección de la línea celular HEK293</i> .....	41
4.1.7.2 <i>Electroporación de la línea celular NALM-6 modelo estable</i> .....	42
4.1.7.3 <i>Electroporación de la línea celular NALM-6 modelo transitorio</i> .....	43
4.1.8 <i>Separación de las poblaciones celulares en suspensión por viabilidad</i> .....	43
4.1.9 <i>Análisis de fluorescencia celular</i> .....	44
<b>4.2. Materiales y métodos para objetivo específico 2</b>	
4.2.1. <i>Análisis de expresión génica</i> .....	44
4.2.2. <i>Evaluación de la expresión proteica</i> .....	45
<b>4.3. Materiales y métodos para objetivo específico 3</b>	
4.3.1. <i>Evaluación de la proliferación celular</i> .....	46

4.3.2 Evaluación de la quimiorresistencia.....	47
4.3.3 Análisis estadístico.....	47
<b>5. Resultados.....</b>	<b>48</b>
5.1 Resultados para el objetivo específico 1.....	48
5.1.1 Construcción del constructo para el sistema de integración Tol2-transposasa y CRISPR/Cas9.....	48
5.1.2 Separación de poblaciones celulares por viabilidad en la línea celular NALM-6.....	52
5.1.3 Verificación de los modelos genéticamente modificados con el sistema CRISPR/Cas9 y Tol2-transposasa en las líneas celulares NALM-6 y HEK293.....	53
<b>5.2 Resultados para el objetivo específico 2.....</b>	<b>59</b>
5.2.1 Análisis de qPCR de las líneas celulares HEK293 y NALM-6 modificadas genéticamente con el sistema Tol2-transposasa y CRISPR/Cas9.....	59
5.2.2 Análisis de western Blot de las líneas celulares HEK293 y NALM-6 modificadas genéticamente con el sistema Tol2-transposasa y CRISPR/Cas9.....	61
<b>5.3 Resultados para el objetivo específico 3.....</b>	<b>63</b>
5.3.1 Evaluación de la proliferación celular en los modelos genéticamente modificados con el sistema Tol2-transposasa y CRISPR/Cas9 en la línea celular NALM-6.....	63
5.3.2 Evaluación del efecto de quimiorresistencia en los modelos genéticamente modificados con el sistema Tol2-transposasa y CRISPR/Cas9 en línea celular NALM-6.....	65

<b>6. Discusión.....</b>	<b>73</b>
<b>7. Conclusiones.....</b>	<b>81</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>85</b>
<b>Referencia Bibliográfica.....</b>	<b>89</b>

**Lista de Tablas****Pág.**

<b>Tabla 1.</b> <i>Cebadores utilizados para la construcción de los plásmidos recombinantes del sistema transposasa.....</i>	<i>39</i>
<b>Tabla 2.</b> <i>Cebadores utilizados para la construcción de los plásmidos recombinantes del sistema CRISPR.....</i>	<i>41</i>
<b>Tabla 3.</b> <i>Cebadores utilizados para qPCR de los modelos transfectados-SYBR GREEN.....</i>	<i>46</i>
<b>Tabla 4.</b> <i>Selección de concentración de quimioterapéuticos.....</i>	<i>66</i>

## Lista de Figuras

**Pág.**

<b>Figura 1.</b> Curvas de Kaplan Meier de acuerdo a la presencia o no del perfil de expresión génica de alto riesgo.....	20
<b>Figura 2.</b> Alternativas de edición genética mediada por el Sistema CRISPR/Cas9.....	31
<b>Figura 3.</b> Visualización de cassette de genes del plásmido pUC57 .....	35
<b>Figura 4.</b> Estrategia de clonación de los plásmidos para la generación de líneas transgénicas estables.....	36
<b>Figura 5.</b> Componentes del plásmido pST CMV IFN $\kappa$ 3xployA EF1a GFP 2A puro.....	38
<b>Figura 6.</b> Componentes del plásmido pAAVS1-P-MCS.....	38
<b>Figura 7.</b> Caracterización de los plásmidos diseñados para el sistema Tol2-transposasa usando enzimas de restricción.....	49
<b>Figura 8.</b> Caracterización de los plásmidos diseñados para el sistema constructo de recombinación homóloga usando enzimas de restricción.....	51
<b>Figura 9.</b> Selección por Optiprep de modelos transfectados con sistema Tol2-transposasa y CRISPR/cas9 para la línea celular NALM-6.....	52
<b>Figura 10.</b> Evaluación de la selección con puromicina en modelos no integrados con CRISPR/Cas9.....	54
<b>Figura 11.</b> Verificación por microscopio de fluorescencia de modelos HEK293 modificados genéticamente con sistema Tol2-transposasa.....	55
<b>Figura 12.</b> Verificación por citometría de flujo de modelos NALM-6 modificados genéticamente con sistema Tol2-transposasa.....	56

<b>Figura 13.</b> Evaluación de la presencia de los transgenes a nivel de ADN genómico en líneas modificadas genéticamente NALM-6 con los sistemas Tol2-transposasa y CRISPR/Cas9.....	57
<b>Figura 14.</b> Verificación de los cambios en los niveles de expresión para líneas modificadas genéticamente HEK293.....	59
<b>Figura 15.</b> Verificación de los cambios en los niveles de expresión para líneas modificadas genéticamente NALM-6.....	61
<b>Figura 16.</b> Expresión proteica de las líneas modificadas genéticamente HEK293 y NALM-6.....	62
<b>Figura 17.</b> Evaluación de proliferación celular usando diferentes concentraciones de células.....	63
<b>Figura 18.</b> Comparación de la línea con sobreexpresión del gen <i>ID1</i> con la línea sin modificación genética.....	65
<b>Figura 19.</b> Comparación de la línea con sobreexpresión del gen <i>ID1</i> con la línea sin modificación genética a diferentes concentraciones del quimioterapéutico Citarabina.....	67
<b>Figura 20.</b> Comparación de la línea con sobreexpresión del gen <i>ID1</i> con la línea sin modificación genética a diferentes concentraciones del quimioterapéutico Metotrexato.....	68
<b>Figura 21.</b> Comparación de la línea con sobreexpresión del gen <i>ID1</i> con la línea sin modificación genética a diferentes concentraciones del quimioterapéutico Doxorubicina.....	69
<b>Figura 22.</b> . Comparación de la línea con sobreexpresión del gen <i>ID1</i> con la línea sin modificación genética a diferentes concentraciones del quimioterapéutico Dexametasona.....	70
<b>Figura 23.</b> Comparación de la línea con sobreexpresión del gen <i>ID1</i> con la línea sin modificación genética a diferentes concentraciones del quimioterapéutico Ciclofosfamida.....	71

<b>Figura suplementaria 1.</b> Verificación de los cambios en los niveles de expresión para líneas modificadas genéticamente NALM-6 con expresión transitoria del gen <i>ID1</i> .....	87
<b>Figura suplementaria 2.</b> Verificación de los cambios en los niveles de expresión para líneas modificadas genéticamente NALM-6 con expresión transitoria del gen <i>ID3</i> .....	87
<b>Figura suplementaria 3.</b> Verificación de los cambios en los niveles de expresión para líneas modificadas genéticamente NALM-6 con expresión transitoria del gen <i>IGJ</i> .....	88
<b>Figura suplementaria 4.</b> Evaluación de episomas en línea NALM-6 modificada con el sistema Tol2-Tranposasa.....	89

## Resumen

**Título:** Evaluación del efecto de la modulación de la firma génica de mal pronóstico *ID1/ID3/IGJ* en un modelo celular de LLA-B.\*

**Autor:** José L. Padilla-Agudelo, José Arturo Gutiérrez Triana, Nataly Cruz Rodríguez\*\*

**Palabras Clave:** LLA-B; NALM-6; Sistemas de edición genética; CRISPR/Cas9; sistema transposasa.

La Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) es una neoplasia hematológica con una alta incidencia en Colombia, con bajas tasas de respuesta al tratamiento y curación comparado con otros países (Allemani et al., 2018). Actualmente en Colombia existe escasa información de las características moleculares de la LLA, y de los posibles mecanismos en la población Colombiana que podrían estar influyendo en la respuesta del tratamiento.

Estudios previos realizados por nuestra línea de investigación, en pacientes adultos colombianos con LLA-B identificaron, por primera vez un perfil de expresión génica diferencial entre pacientes respondedores y no respondedores al tratamiento quimioterapéutico de inducción. Este perfil se caracterizó por una elevada expresión simultánea de los genes *ID1* (*DNA-binding protein inhibitor 1*), *ID3* (*DNA binding protein inhibitor 3*) e *IGJ* (*Immunoglobulin J polypeptide*). Genes que están implicados en diversos procesos tumorales (Cruz-Rodriguez et al., 2016a). Sin embargo, se desconoce el posible mecanismo en cómo estos genes están involucrados en el desenlace clínico y la baja respuesta al tratamiento en pacientes colombianos. Con el propósito de evaluar el posible mecanismo e importancia de estos genes en el desarrollo de pacientes colombianos con LLA, desarrollamos la modificación genética de la línea de leucemia linfoblástica aguda NALM-6 utilizando los sistemas CRISPR-Cas9 y Tol2-transposasa. Lo anterior, con el objetivo de sobreexpresar cada uno de los genes de la firma génica (*ID1*, *ID3* e *IGJ*) y evaluar las posibles alteraciones en la división celular y la resistencia a agentes quimioterapéuticos empleados rutinariamente en el tratamiento de LLA.

Al analizar la expresión génica mediante la técnica RT-qPCR utilizando las líneas estables NALM-6 encontramos que la sobreexpresión no se presentó en todos los modelos transfectados, sin embargo, se evidenció que los cambios en los niveles de expresión génica se pueden lograr mediante otros sistemas de expresión; lo cual nos llevó a inferir una relación interespecífica entre estos genes. Así mismo, mediante la técnica de *western blot* descubrimos que los transgenes no se expresan a

---

\* Trabajo de Grado

\*\* Facultad de Salud. Escuela de Microbiología. Director: José Arturo Gutiérrez Triana. Doctor en Ciencias Naturales. Codirectora: Nataly Cruz Rodríguez. Doctora en Ciencias Biológicas

nivel de proteína, independientemente del sistema de integración usado, a diferencia de las células HEK293 utilizadas como control.

Por lo anterior, proponemos un posible mecanismo epigenético independiente del transgén que podría estar relacionada con el promotor de citomegalovirus. Adicionalmente, la evaluación de quimiorresistencia y proliferación se llevada a cabo en la línea estable pST-ID1, evidenció diferentes comportamientos de tasa de división y resistencia respecto a la línea celular sin modificación genética.

---

\* Trabajo de Grado

\*\* Facultad de Salud. Escuela de Microbiología. Director: José Arturo Gutiérrez Triana. Doctor en Ciencias Naturales. Codirectora: Nataly Cruz Rodríguez. Doctora en Ciencias Biológicas

### Abstract

**Title:** Evaluation of the effect of modulation of the poor prognosis gene signature *ID1/ID3/IGJ* in a cellular model of B-ALL.

**Author:** José L. Padilla-Agudelo, José Arturo Gutiérrez Triana, Nataly Cruz Rodríguez\*\*.

**Keywords:** ALL-B; NALM-6; Gene editing systems; CRISPR/Cas9; transposase system.

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a hematological neoplasm with a high incidence in Colombia, lower treatment response and cure rates compared to other countries (Allemani et al., 2018). Currently, our country has scarce information about the molecular characteristics of the disease, so the specific mechanisms influencing treatment response to the population are unknown.

Previous studies of our research group, carried out on Colombian adult patients with B-ALL identified, for the first time, a differential gene expression profile between responders and non-responders to induction chemotherapy treatment. This profile was characterized by the high simultaneous expression of *ID1* (DNA-binding protein inhibitor 1), *ID3* (DNA binding protein inhibitor 3) and *IGJ* (Immunoglobulin J polypeptide) genes, which have been reported to be overexpressed in different kind of tumors (Cruz-Rodriguez et al., 2016a). It is unknown whether these genes are mechanistically involved in the clinical outcome and low response to treatment in Colombian patients.

To evaluate this possibility, in the present work we report the genetic modification of the Acute Lymphoblastic Leukemia line NALM-6, by means of CRISPR/Cas9 and Tol2-transposase system, with the aim of overexpressing each of the genes of the gene signature and evaluate the alterations in proliferations and resistance to chemotherapeutic agents routinely used in the treatment of patients with ALL.

When analyzing gene expression by RT-qPCR in the stable NALM-6 modified lines, we found that overexpression is not present in all transfected models; however, it is evident that changes in gene expression levels can be achieved by other expression systems and a complex interspecific relationship between them, in particular *ID1* and *IGJ*, is observed. Likewise, by western blot assays we found that the transgenes are not detected at the protein level, regardless of the integration system used, in contrast to the HEK293 control cells.

We propose a transgene-independent epigenetic mechanism possibly related to the cytomegalovirus promoter. However, the evaluation of chemoresistance and proliferation was carried out in the stable line pST-*ID1* line where we found a low proliferation rate and a variable resistance to dexamethasone and cyclophosphamide.

---

\* Degree work

\*\* Faculty of Health. School of Microbiology. Director. José Arturo Gutiérrez Triana. Doctor in Natural Sciences. Co-director: Nataly Cruz Rodríguez. Doctor in Biological Sciences.

## Introducción

La Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) es una neoplasia hematológica, con una tasa de incidencia de 2,12 por 100.000 habitantes en Colombia, y una tasa de mortalidad de 2,7 por 100.000 habitantes en el departamento de Santander (Gacha Garay et al., 2017; Instituto Nacional de cancerología, 2018). En el estudio de la biología de las células tumorales, se reconoce que los diversos cambios oncogénicos (rearrreglos cromosómicos, lesiones moleculares, entre otros) que sufren las células tumorales les confieren mecanismos de resistencia a la quimioterapia convencional que pueden representar un incremento en las tasas de mortalidad y/o el aumento de recaídas en los pacientes que padecen esta enfermedad (Bacher et al., 2010).

La estratificación pronóstica se realiza con base en factores clínicos como la edad y recuento de leucocitos, la enfermedad mínima residual (EMR) y la presencia de rearrreglos cromosómicos, estos últimos son los que predicen con mayor precisión la respuesta al tratamiento y la duración de la remisión (Arber et al., 2016; Chiaretti et al., 2014; X. Zhang et al., 2017). Sin embargo, aproximadamente el 50 % de los pacientes no presentan dichas alteraciones cromosómicas (Inaba et al., 2013). Una mejor caracterización biológica de las células tumorales podría ayudar a identificar características propias de la población de pacientes colombianos, identificar de los mecanismos de resistencia de las células tumorales para la estratificación del riesgo al momento del diagnóstico y sugerir la aplicación de estrategias terapéuticas personalizadas.

Teniendo en cuenta que en Colombia el comportamiento de la LLA presenta diferencias en comparación con otros países, es necesario fortalecer la investigación básica y preclínica para entender los aspectos biológicos y moleculares subyacentes a la enfermedad en pro de identificar patrones

asociados al comportamiento individual y de esta manera, a largo plazo poder sugerir potenciales terapias personalizadas ajustadas al riesgo de cada paciente con LLA (Gacha Garay et al., 2017).

En estudios previos realizados por nuestra línea de investigación en pacientes adultos colombianos con LLA de precursores B (LLA-B), se identificó por primera vez un perfil de expresión génica diferencial entre pacientes respondedores y no respondedores al tratamiento quimioterapéutico de inducción. Este perfil estuvo, caracterizado por la expresión alterada de los genes *ID1*, *ID3* e *IGJ* (Cruz-Rodriguez et al., 2016a). Sin embargo, aún no se ha determinado la relevancia de estos resultados particulares en la biología y quimiorresistencia de la LLA, por lo cual una mejor comprensión del efecto biológico de estos genes podría permitir desarrollar nuevas estrategias de estratificación y proponer o identificar posiblemente nuevos blancos moleculares que puedan permitir el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas específicas para los pacientes Colombianos de LLA.

Aun cuando los modelos animales siguen siendo el estándar de oro para la investigación de terapias previamente a los antes de los ensayos clínicos, los altos costos del mantenimiento y los extensos tiempos de generación ralentizan los avances necesarios para probar hipótesis relacionadas con tumores resistentes y enfermedades recurrentes (Slone et al., 2016).

Los modelos preclínicos más utilizados para estudiar la biología del cáncer y para probar la eficacia de los tratamientos siguen siendo las líneas celulares derivadas de cánceres humanos. Este modelo *in vitro*, además de su fácil obtención, ofrece facilidades de mantenimiento y manipulación por lo cual se utiliza con frecuencia. Las líneas celulares poseen marcadores morfológicos y bioquímicos similares a las células primarias del cáncer y representan un suministro ilimitado de material lo que implica contar con una población celular uniforme que permite obtener resultados consistentes y reproducibles (Gacha Garay et al., 2017; Morgan et al., 2016), además conllevan menores

implicaciones éticas para su uso y ofrecen la posibilidad de servir como plataforma para la manipulación génica (Gillet et al., 2013). Adicionalmente, la tecnología del ADN recombinante ha permitido la comprensión de la biología celular del cáncer mediante la manipulación genética de diversos modelos celulares (Adachi, 2010; Kaufman, 2000).

Es por todo esto que esta propuesta propuso generar líneas celulares transgénicas de un modelo de Leucemia LLA-B, NALM-6, con la expresión por separado de los genes de la firma asociada con mal pronóstico (*ID1/ID3/IGJ*). Esto con el propósito de evaluar la expresión de estos genes para tratar de entender y describir el efecto en diferentes procesos biológicos, como la proliferación celular y su posible efecto en la resistencia hacia agentes quimioterapéuticos rutinariamente empleados en la clínica de los pacientes con LLA-B.

## 1. Planteamiento del problema

La LLA es una neoplasia de la médula ósea, que se puede presentar tanto en niños como en adultos. La situación de las leucemias en niños y en adultos constituye un problema de interés en salud pública debido a que la LLA representa la neoplasia maligna infantil más común, pues constituye el 80 % de todas las leucemias en niños (Terwilliger & Abdul-Hay, 2017). La incidencia de LLA tiene dos picos, alcanzando su punto máximo en los niños de 1 a 4 años y aumenta gradualmente en los adultos mayores de 50 años (Katz et al., 2015).

La LLA presenta una mayor incidencia en países de los continentes de América y Oceanía y una menor incidencia en países de Asia y Europa del Este (Katz et al., 2015). En América Latina, la principal causa de muerte relacionada con cáncer en adolescentes y adultos jóvenes (grupo de edad 15-

24 años) es la leucemia (Curado et al., 2011). La incidencia de la LLA en adultos es notablemente mayor en Ecuador, Costa Rica y Colombia (Miranda-Filho et al., 2018). Las tasas de curación de LLA en Colombia contrastan significativamente con lo reportado a nivel mundial. Se ha reportado que las tasas de curación a cinco años de pacientes pediátricos colombianos es del 68,9 % (Curado et al., 2011; Gómez-Mercado et al., 2020), y en adultos es del 30-40% (Allemani et al., 2015)

En países desarrollados, la mortalidad por leucemia ha disminuido durante en los últimos 30 años. En países Europeos y en Estados Unidos se ha reportado una mejoría de hasta el 89,5 % en la tasa de supervivencia a cinco años en pacientes pediátricos con LLA, debido a sus eficaces estrategias de atención (Allemani et al., 2018).

Este progreso se debe principalmente a las modificaciones en la terapia basadas en la farmacodinámica y farmacogenómica individual de los pacientes, la terapia adaptada al riesgo y al mejoramiento del acceso a los tratamientos (Lustosa de Sousa et al., 2015). Sin embargo, la situación en Colombia sigue mostrando un panorama desalentador (Combariza et al., 2007; Gacha Garay et al., 2017) . Las causas por las cuales en Colombia no se ha podido lograr las tasas de supervivencia de otros países son múltiples, entre ellas, las precarias condiciones socioculturales, barreras de acceso, la falta de un tratamiento adecuado y oportuno (Gómez-Mercado et al., 2020). Adicionalmente, también deberse a cambios propios de la enfermedad, a un aumento en el contacto de la población con factores asociados al desarrollo de la misma o incluso a modificaciones genéticas asociadas a la población colombiana (Cruz-Rubio et al., 2020; Kirtane & Lee, 2017).

Diversos estudios han reportado la existencia de componentes genéticos propios de los grupos poblacionales, que influyen en la supervivencia de LLA. Por ejemplo, se ha descrito una menor supervivencia en los afroamericanos e hispanos en comparación con los europeos o asiáticos (Bhatia et al., 2002; Pollyea et al., 2014). En pacientes pediátricos de los Estados Unidos se ha reportado que

los niños hispanos con LLA tienen peores resultados que los niños blancos no hispanos cuando reciben tratamiento convencional, lo cual sugiere que la terapia de estos pacientes se debe ajustar con base a sus características individuales (Hunger & Mullighan, 2015; Koutsi & Vervesou, 2018).

Los nuevos avances en la última década han proporcionado un mayor entendimiento sobre los procesos biológicos celulares y moleculares que rigen la supervivencia y muerte de las células tumorales. Así mismo, estos avances han permitido el diseño racional de nuevos medicamentos que han logrado conferir una disminución en las tasas de mortalidad y/o recaídas en los pacientes que padecen esta enfermedad (Franquiz & Short, 2020; X. Zhang et al., 2017).

Algunas características identificadas como responsables de conferir un pronóstico desfavorable son hipodiploidía menor a 44 cromosomas, la translocación *BCR-ABL*, mutaciones en la secuencia codificante del gen *PAX5* (Mullighan et al., 2007), modificadores epigenéticos como *EZH2* y *SETD2* (J. Zhang et al., 2011) y la sobreexpresión de receptores de citosinas y tirosinas quinasas como *JAK2* y *CRLF2* (Hunger & Mullighan, 2015). Estas características genéticas son importantes en el inicio de la leucemia, pero por sí solas son insuficientes para generar el fenotipo leucémico completo, lo que indica que se requieren lesiones oncogénicas sinérgicas para que las células leucémicas adquieran características de auto-renovación y proliferación (Mullighan, 2012).

El uso de técnicas moleculares ha ayudado a desenmascarar nuevas alteraciones en LLA que pueden conducir a la activación aberrante de vías metabólicas y a la supervivencia celular mediante vías de señalización como Ras, JAK-STAT, MAP quinasas, TP53/RB1, entre otras (Paul et al., 2016; J. Zhang et al., 2011).

Actualmente Colombia posee información escasa acerca del comportamiento molecular de la enfermedad y no se cuenta con datos consolidados o un registro estandarizado del panorama completo de la situación de la LLA (Gacha Garay et al., 2017). A pesar de los estudios realizados, la mayoría de

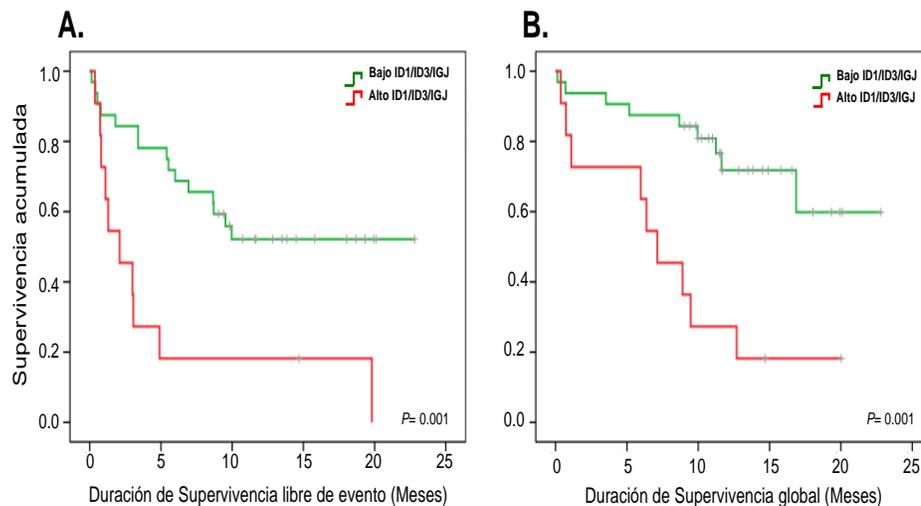
investigaciones en Colombia se han centrado en estudios epidemiológicos y clínicos basados en las características celulares de otras poblaciones, mientras que muy pocos estudios se han realizado sobre la biología y en el comportamiento de la enfermedad (Gacha Garay et al., 2017). El desarrollo de resistencia tanto a las quimioterapias como a los agentes específicos es muy frecuente en la práctica clínica y es una causa importante de mortalidad (Pauli et al., 2017).

Teniendo en cuenta lo anterior, se planteó la hipótesis de que los pacientes con LLA colombianos podrían tener características biológicas que los hacen propensos a tener un peor pronóstico y una baja respuesta al tratamiento. En estudios previos de nuestra línea de investigación se realizó un estudio transcriptómico en pacientes adultos colombianos con LLA-B, y se encontró un perfil de expresión génica diferencial entre pacientes que respondían y los que no al tratamiento quimioterapéutico de inducción (**Figura 1**) (Cruz-Rodriguez et al., 2016b). Este perfil se caracterizó por el aumento estadísticamente significativo en la expresión simultánea de los genes *ID1* (*DNA-binding protein inhibitor 1*), *ID3* (*DNA binding protein inhibitor 3*) e *IGJ* (*Immunoglobulin J polypeptide*), los cuales han sido relacionados con procesos reguladores de diferenciación, apoptosis, supervivencia y autorrenovación de células tumorales (Gadomski et al., 2020; Lee et al., 2003).

Además, en nuestro estudio la firma génica *ID1/ID3/IGJ* se relacionó con características clínicas asociadas a un peor pronóstico que incluyen elevados recuentos de leucocitos, mayor carga tumoral, mayor edad, menor supervivencia global (SG) y SLE, mostrando ser una variable independiente con un mayor valor predictivo del desenlace clínico que las demás variables convencionales empleadas actualmente (Cruz-Rodriguez et al., 2016<sup>a</sup>, 2017).

**Figura 1.**

Curvas de Kaplan Meier de acuerdo con la presencia o no del perfil de expresión génica de alto riesgo. Supervivencia libre de evento (A) y supervivencia global (B) de los pacientes con baja expresión simultánea de *ID1/ID3/IGJ* (línea verde) vs pacientes con alta expresión simultánea de *ID1/ID3/IGJ* (línea roja).



Tomada de: Cruz-Rodríguez, N. et al., 2016.

Se propone que este perfil particular de expresión génica pueda tener valor pronóstico, independientemente de si tienen reordenamientos cromosómicos o no, ya que aproximadamente el 50 % de los adultos con LLA-B no tienen reordenamientos cromosómicos (Inaba et al., 2013) y por lo tanto, se clasifican como grupo de riesgo estándar con características pronosticas favorables pero en su mayoría experimentan fracaso al tratamiento, recaída y/o muerte durante el curso de su enfermedad.

Aunque todavía no es claro cómo influyen los genes *ID1*, *ID3* e *IGJ* en la biología y quimiorresistencia específica de las células de LLA-B, se ha reportado que los genes *ID* tienen un

papel directo en el inicio, mantenimiento, progresión y quimiorresistencia en otros modelos de cáncer como: mama, cerebro, colorrectal, próstata, ovario, hígado y páncreas (Sharma et al., 2012).

A diferencia de los genes *ID*, el gen *IGJ* ha sido poco explorado y lo que se conoce, es que su expresión es requerida para la formación de la Inmunoglobulina M e Inmunoglobulina A ya que permite la polimerización de los monómeros para unir el pentámero y dímero, respectivamente. El gen *IGJ* se encuentra expresado en las células plasmáticas diferenciadas, pero se desconoce su relevancia funcional en linfoblastos tumorales de la LLA-B (Ayala et al., 2020).

Lo anteriormente descrito justifica la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas relevantes para los pacientes Colombianos (Cruz-Rodriguez et al., 2017). Teniendo en cuenta que se desconoce si la firma génica tiene alguna relación causal con las características de alto riesgo, esta propuesta pretende evaluar el efecto del incremento de la expresión de los genes *ID1*, *ID3* e *IGJ* en la proliferación y quimiorresistencia de un modelo celular leucémico, haciendo uso de las tecnologías de ADN recombinante.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo general

Determinar el efecto del aumento de la expresión de los genes de la firma asociada con mal pronóstico (*ID1/ID3/IGJ*) en un modelo celular de LLA-B.

### 2.2 Objetivos específicos

- Generar líneas celulares de LLA-B mediante la integración genómica, vía CRISPR/Cas9 y sistema Tol2-transposasa, de copias supernumerarias de los genes *ID1*, *ID3* e *IGJ* de manera individual en el genoma de una célula eucariota.
- Verificar la expresión proteica y los cambios en la expresión de los genes *ID1*, *ID3*, *IGJ* en las líneas celulares de LLA-B.
- Determinar los efectos de la alteración en la expresión de los genes *ID1*, *ID3* e *IGJ* en la proliferación y quimiorresistencia en un modelo celular de LLA-B.

### 3. Marco conceptual

#### 3.1 LLA y su comportamiento clínico a nivel mundial

La LLA es una neoplasia de la médula ósea en el que los linfoblastos precursores son bloqueados en una etapa temprana de diferenciación, proliferan rápidamente y suplantán las células hematopoyéticas normales de la médula ósea (Vera et al., 2012). El uso de esquemas de quimioterapia combinada para el tratamiento de LLA se considera como una historia exitosa de cáncer en el entorno pediátrico, que ha mejorado de manera impresionante durante las últimas cuatro décadas (Pieters & Den Boer, 2003; Wojtuszkiewicz et al., 2015) y ha ofrecido a los pacientes que alguna vez tuvieron un pronóstico sombrío, una tasa de curación cerca del 90 % a nivel mundial. Para los adultos, no se ha logrado el mismo éxito utilizando estrategias similares, a pesar de que las tasas de remisión completa (RC) son en general por encima del 85 %, la supervivencia global a tres años continúa siendo alrededor del 35 % (Paul et al., 2016; Ramos-Peñafiel et al., 2016).

Recientemente nuestro grupo de investigación publicó los resultados del análisis del perfil de expresión génica en una cohorte de pacientes adultos con LLA-B y logró determinar cómo una firma específica de expresión génica es un determinante independiente del pronóstico. El perfil de expresión estaba compuesto por los genes *ID1*, *ID3* e *IGJ* (Cruz-Rodríguez et al., 2016a), lo que sugeriría que estos genes pueden estar involucrados en los procesos de resistencia al tratamiento. En estudios posteriores demostraron una correlación de esta firma génica con marcadores inmunofenotípicos, y se propone la identificación de dicha firma para una mejor estratificación de los pacientes colombianos (Cruz-Rodríguez et al., 2017).

Estos datos sugieren que los resultados negativos al tratamiento en nuestras poblaciones tienen razones de orden biológico y no solamente social o de acceso a la atención en salud (Cruz-Rodriguez et al., 2016a, 2017; Enciso Olivera, 2016). En la actualidad el abordaje de los pacientes con LLA no requiere solamente quimioterapia sino una mejor comprensión de la biología de la enfermedad ya que la generación de nuevos conocimientos ha llevado a cambios en la clasificación patológica, generando nuevas opciones de tratamiento y objetivos para guiar la terapia adaptada al riesgo (Hunger & Mullighan, 2015; Ravandi et al., 2007).

### **3.2 Factores pronósticos de pacientes con LLA**

El establecimiento del pronóstico de los pacientes con LLA es complejo, pero la estratificación precisa del riesgo es fundamental para garantizar que los pacientes con LLA de alto riesgo reciban un tratamiento de intensidad adecuada y evitar que los pacientes de bajo riesgo sufran de efectos tóxicos innecesarios (Mullighan, Su, et al., 2009). Tradicionalmente, la estratificación del riesgo se ha basado en: factores clínicos (la edad, el recuento de leucocitos en el momento de diagnóstico y la infiltración en el sistema nervioso central de células tumorales), variables moleculares y biológicas de las células tumorales como el inmunofenotipo, citogenética, translocaciones cromosómicas y últimamente la detección de EMR para evaluar la respuesta al tratamiento de inducción (Gómez-Mercado et al., 2020; Vizcaíno et al., 2016).

La identificación de alteraciones genéticas recurrentes ha ayudado a refinar el pronóstico individual y guiar el manejo (Martinez & Misnaza, 2018; Terwilliger & Abdul-Hay, 2017). Algunas de estas lesiones genéticas están asociadas a la respuesta al tratamiento y permiten identificar a los pacientes que tendrán un desenlace favorable, intermedio o desfavorable (Mrózek et al., 2009; Mullighan, 2012; X. Zhang et al., 2017). Estas lesiones incluyen  $t(1;19)(q23;p13)$ ,  $t(12;21)(p13;q22)$ ,

t(4;11) (q21;q23), rearrreglos en el gen MLL en el cromosoma 11q23, cariotipo hipodiploide o hiperdiploide con más de 50 cromosomas y particularmente un peor pronóstico de la enfermedad se ha asociado con la t(9;22) (q34;q11) (Mullighan, 2012; X. Zhang et al., 2017). De esta manera, las alteraciones cromosómicas representan una de las variables que mejor determinan el pronóstico de la enfermedad. Sin embargo, se ha descrito que los pacientes en este grupo de riesgo, tienen una respuesta y desenlace clínico muy heterogéneo, lo que lleva a pensar que existe la necesidad de identificar nuevas variables biológicas que permitan realizar una correcta estratificación del riesgo independientemente de la presencia de alteraciones cromosómicas.

### **3.3 Resistencia a la quimioterapia en pacientes con LLA-B**

Múltiples fármacos se suministran en secuencias específicas de esquemas de intensidad de dosis y tiempo, con el objetivo de reconstituir la hematopoyesis normal, prevenir la aparición de clones resistentes, proporcionar una profilaxis adecuada y eliminar la EMR a través de la consolidación y mantenimiento posterior a la remisión (Campana, 2009; Fullmer et al., 2009; Mullighan, Zhang, et al., 2009; Paul et al., 2016). A pesar de la incorporación a la quimioterapia de fármacos innovadores altamente dirigidos (dasatinib, nilotinib, rituximab, entre otros), la tasa de recaída es de alrededor del 50 % durante el primer año de tratamiento, siendo en su mayoría asociadas a alteraciones citogenéticas específicas de mal pronóstico o a la falta de respuesta durante las primeras 4 semanas de reinducción (Ramos-Peñafiel et al., 2016).

La resistencia a los medicamentos es uno de los determinantes más importantes de la respuesta a la quimioterapia y su detección es de valor clínico (Styczynski et al., 2007). Existen reportes donde la resistencia a los medicamentos de células leucémicas de pacientes, evaluadas *in vitro* en el diagnóstico inicial y la presencia de EMR en el curso del tratamiento ha demostrado ser factores

pronósticos independientes en LLA pediátrica (Pieters & Den Boer, 2003). En ese mismo grupo, se ha encontrado que la proliferación celular en leucemia aguda se correlaciona con la resistencia a los medicamentos *in vitro* (Kaaijk et al., 2003).

Hasta hace algunas décadas, la resistencia estaba asociada a la sobre-expresión de la P-glicoproteína, una ATPasa transmembrana, producto del gen *MDR1* (*P-170*, *P-pP*), ahora conocida como un miembro de la superfamilia de transportadores ATP-binding cassette (ABC) (Nørgaard et al., 2004). Las proteínas PGP, MRP y LRP disminuyen la concentración del fármaco intracelular y se ha encontrado en muestras de LLA pediátricas en las que su co-expresión muestra una mayor resistencia a los glucocorticoides, epirrubicina, mitoxantrona, tiopurinas, cladribina y oxazafosforinas (Kaaijk et al., 2003; Meyer et al., 2020; Styczynski et al., 2007) .

Se han descubierto otros mecanismos como causa de resistencia a fármacos en leucemias, por ejemplo las alteraciones *IKZF1* (Factor de transcripción *IKAROS*) (Mullighan, Su, et al., 2009), mecanismos de desintoxicación mediante enzimas como glutatión S-transferasa, disminución o alteración de la actividad de la ADN topoisomerasa II, alteración del ciclo celular (proteínas Bcl-2 y p53 que influyen en el proceso de apoptosis) (Nørgaard et al., 2004) y la regulación negativa de las dianas biológicas de los medicamentos. Recientemente se ha planteado que el fenotipo y características de las células madre del cáncer como las posibles responsables de la recurrencia de la enfermedad (Nishida et al., 2009).

Adicional a los mecanismos de resistencia anteriormente expuestos, se ha descrito que las células tumorales logran evadir los procesos de muerte celular (los cuales están regulados en su mayoría por la mitocondria) y logran sobrevivir en microambientes con condiciones extremas logrando la inmortalidad posiblemente mediante el desarrollo de estrategias metabólicas para suprimir la función mitocondrial, por ejemplo, se ha evidenciado que la resistencia a las antraciclinas en las células LLA

se asocia con una disminución de la despolarización de las membranas mitocondriales (Pieters & Den Boer, 2003).

### 3.4 Expresión génica asociada al pronóstico de LLA-B

Gracias al desarrollo de técnicas que permiten la evaluación de la expresión génica global, se han generado nuevos conocimientos sobre los genomas y transcriptomas de LLA y las bases biológicas de la resistencia a los medicamentos (Den Boer et al., 2009). Ensayos que predicen la respuesta al imatinib y otros compuestos demuestran el potencial de la tecnología de microarreglos para personalizar el tratamiento en pacientes con neoplasias hematológicas (Sridhar et al., 2019; Tallman, 2006).

El empleo de perfiles de expresión génica ha permitido la identificación de lesiones genéticas relacionadas con un mal pronóstico en pacientes de LLA-B. Estudios en la población infantil demuestran que la alteración del factor de transcripción linfoide *IKZF1* y cierto tipo de mutaciones en los genes que codifican para los receptores de tirosina quinasa se asocian con un mal pronóstico y proporcionan información sobre cómo estas lesiones contribuyen a la leucemogénesis y la resistencia al tratamiento (Kang et al., 2010; Mullighan, Zhang, et al., 2009).

Es importante destacar que los genes afectados con mayor frecuencia son aquellos que controlan la progresión del ciclo celular (por ejemplo, *CDKN2A*, *CDKN1B* y *RBI*), seguidos por genes asociados con el desarrollo de células B. Este último grupo incluye microdeleciones de los factores de transcripción del linaje B, como *PAX5*, *EBF*, *E2-2* e *IKZF1* (Mullighan, Su, et al., 2009), así como genes con otros roles establecidos en desarrollo de células B, tales como *RAG1* y *RAG2*, *FYN*, *PBEF1* o *CBP/PAG* (Kuiper et al., 2007).

### 3.5 Función biológica de los genes *ID1*, *ID3* e *IGJ* en procesos tumorales de LLA

Los genes *ID1* e *ID3* pertenecen a la familia de genes que codifican para las proteínas ID ( Inhibitor of DNA binding), proteínas tipo hélice-bucle-hélice que inhiben la unión de factores de transcripción tipo bHLH (hélice-bucle-hélice básicas) al ADN, participando en la regulación de la diferenciación celular y la estabilidad cromosómica (Roschger & Cabrele, 2017). La capacidad de las proteínas *ID* para funcionar como "centros" para la coordinación de múltiples características distintivas del cáncer como es el aumento de la proliferación celular y multipotencia, ha establecido estos reguladores transcripcionales como objetivos terapéuticos y biomarcadores en tipos específicos de tumores humanos (G. P. Gupta et al., 2007; O'Brien et al., 2012; Sharma et al., 2012).

Específicamente en el proceso de maduración linfoide, la familia ID restringe el desarrollo y diferenciación de las células B por la formación de heterodímeros con los factores de transcripción producidos por los genes E2A, HEB y E2-2 (Cochrane et al., 2011; Kee et al., 2001). Por una parte, *ID1* bloquea la diferenciación linfoide B en la etapa celular de pro-B mientras que *ID3* inhibe la apoptosis y la detención del crecimiento en respuesta al factor de crecimiento tumoral  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Cochrane et al., 2011; Kee et al., 2001). Las proteínas ID inhiben también a los miembros de la subfamilia de factores de transcripción de dominio emparejado-homeobox, que comprende PAX2, PAX5 y PAX8. Los miembros de esta subfamilia tienen funciones clave durante la regulación de varios procesos de desarrollo, incluida la linfopoyesis B.

Los niveles de expresión desregulados de las proteínas ID en el cáncer a menudo son consecuencia de la inducción transcripcional por parte de oncoproteínas como MYC, RAS, SRC, Notch, sarcoma de Ewing (EWS), Friend leukaemia integration 1 (FLI1) y tirosinas quinasas receptoras y por señales dirigidas por el factor de crecimiento, como el factor de crecimiento epidermal (EGF), el

factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF), el factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF $\beta$ ) y proteínas morfogénicas óseas (BMP), que se activan de manera constitutiva en las células y promueven procesos como la proliferación celular, la invasión, la angiogénesis y la metástasis (Roschger & Cabrele, 2017).

Para el gen *IGJ*, recientemente se ha observado que su expresión se correlaciona significativamente con la resistencia a los glucocorticoides en las líneas celulares de LLA y se ha descrito junto a otros genes, como gen predictivo para el pronóstico en LLA-pre-B pediátrica (Harvey et al., 2010; Hoffmann et al., 2008; Jing & Li, 2019; Kang et al., 2010).

### **3.6 Líneas celulares y ADN recombinante como modelo de estudio de la biología del cáncer**

Los modelos celulares en el estudio del cáncer son muy útiles ya que se pueden manipular fácilmente mediante tecnologías de ADN recombinante y se pueden usar en aplicaciones de alto rendimiento, lo que ha permitido avanzar en el estudio de la función de los genes asociados a los procesos tumorales de la LLA-B (Doudna & Charpentier, 2014; Khan et al., 2016). Esto se debe a que las investigaciones ya no se limitan a realizar un reporte de asociación sino que intentan encontrar el papel que cumplen estos genes en el proceso leucémico. Por ejemplo, gracias a estos modelos celulares, actualmente se sabe que la quinasa ZAP70 induce la migración de las células de LLA-B al sistema nervioso central SNC por medio de la modulación de la expresión de moléculas de adherencia y receptores de quimiocinas (Alsadeq et al., 2017). De igual manera, estos modelos han permitido conocer nuevos procesos celulares relacionados con genes previamente identificados. Por ejemplo, la regulación del oncogén c-Kit por RUNX1 y FUBP1 aumento de la proliferación en linfoblastos (Debaize et al., 2018) o la inducción del remodelación estructural de la cromatina por parte del factor de transcripción IKAROS junto con el complejo HDAC1 (Song et al., 2016).

### 3.7 Alternativas para la edición genética

Recientemente, se han desarrollado varias herramientas para lograr la edición genética en diversos modelos, como los dedos de zinc, las nucleasas de actividad similar a activador de transcripción (TALEN), sistema Tol2-transposasa y el sistema de endonucleasas de Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas (CRISPR/Cas, por sus siglas en inglés (Krishnarao et al., 2018) (Maeder & Gersbach, 2016).

Las proteínas TALEN y los dedos de zinc son alternativas donde se logra introducir inserciones y deleciones dentro del genoma, sin embargo su alta complejidad y costo para su construcción y baja especificidad han hecho que estas herramientas sean menos usadas. El sistema Tol2-transposasa permite la integración aleatoria de secuencias de interés en el genoma. En resumen este sistema se compone de una enzima transposasa y de un fragmento de ADN de interés flanqueado a 5' y 3' por secuencias reconocidas por la transposasa. Al reconocer estas secuencias, la transposasa genera cortes de doble cadena en el ADN, libera el fragmento y lo integra en el genoma celular (Huang et al., 2010; Maeder & Gersbach, 2016). Sin embargo, el no poder controlar el sitio de integración representa una desventaja para la edición genética precisa.

### 3.8 Sistema CRISPR/Cas9 como herramienta de edición genética

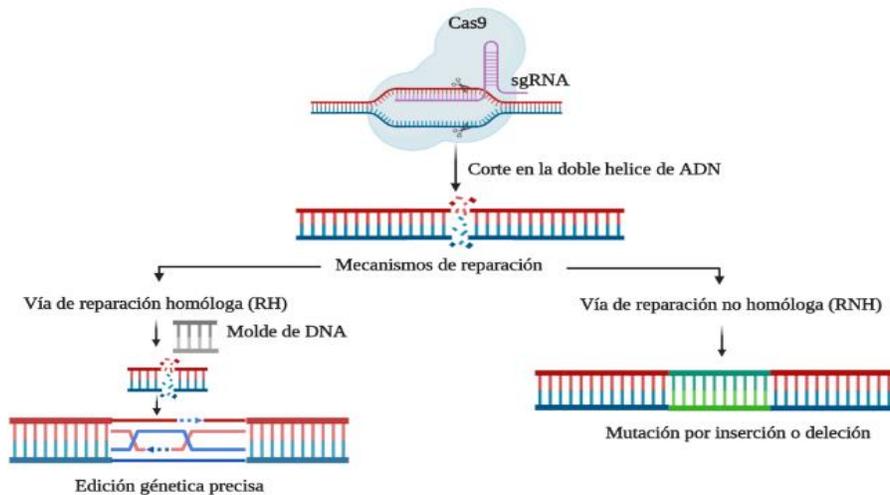
El sistema CRISPR/Cas es un mecanismo de defensa adaptativo de los microorganismos procariotas contra elementos de DNA invasores, que consta de dos fases: **I) Fase de inmunización:** después de la introducción del DNA exógeno proveniente de virus o de plásmidos, el elemento Cas (endonucleasa) reconoce a la molécula extraña y genera un corte de doble cadena de ADN, algunos fragmentos son integrados en el locus CRISPR donde se convertirá en un nuevo elemento espaciador.

**II) Fase de inmunidad:** el elemento espaciador incorporado se transcribe como CRISPR RNA (crRNA), que posteriormente sirve de guía para que la proteína Cas reconozca y elimine secuencias similares en el futuro (Chávez-Jacobo, 2018).

El entendimiento de este mecanismo, ha permitido el uso del sistema CRISPR/Cas como una herramienta programable de edición genética en eucariotes, mediante el uso de sus mecanismos de reparación y su capacidad de introducir cortes específicos en la molécula de ADN (Doudna & Charpentier, 2014). El sistema CRISPR/Cas9, es un sistema tipo II, que cuenta con una endonucleasa programable Cas9, que junto con un ARN guía (sgRNA) induce rupturas de doble cadena específicas de un ADN blanco (Ryu et al., 2019). Existen dos sistemas de reparación de daño, que serán los encargados de insertar las modificaciones: la recombinación no homóloga (RNH) y la recombinación homóloga (RH) (**Figura 2**).

**Figura 2.**

*Alternativas de edición genética mediada por el sistema CRISPR/Cas9. Usando las vías de reparación de ruptura de ADN de doble cadena de las células eucariotas se logra incorporar secuencias especificadas brindadas por el investigador, logrando una edición genética precisa o la delección de un gen de interés.*



El sistema RH necesita de una molécula de ADN adicional que actúe como molde para la reparación del corte, estos moldes pueden estar presentes en el cromosoma (genes duplicados) o pueden ser suministrados de manera exógena; por ejemplo, a través de plásmidos. Gracias a que la secuencia adicional se puede suministrar de manera exógena, esta vía ha sido empleada para introducir secuencias específicas dentro de las regiones cortadas con el sistema CRISPR/Cas9 (Chávez-Jacobo, 2018).

Estudios recientes publicados han demostrado una modificación genética eficiente en varias células y organismos a través de reparación por recombinación homóloga mediado por el sistema de CRISPR/Cas9, volviéndola una herramienta de manipulación genética robusta y bien tolerada para muchos modelos celulares (D. Gupta et al., 2019; Sánchez-Rivera & Jacks, 2015). Se ha evidenciado el poder de edición *ex vivo* del genoma somático para el modelado rápido de mutaciones cooperantes y la generación de modelos de malignidad hematopoyética en ratones (Chen et al., 2014; Heckl et al., 2014).

Para mejorar la edición genética del sistema CRISPR/Cas9 se han desarrollado diferentes alternativas como son la variación de la longitud de los brazos de homología, los tipos del ADN molde (bicatenario o monocatenario) y modificaciones químicas (Ryu et al., 2019). Esta última ha mostrado

ser una estrategia eficiente, que permite el uso de donantes de ADN de doble cadena modificados químicamente en sus extremos para lograr tasas de integración del 40-60% para insertos de 0,7-2,5 kilobases en células HEK293 y en varios loci genómicos de células madre y neoplásicas (Y. Yu et al., 2020).

## 4. Materiales y métodos

### 4.1 Materiales y métodos para objetivo específico 1

#### 4.1.1 Líneas Celulares

Dos líneas celulares fueron utilizadas: (i) la línea celular de Leucemia Linfoblástica Aguda de Precusores B (NALM-6) donada por Leibniz-Institute DSMZ, Alemania. (ii) La línea celular adherente HEK293, donada por el Dr. Bladimiro Rincón. La cual fue utilizada para la verificación de los protocolos de transfección, cambios de los niveles de expresión génica y expresión proteica.

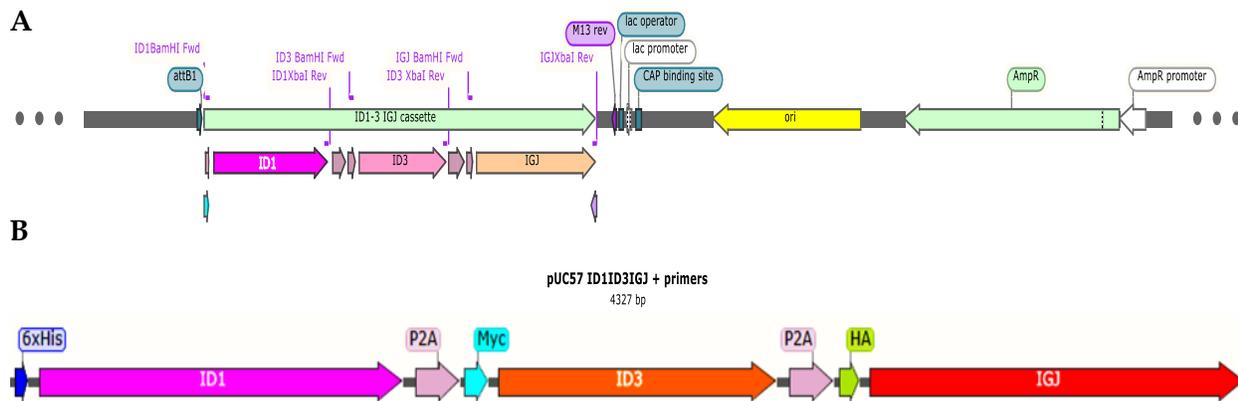
Las dos líneas celulares se incubaron a una temperatura de 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y atmosfera húmeda. Para su cultivo se utilizó el medio RPMI-1640 (LONZA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (GIBCO) y 1% de Solución de Penicilina, Estreptomicina y Anfotericina B (LONZA). El cambio del medio de cultivo se realizó cada tres días y alícuotas de cultivo celular fueron congeladas a -80°C, según se requería. Diariamente se evaluó el porcentaje de confluencia celular para la línea celular HEK293, mientras que para la línea NALM-6 se determinó el porcentaje de viabilidad y recuento utilizando una solución supravital, como el colorante azul de tripán (GIBCO).

#### 4.1.2 Diseño y construcción de los plásmidos

Se empleó un plásmido diseñado en estudios anteriores de nuestra línea de investigación que contiene un cassette policistrónico con los tres genes de interés *ID1*, *ID3* e *IGJ*, marcados con los péptidos etiqueta His, cMyc y HA respectivamente (Lobbestael et al., 2010; Young et al., 2012) (**Figura 3**).

**Figura 3.**

Diagrama del plásmido *pUC57* indicando los genes *ID1*, *ID3* e *IGJ*. (A) El plásmido fue el molde inicial para la amplificación de cada gen de manera individual. (B) Los tres genes fueron amplificados individualmente con su respectivo péptido etiqueta (*6xHis-ID1*, *Myc-ID3*, *HA-IGJ*).

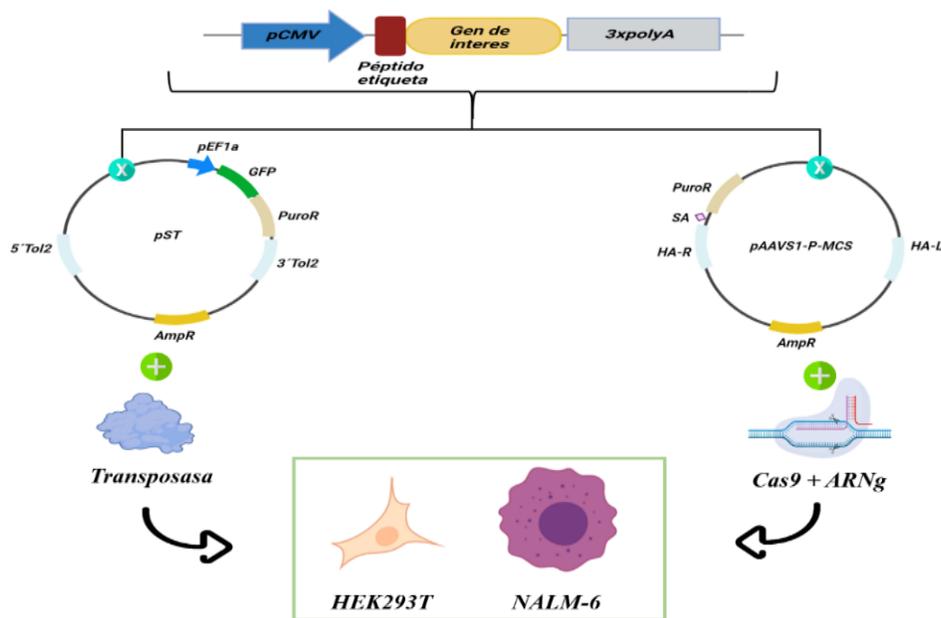


Se describen los componentes de la sección B. **6xHis (Azul):** péptido etiqueta His. **ID1 (Rosado):** Inhibidor de unión al ADN 1. **P2A (Lila):** péptido de autoclivaje P2A. **Myc (Azul):** péptido etiqueta Myc. **ID3 (Naranja):** Inhibidor de unión al ADN 3. **HA (Verde):** péptido etiqueta HA. **IGJ (Rojo):** gen de la cadena J de inmunoglobulina.

A partir del cassette de genes, cada gen fue amplificado con cebadores que creaban sitios de corte por enzimas de restricción. Posteriormente se realizó la ligación de los amplicones al vector plasmídico *pST* (constructo de sistema transposasa) y *pAAVS1* (constructo de recombinación homóloga) (Figura 4) por medio de la enzima T4 DNA ligasa (New England Biolabs). Una vez caracterizados por patrón de corte de restricción y secuenciación, los plásmidos fueron cotransfectados con la endonucleasa Cas9+ARN guía dirigida al locus AAVS, en el cromosoma 19 humano, o con la enzima Tol2-transposasa según el sistema de estudio, con el fin de lograr la integración en el genoma de las líneas celulares y generar líneas de expresión estable.

**Figura 4.**

Estrategia de clonación de los plásmidos para la generación de líneas transgénicas estables. Para la generación de los plásmidos para el sistema *Tol2*-transposasa y *CRISPR/Cas9*. Se llevó el promotor de citomegalovirus (*pCMV*), cada gen de interés (*ID1*, *ID3* e *IGJ*) y su respectivo péptido etiqueta (*6xHis*, *Myc* y *HA*) mediante clonación dirigida a los plásmidos *pST* y *pAAVS1-P-MCS*. Generados los plásmidos se co-transfectaron con la enzima transposasa y *Cas9*+*ARNg* para generar las líneas estables.

**4.1.3 Transformación bacteriana**

Inicialmente, los plásmidos usados (sección 5.1.1) fueron transformados en la cepa bacteriana *E. coli* NEB 5-alpha (New England Biolabs) siguiendo el protocolo establecido por la casa comercial. Los plásmidos tienen un gen de resistencia a ampicilina, lo que permite la selección positiva de las colonias bacterianas transformadas. Las bacterias fueron cultivadas en cajas de agar Luria-Bertani o agar macConkey suplementados con 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ampicilina.

Una vez verificada la transformación de las bacterias, se realizó la extracción del material genético de una Unidad Formadora de Colonia (UFC) utilizando el kit Plasmid Mini y Bigmini (Kit Monarch) dependiendo de los requerimientos. La calidad y cantidad del material genético extraído se determinó por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1 o 2% y medición en el equipo Nanodrop One (Thermo scientific).

#### **4.1.4 Manipulación de las bacterias competentes**

Las bacterias empleadas se catalogan como riesgo biológico nivel I, por lo tanto, se manejaron en las áreas de trabajo del laboratorio bajo condiciones de esterilidad. El crecimiento de las bacterias se realizó en incubadoras a una temperatura de 37°C en atmósfera seca, mientras que el almacenamiento se realizó en neveras a 4°C destinadas para este propósito.

Los desechos líquidos fueron tratados con una solución de hipoclorito de sodio (5.000 ppm) y descartados de acuerdo con los protocolos estandarizados por la Universidad. El material desechable utilizado para estos procesos fue descartado en bolsa roja y entregado al personal de manejo de residuos peligrosos de la facultad de salud según las recomendaciones del Plan de Gestión Integral de Residuos (PGIR)(Universidad Industrial de Santander, n.d.). En caso de los agares, estos fueron entregados al laboratorio de Microbiología o laboratorio clínico para su acumulación y posterior descarte.

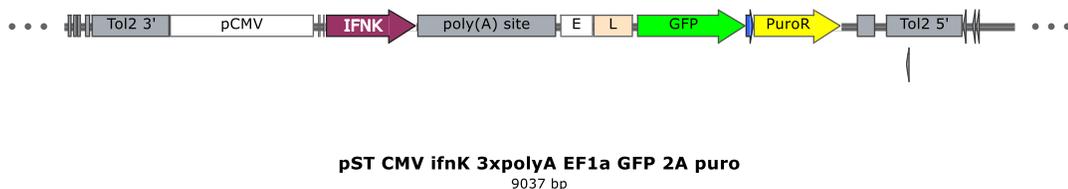
#### **4.1.5 Plásmido del sistema transposasa (pST)**

La construcción del plásmido del sistema transposasa se basó en el plásmido vector pST CMV IFNk 3xpolyA EF1a GFP 2A puro, creado previamente en nuestra línea de investigación (**Figura 5**). Este plásmido contiene el promotor de los genes tempranos-intermedios de Citomegalovirus Humano

(pCMV), las secuencias de reconocimiento de la transposasa Tol2 y un módulo reportero bajo la expresión del promotor constitutivo EF1a. El módulo reportero era un policistrón que contenía el gen de resistencia a puromicina y el gen de la proteína GFP (*Green Fluorescent Protein*), separados por la secuencia codificante del péptido T2A y una secuencia de poliadenilación.

### Figura 5.

*Componentes del plásmido pST CMV IFNk 3xployA EF1a GFP 2A puro. El plásmido empleado cuenta con elementos necesarios para lograr la integración en el genoma de la célula eucariota y la verificación de la transfección usando un módulo reportero.*



**Tol2 3'** (Gris): Sitio de reconocimiento para enzima Tol2. **pCMV** (Blanco): promotor de los genes tempranos-intermedios del Citomegalovirus Humano. **IFNk** (Morado): gen interferón kappa. **Poly(A) site** (Gris): secuencia de poliadenilación. **E** (Blanco): promotor constitutivo factor de elongación 1. **L** (Rosado): Repetición terminal larga (LTR) de 5' del virus de la leucemia de células T humanas (HTLV) tipo 1. **GFP** (Verde): proteína verde fluorescente. **T2A** (Azul): péptido de autoclivaje T2A. **PuroR** (Amarillo): Gen de resistencia a puromicina. **SV40 poly(A) signal**

Cada uno de los genes (*ID1-ID3-IGJ*) fue amplificado con los cebadores ID1 Fwd y Rev, ID3 Fwd y Rev y IGJ Fwd y Rev (**Tabla 1**) que permitieron crear el sitio 5' BamHI y 3' XbaI. Paralelamente, el plásmido vector pST CMV IFNk 3xpolyA EF1a GFP 2A puro también fue digerido

con las enzimas BamHI-XbaI, se purificó la banda con tamaño aproximado de 8000 pb usando kit comercial (PureDireX). Cada amplificado también fue digerido con estas mismas enzimas. Finalmente se realizó la ligación de cada gen con el vector por medio de la enzima T4 DNA ligasa (New England Biolabs). Esta ligación se transformó en bacterias competentes (*E. coli* NEB 5-alpha), se realizó la extracción plasmídica y caracterización inicial con las enzimas BamHI y XbaI. El plásmido resultante se denominó *plásmido del sistema transposasa (pST)* con su respectivo gen. La identidad de estos plásmidos (*pST-ID1*, *pST-ID3* e *pST-IGJ*) fue verificada por digestión por enzimas de restricción (BamHI-XbaI, XmaI Y KpnI) y secuenciación.

### Tabla 1.

*Cebadores utilizados para la construcción de los plásmidos recombinantes del sistema transposasa.*

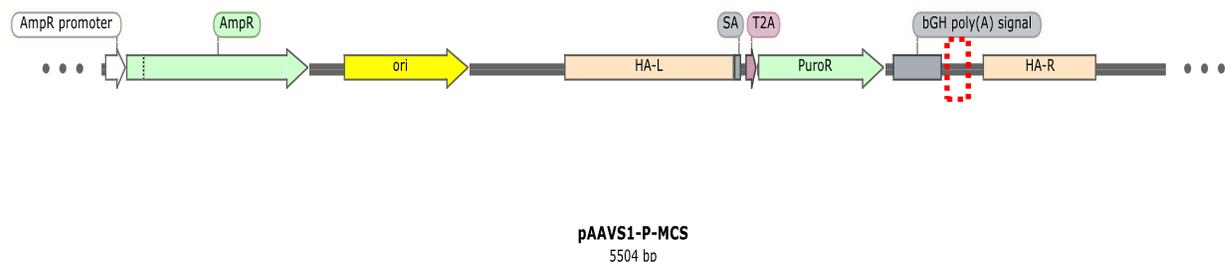
Nombre	Sentido	Secuencia 5'-3'	Temperatura de melting	Número de bases
ID1 fwd- BamHI	Fwd	5'-CATGGTCATAGCTGTGGATCCACCATGCATCACCATCACCATCACG-3'	82,9	46
ID1 Rev- XbaI	Rev	5'-AACAATAGGCGAGTGTCTTAGATTAGCGACACAAGATGCGATCGTCC-3'	79,9	48
ID3 fwd- BamHI	Fwd	5'-CATGGTCATAGCTGTGGATCCACCATGGAGCAAAAGCTGATCTCGG-3'	82,9	46
ID3 Rev- XbaI	Rev	5'-AACAATAGGCGAGTGTCTTAGATTAGTGGCAAAAGCTCCTTTTGTTCG-3'	78,9	48
IGJ fwd- BamHI	Fwd	5'-CATGGTCATAGCTGTGGATCCACCATGTACCCATACGATGTTCCAG-3'	81,9	46
IGJ Rev- XbaI	Rev	5'-AACAATAGGCGAGTGTCTTAGATTAGTCAGGATAGCAGGCATCTGGG-3'	79,9	48

#### 4.1.6 Plásmido del sistema CRISPR (pAAVS1)

La construcción del plásmido de recombinación homologa se basó en el plásmido vector pAAVS1-P-MCS (**Figura 6**). Se usó como molde cada uno de los plásmidos diseñados previamente para el sistema transposasa (*pST-ID1*, *pST-ID3* e *pST-IGJ*). Los cassettes CMV-gen de interés-polyA fueron amplificados mediante los cebadores CMV Fwd y polyA Rev (**Tabla 2**). Estos cebadores permitieron por una parte crear los sitios de restricción 5' SpeI y 3' SalI.

#### Figura 6.

*Componentes del plásmido pAAVS1-P-MCS. El plásmido empleado cuenta con elementos necesarios para lograr la integración sitio específica en el genoma de la célula eucariota y la verificación de la transfección por la adquisición resistencia a puromicina.*



**AmpR promoter** (Blanco): promotor del gen de resistencia a ampicilina. **AmpR** (Verde): gen de resistencia a ampicilina. **ori** (Amarillo): sitio de origen bacteriano. **HA-L** (Rosado): brazo de homología izquierdo. **SA** (Gris): Sitio aceptor de splicing. **T2A** (Rosado): péptido de autoclivaje T2A. **bGH poly(A) signal** (Gris): secuencia de poliadenilación. **HA-R** (Rosado): brazo de homología derecho. Se encierra en rojo el sitio de clonación del cassette CMV-Gen de interés -PolyA

Simultáneamente, el plásmido vector pAAVS1-P-MCS también fue digerido con las enzimas SalI-SpeI, se purificó la banda con tamaño de 5500pb aproximadamente usando kit comercial (PureDireX). Finalmente se realizó la ligación de cada inserto (promotor-gen-cola de poliadenilación) previamente digeridos con el vector por medio de la enzima T4 DNA ligasa (New England Biolabs).

El plásmido resultante se denominó *plásmido del sistema CRISPR (pAAVSI)* con su respectivo gen. La identidad de estos plásmidos (*pAAVSI-ID1*, *pAAVSI-ID3* e *pAAVSI-IGJ*) fue verificada por digestión por enzimas de restricción (BamHI, XmaI y KpnI) y secuenciación.

**Tabla 2.**

*Cebadores utilizados para la construcción de los plásmidos recombinantes del sistema CRISPR.*

Nombre	Sentido	Secuencia 5'-3'	Temperatura de meltin	Número de bases
<b>CMV SalI</b>	Fwd	5'-CATGGTCATAGCTGTGTCGACGACCATAGCCAATTCAATATGGCG-3'	80,7	45
<b>3xpolyA SpeI</b>	Rev	5'-AACAAATAGGCGAGTGTCTTAGATTAGCGACACAAGATGCGATCGTCC - 3'	78,9	48

#### 4.1.7 Transfección celular para la integración genómica eucariota

##### 4.1.7.1 Lipofección de la línea celular HEK293

La transfección de los plásmidos recombinantes en la línea celular HEK293 se realizó por el método de lipofección, usando el kit Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent (Invitrogen), siguiendo las indicaciones del fabricante. Se tomaron  $3 \times 10^5$  células HEK293/pozo de placa de 24 pozos para ser cotransfectadas con 500 ng del plásmido del modelo de expresión del sistema transposasa (*pST-ID1*, *pST-ID3* e *pST-IGJ*) y 500 ng del plásmido pCS2-transposase que codifica la enzima Tol2 transposasa (Yagita et al., 2010).

Se siguió el mismo proceso para el sistema de constructo de recombinación de homologa CRISPR-Cas9, donde se tomaron el mismo número de células y fueron co-transfectadas con 500 ng del plásmido del modelo de expresión (*pAAVSI-ID1*, *pAAVSI-ID3* e *pAAVSI-IGJ*) y 500 ng del

plásmido pXAT2 que codifica la enzima Cas9 (endonucleasa) y ARN guía, el cual estaba dirigido contra el locus AAVS1(Oceguera-Yanez et al., 2016).

Posteriormente, las células fueron cultivadas en medio suplementado con puromicina para comprobar su resistencia adquirida a través de los plásmidos transfectados. Para identificar la dosis óptima de antibiótico de selección, se realizó una curva de toxicidad con concentraciones incrementales de diclorhidrato de puromicina (TOCRIS) (0,05 – 5,00 µg/mL) adicionadas al medio de cultivo. La dosis óptima de puromicina fue la concentración mínima de antibiótico en la cual el 100% de las células no transfectadas mueren tras una semana de incubación con el antibiótico y no presenta una toxicidad visual en los primeros 2-3 días de incubación. Para la línea celular HEK293 se determinó la concentración de 1 ng/mL de puromicina.

#### **4.1.7.2 Electroporación de la línea celular NALM-6 modelo estable**

La electroporación de la línea NALM-6 se realizó en el equipo Gene Pulser Xcell electroporation system (Biorad). En una cubeta de 0,4 cm (Biorad) se resuspendieron  $1 \times 10^6$  células NALM-6 en 500 µl de medio RPMI-1640 (GIBCO) sin suero fetal bovino con 10 µg del plásmido de sistema de sistema transposasa (*pST-IDI*, *pST-ID3* y *pST-IGJ*) y 10 µg del plásmido pCS2-transposase. Se siguió el mismo proceso para el sistema de constructo de recombinación de homologa CRISPR/Cas9, donde se tomaron el mismo número de células y cotransfectadas con 10 µg del plásmido del modelo de expresión (*pAAVS1-IDI*, *pAAVS1-ID3* y *pAAVS1-IGJ*) y 10 µg del plásmido pXAT2.

Se usó un protocolo basado en capacitancia 950 µF, voltaje 320 y resistencia co en el equipo de electroporación. Se determinó la viabilidad por tinción con azul de tripán, antes y 2 horas después del proceso. Después de una semana de expansión celular, las células fueron cultivadas en medio suplementado con puromicina para comprobar su resistencia adquirida a través de los plásmidos transfectados. Para identificar la dosis óptima de antibiótico de selección, se realizó una curva de

toxicidad con concentraciones incrementales de diclorhidrato de puromicina (TOCRIS) (0,05 – 5,00 µg/mL) adicionadas al medio de cultivo. La dosis óptima de puromicina fue la concentración mínima de antibiótico en la cual el 100% de las células no transfectadas mueren tras una semana de incubación con el fármaco y no presenta una toxicidad visual en los primeros 2-3 días de incubación. Para la línea celular NALM-6 se utilizó la concentración de 0,15 µg/mL de puromicina.

#### **4.1.7.3 Electroporación de la línea celular NALM-6 modelo transitorio**

La electroporación de la línea NALM-6 para la generación de líneas transitorias se realizó en el equipo Gene Pulser Xcell electroporation system (Biorad). En una cubeta de 0,4 cm (Biorad) se resuspendieron  $1 \times 10^6$  células NALM-6 en 500 µl de medio RPMI-1640 (GIBCO) sin suero fetal bovino con 20 µg del plásmido con la expresión individual de cada gen (*ID1-COPOEIA*, *ID3-COPOEIA* e *IGJ-COPOEIA*).

Se siguió el mismo protocolo anteriormente descrito (4.1.7.2), sin embargo estas células no fueron cultivadas en medio suplementado con puromicina debido a que se buscaba comparar la expresión de los genes sin agente selectivo.

#### **4.1.8 Separación de las poblaciones celulares en suspensión por viabilidad**

La selección de células transfectadas viables, resistentes al antibiótico de selección, se realizó mediante la separación de densidad por OptiPrep™, utilizando una solución yodada iónica, que no genera toxicidad celular y que tiene una presión osmótica baja que permite ser ampliamente usada para el aislamiento de una amplia gama de células de mamíferos (Liu et al., 2020; Mita et al., 2008). Para este fin, se prepararon 2 mL de una solución B compuesta por una relación 0,45:0,55 de Optiprep (SIGMA) con medio RPMI-1640 (LONZA) suplementado con 10% de SFB sin antibiótico. Luego se dispensaron 5 mL de cultivo celular y se centrifugó a 2.000 rpm por 20 min a 20°C (Aceleración 7 y

desaceleración 3). Se retiró la capa de células y se resuspendió en medio de cultivo suplementado según requerimientos. Se determinó la viabilidad celular antes y después de realizar el protocolo.

#### **4.1.9 Análisis de la fluorescencia celular**

La expresión de la proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés) permitió identificar a las células viables transfectadas con los plásmidos recombinantes del sistema Tol2-transposasa utilizando el microscopio de fluorescencia Zeiss Axiolab inkl. Fototubus (Zeiss) para la línea celular HEK293. Para la línea NALM-6, una alícuota de 20  $\mu$ L de cultivo celular se diluyó en 200  $\mu$ L de buffer PBS 1X y se procesó por el citómetro de flujo BD FACSCanto™ II Cell Analyzer (BD). Los resultados fueron analizados con el programa Flowing Software 2.5.1 (Turku Bioscience).

## **4.2. Materiales y métodos para objetivo específico 2**

### **4.2.1 Verificación de los cambios en la expresión génica**

Para la verificación de los cambios de la expresión génica entre las líneas no modificadas y modificadas para cada uno de los genes, se realizó PCR en tiempo real usando cebadores diseñados (**Tabla 3**) para la cuantificación relativa de los niveles de expresión del RNA mensajero (RNAm) de los genes *ID1*, *ID3* e *IGJ*.

El ARN total de todas las líneas celulares se aisló usando el kit ADN/ARN AllPrep Mini (Qiagen), se cuantificó usando el espectrofotómetro NanoDrop One (Thermo Scientific) y se almacenó en alícuotas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Las muestras fueron tratadas con DNAsa y posteriormente se convirtieron en ADN complementario (ADNc) utilizando el kit Super-Script III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen). Se tomaron 100 ng ADNc y 1  $\mu$ L de cebadores para realizar la PCR cuantitativa (qPCR) por el método de SYBER GREEN haciendo uso de BlasTaq™ 2X qPCR Master Mix (abmGood). El protocolo de la reacción fue de  $95^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos, 40 ciclos de  $95^{\circ}\text{C}$  por 15 segundos y  $60^{\circ}\text{C}$  por 1

minuto en el equipo CFX96 Real-Time System (Biorad). El método empleado para estimar los cambios de expresión de cada gen usando *GAPDH* como control de expresión fue  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Se usó agua como control negativo y todos los ensayos se realizaron en triplicado.

**Tabla 3.**

*Cebadores utilizados para qPCR de los modelos transfectados por SYBR GREEN.*

Nombre	Sentido	Secuencia 5'-3'	Temperatura de meltin	Número de bases
ID1	Fwd	5'-CGACTACATCAGGGACCTTCAG-3'	64	22
ID1	Rev	5'-GCTTCAGCGACACAAGATGC-3'	60	20
ID3	Fwd	5'-TCAGCTTAGCCAGGTGGAAATC-3'	62,1	22
ID3	Rev	5'-GTCGTTGGAGATGACAAGTTCC-3'	62,1	22
IGJ	Fwd	5'-TGTAAGTGTGCCCGGATTACTTC-3'	62,9	22
IGJ	Rev	5'-CACAAATCTGGTTCTCAATGGTG-3'	61,1	23

#### 4.2.2 Verificación de la expresión proteica

La presencia de las proteínas de interés fue evaluada por la técnica de Western Blot. Para esto,  $8 \times 10^6$  células fueron resuspendidas en 400  $\mu$ L de buffer Laemmli para obtener concentraciones similares en cada muestra. La suspensión fue incubada a 100°C por 3 minutos para asegurar lisis completa, seguido de una incubación en hielo por 3 minutos y centrifugación a 14.000 rpm por 1 minuto. Con el fin de asegurar la cantidad de proteínas suficiente para los análisis, se sometieron a electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (PAGE) 20  $\mu$ L (NALM-6) o 10  $\mu$ L (HEK293) de la fase soluble de los extractos.

Las proteínas separadas en el gel se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF). Las membranas se bloquearon por una hora con una solución de TBST + 0,5% de leche en polvo y posteriormente se incubaron con los anticuerpos primarios de conejo ((**His-Taq** (D3I10), **c-Myc** (D84C12), **HA-Tag** (C29f4)), dirigidos contra los péptidos etiqueta a una dilución de 1:1000. Los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (PHR) se usaron a una dilución de 1:10000. La detección se realizó por quimioluminiscencia usando el reactivo SignalFire ECL (Cell Signaling Technology) y se visualizó usando el equipo ChemiDoc MP Imaging System (Biorad).

### **4.3. Materiales y métodos para objetivo específico 3**

#### **4.3.1 Evaluación de la proliferación**

Con el fin de identificar cambios en la proliferación celular, se llevó a cabo la evaluación indirecta del aumento del número de células mediante la reducción de la sal cloruro triazol (XTT) por acción de células metabólicamente activas. Las líneas celulares NALM-6 sin y con modificación genética fueron sembradas a una densidad de  $5 \times 10^4$  células/100  $\mu$ L en placas de 96 pozos con medio RPMI y la sal XXT (SIGMA-ALDRICH). La sal es reducida por la capacidad enzimática mitocondrial, permitiendo la observación de un producto coloreado (sal formazán). A partir de la generación de este producto y usando un equipo de espectrofotometría (iMark™ Microplate Absorbance Reader), se realizaron medidas a diferentes tiempos (0-72 horas) a una longitud de onda de 450 nm, con el fin de medir la actividad metabólica celular como indicador de la viabilidad celular y la proliferación (Catañeda et al., 2017; Gallegos-Hernandez, 2018).

#### **4.3.2 Evaluación de la quimiorresistencia**

Para evaluar la quimiorresistencia, las células NALM-6 fueron expuestas a diferentes agentes quimioterapéuticos rutinariamente empleados en la clínica con pacientes de LLA-B como

ciclofosfamida (**PHR1404-1G**), Doxorubicina (**44583-10MG**), metotrexato (**PHR1516-1G**), dexametasona (**D4902-25MG**) y Citarabina (**PHR1787-500MG**). Las células fueron sembradas a una densidad de  $5 \times 10^4$  células/100  $\mu$ L en placas de 96 pozos. Para identificar las concentraciones de quimioterapéutico a usar, se realizó una curva de toxicidad con concentraciones ascendentes en la línea celular NALM-6 sin modificación genética. Las concentraciones seleccionadas corresponden a aquellas en donde hubo una disminución en la viabilidad celular en un periodo de 0 a 72 horas. Los modelos NAML-6 con modificaciones genéticas se cultivaron en estas concentraciones ascendentes de quimioterapéuticos y cada 24 horas se realizó la evaluación de viabilidad y muerte celular mediante tinción supravital (azul de tripán) a lo largo de un periodo de 72 horas (Churampi, 2016; Gallegos-Hernandez, 2018; HERNÁNDEZ PAREDES, 2018).

#### 4.3.3 Análisis estadísticos

Los datos de proliferación celular y evaluación de quimiorresistencia fueron analizados en el software GraphPad Prism 8 usando la prueba de ANOVA bidireccional (En sus siglas en inglés, ANOVA Two-Way), para comparar los valores de las medias entre la línea sin modificación genética (línea control) y las líneas modificadas genéticamente. De igual forma, los datos de expresión génica por qPCR fueron analizados por la prueba de ANOVA bidireccional, comparando las medias de más de dos grupos para estimar el cambio de la variable dependiente cuantitativa (Nivel de expresión) en función de dos variables categóricas independientes (sistema de integración y genes de estudio). Los valores de  $p < 0,05$  se consideraron estadísticamente significativos. El nivel de significancia se graficó

\* $p < 0,033$  \*\*  $p < 0,002$  \*\*\*  $p < 0,001$

## 5. Resultados

### 5.1. Resultados para el objetivo específico 1

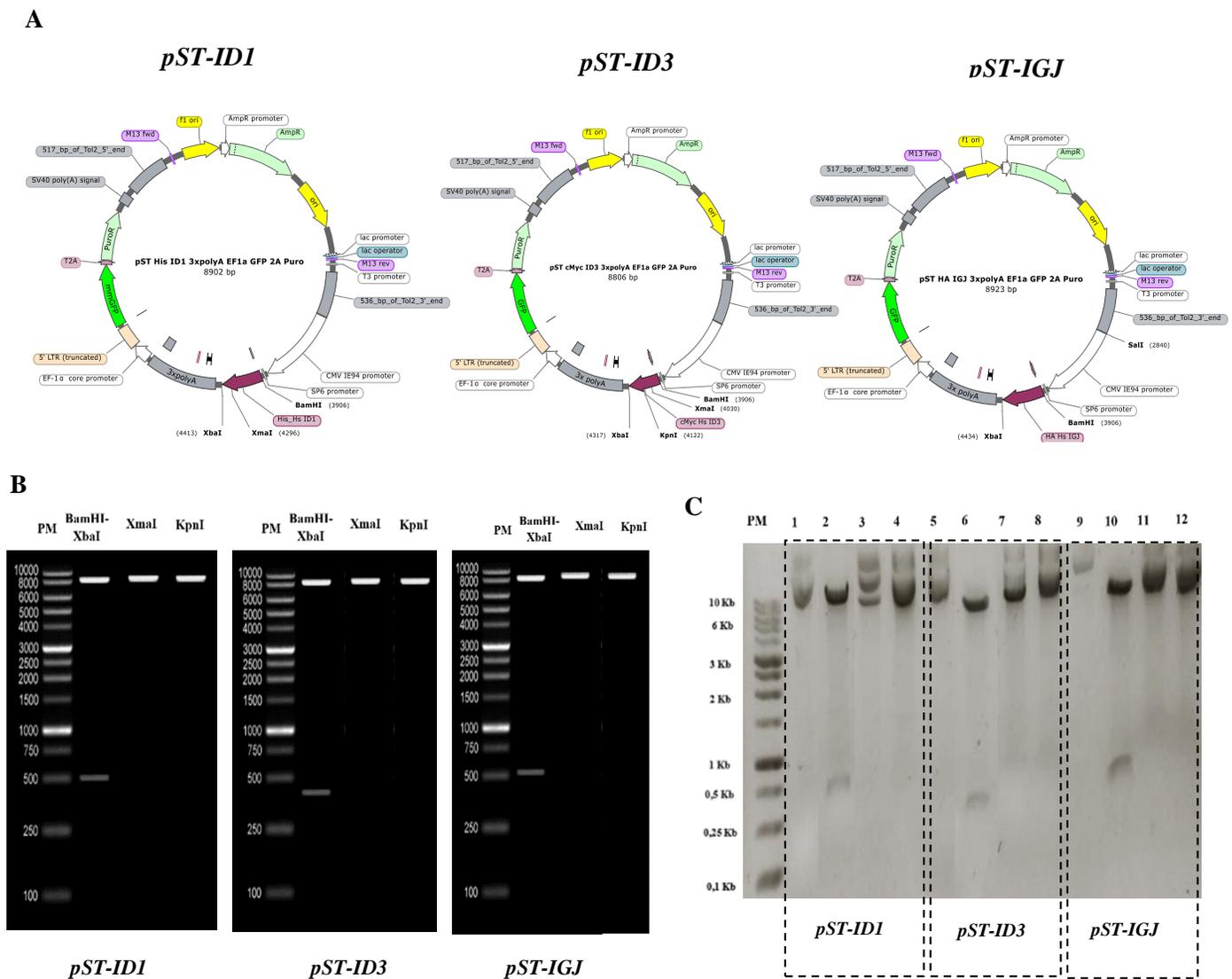
### 5.1.1 Construcción del constructo para el sistema de integración Tol2-transposasa y CRISPR/Cas9.

Para el desarrollo de los constructos para ambos sistemas, se utilizó la metodología de clonación dirigida, por lo cual cada gen fue clonado de manera individual del plásmido pUC57 (**figura 3**) y llevado a su respectivo plásmido (**figura 4**). Para la clonación de cada plásmido se estandarizó PCR convencional con la enzima Q5 High-Fidelity DNA (New England Biolabs). La identidad de los 6 plásmidos construidos fue evaluada por secuenciación (**Anexo 1**) y por los análisis de patrones de restricción usando las mismas enzimas usadas para la clonación inicial, BamHI-XbaI, y otras enzimas adicionales XmaI y KpnI para el constructo del sistema Tol2 (**Figura 7**). Para el constructo de recombinación homóloga (CRISPR) las enzimas usadas fueron BamHI, XmaI y KpnI (**Figura 8**). El empleo de enzimas diferentes a las de la clonación inicial permitió confirmar la presencia de cada inserto particular.

Se realizó una comparación de los plásmidos creados en el visualizador de Snapgene® Viewer, entre los patrones de corte esperados usando el software de licencia libre: <https://www.molbiotools.com/restrictionanalyzer.php> con los patrones de corte obtenidos. En todos los casos los patrones concuerdan. Adicionalmente, los plásmidos obtenidos fueron secuenciados para verificar la identidad de los cassettes de interés. La secuencia de los 6 plásmidos generados concuerdan con las secuencias esperadas.

**Figura 7.**

Caracterización de los plásmidos diseñados para el sistema Tol2-transposasa usando enzimas de restricción. (A) Para la identificación inicial de los plásmidos construidos se usó las enzimas **BamHI**, **XbaI**, **XmaI** y **KpnI**. (B) Se realizó comparación de los patrones de restricción esperados con los obtenidos usando el programa <https://www.molbiotools.com/restrictionanalyzer.php>. (C) Patrones de digestión obtenidos para los 3 plásmidos diseñados 1, 5 y 9: plásmidos **sin digerir**, 2, 6 y 10: plásmidos digeridos con **BamHI-XbaI**, 3, 7 y 11 plásmidos digeridos con **XmaI** y 4, 8 y 12 plásmidos digeridos con **KpnI**.

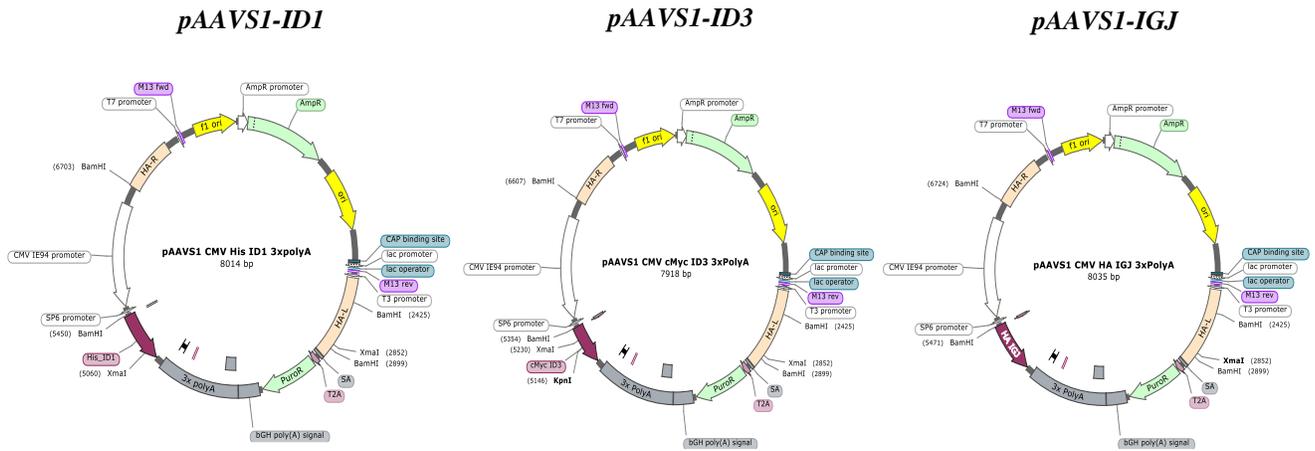


**PM**: Marcador de peso molecular. **AmpR promoter** (Blanco): promotor del gen de resistencia a ampicilina, **AmpR** (Verde): gen de resistencia a ampicilina. **Ori** (Amarillo): sitio de origen bacteriano. **Tol2 3'** (Gris): Sitio de reconocimiento para enzima Tol2. **CMV promoter** (Blanco): promotor de los genes tempranos-intermedios del Citomegalovirus Humano. **6xHis- ID1, Myc-ID3 o HA-IGJ (Morado)** genes de estudio. **3xPoly(A)** (Gris): secuencia de poliadenilación. **EF-1a core promoter** (Blanco): promotor constitutivo EF-1a. **GFP** (Verde): proteína verde fluorescente. **T2A** (Lila): péptido de autoclivaje T2A. **PuroR** (Verde): Gen de resistencia a puromicina. **SV40 poly(A) signal** (Gris): secuencia de poliadenilación. **Tol2 5'** (Gris): Sitio de reconocimiento para enzima Tol2. **F1 ori** (Amarillo): sitio de origen bacteriano.

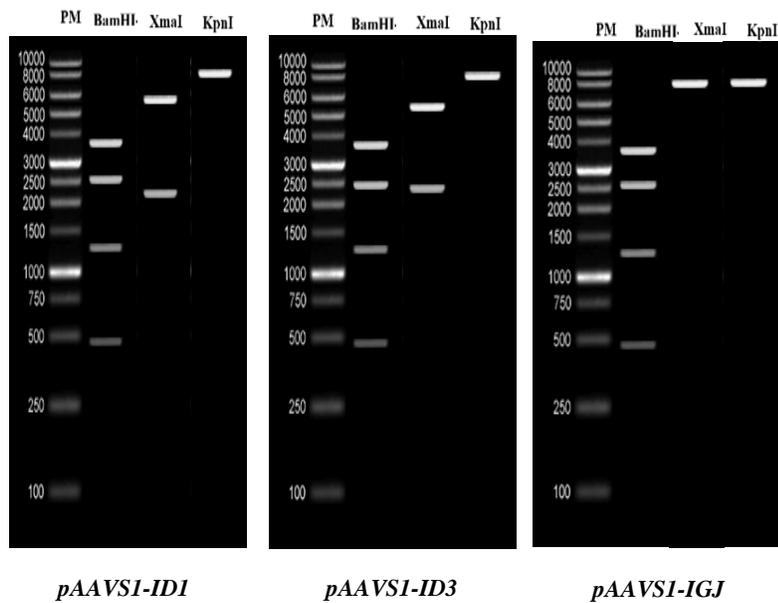
### Figura 8.

*Caracterización de los plásmidos diseñados para el sistema constructo de recombinación homóloga usando enzimas de restricción. (A)* Para la identificación inicial de los plásmidos construidos se usaron las enzimas ***BamHI***, ***XmaI*** y ***KpnI***. **(B)** Se realizó comparación de los patrones de restricción esperados con los obtenidos usando el programa <https://www.molbiotools.com/restrictionanalyzer.php>. **(C)** Patrones de digestión obtenidos para los 3 plásmidos diseñados 1, 5 y 9: plásmidos *sin digerir*, 2, 6 y 10: plásmidos digeridos con ***BamHI***, 3, 7 y 11 plásmidos digeridos con ***XmaI*** y 4, 8 y 12 plásmidos digeridos con ***KpnI***.

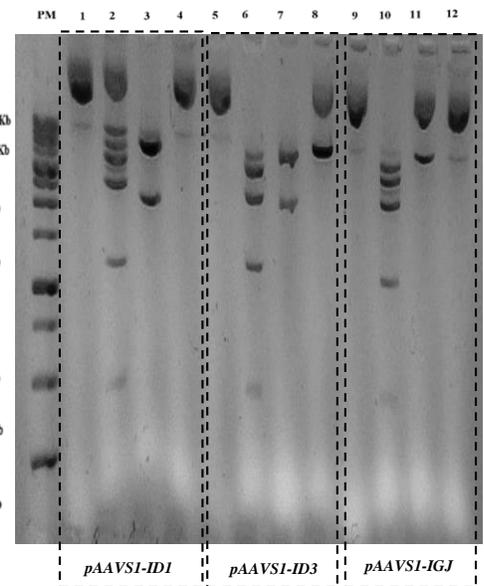
A



B



C



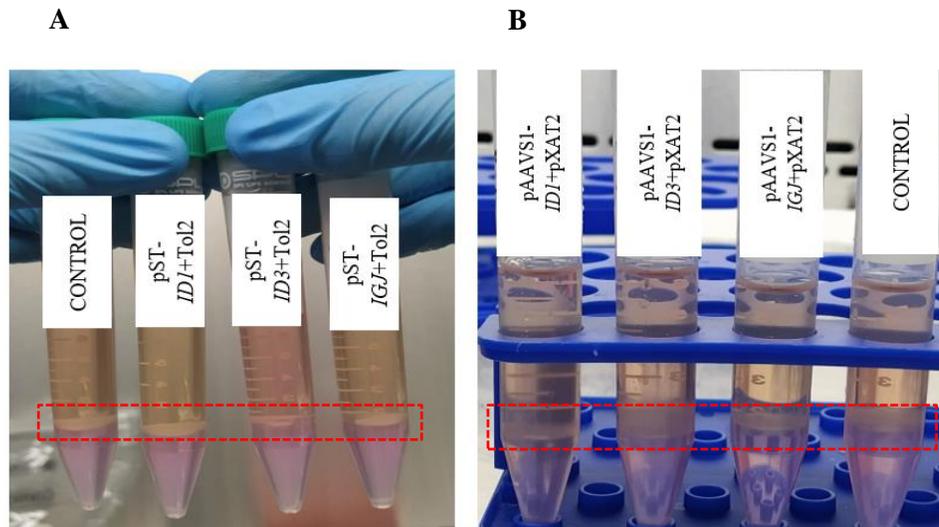
**PM:** Marcador de peso molecular. **AmpR promoter** (Blanco): promotor del gen de resistencia a ampicilina, **AmpR** (Verde): gen de resistencia a ampicilina. **Ori** (Amarillo): sitio de origen bacteriano. **HA-L** (Rosado): Brazo de homología izquierdo, **SA:** sitio aceptor de splicing, **PuroR** (Verde): Gen de resistencia a puromicina. **3xPoly(A)** (Gris): secuencia de poliadenilación, **6xHis- ID1**, **Myc-ID3** o **HA-IGJ** (Morado) genes de estudio, **CMV promoter** (Blanco): promotor de los genes tempranos-intermedios del Citomegalovirus. **HA-R** (Rosado): Brazo de homología derecho. **F1 ori** (Amarillo): sitio de origen bacteriano

### 5.1.2 Separación de poblaciones celulares por viabilidad en línea NALM-6.

La manipulación de la línea NALM-6 presentó un reto mayor por ser células en suspensión. La separación de las células transfectadas viables, resistentes a puromicina (constructo del sistema Tol2 transposasa o CRISPR/Cas9) de las no transfectadas se logró mediante la separación por gradiente de densidad, usando el reactivo OptiPrep™, logrando muy buenos resultados para los 6 modelos de estudio (**Figura 9**). La capa de células que se formaba en la interfase fueron tomadas y usadas para los análisis posteriores. La línea HEK293 no presentó esta dificultad, ya que las células no transfectadas mueren en el medio suplementado con puromicina, pierden adherencia y son fácilmente removidas al retirar el medio.

#### **Figura 9.**

*Selección por optiprep de modelos transfectados con sistema Tol2-transposasa y CRISPR/cas9 para la línea celular NALM-6.* Después de incubación con el antibiótico de selección, las líneas de celulares se separaron por densidad, que permite distinguir entre células viables y células muertas. **(A)** Líneas modificadas genéticamente con el sistema Tol2-tranposasa **(B)** Líneas modificadas genéticamente con el sistema CRISPR/Cas9.



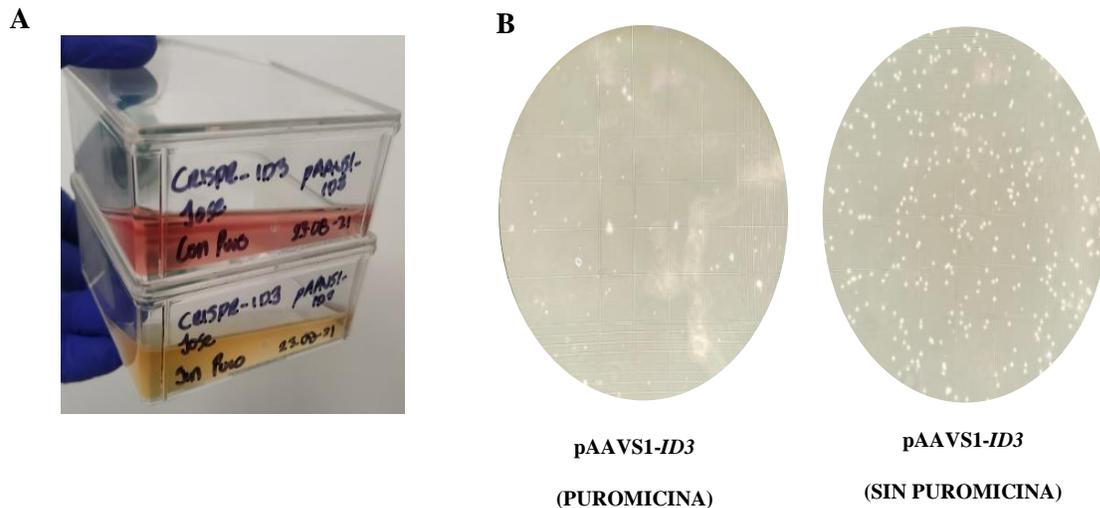
### 5.1.3 Verificación de los modelos genéticamente modificados con el sistema CRISPR/Cas9 y Tol2-transposasa en línea NALM-6 y HEK293.

La generación de líneas celulares estables mediante el sistema CRISPR/Cas9<sub>AAVS1</sub> se verifica mediante la selección con puromicina. Es importante resaltar que la expresión del gen de resistencia a puromicina depende de la correcta integración en el locus AAVS1 (también conocido como PPP1R12C), gracias al mecanismo de “exon-trapping” (captura de exón). Esto ocurre porque el gen de la puromicina del cassette viene precedido por un sitio aceptor de splicing (SA), que permite al gen expresarse solo si se integra, mediante recombinación homóloga, en el primer intrón del gen PPP1R12C, y la maquinaria de splicing empalma el gen de la puromicina en el transcrito naciente que, a su vez, se expresa a partir del promotor endógeno del gen PPP1R12C (Oceguera-Yanez et al., 2016) (**Figura 10**). Esto quiere decir que la expresión de la puromicina solo puede ocurrir cuando el constructo se integra específicamente dentro de este intrón, lo que reduce significativamente la probabilidad de recuperar células transfectadas no integradas (con expresión transitoria) o células

transfectadas con integración en sitios diferentes a AAVS1 (Oceguera-Yanez et al., 2016). Nosotros demostramos que la adquisición de la resistencia a puromicina solo ocurre cuando se co-transfecta el plásmido de recombinación homóloga junto con la nucleasa Cas9 y el ARNg específico para el locus AAVS1 (estos dos últimos están presentes en el plásmido pXAT2), tanto en células HEK293 como en las NALM6 (**Anexo 2**).

### Figura 10.

*Evaluación de la selección con puromicina en modelos integrados con CRISPR/Cas9. El sitio aceptor de splicing del plásmido pAAVS1-P-MCS es necesario para que los modelos transfectados adquieran la resistencia a puromicina. (A) Cambio de indicador de pH del medio de cultivo por crecimiento celular (B) Viabilidad con azul de tripán de las líneas sin co-tranfección de pXAT2 en presencia (izquierda) y en ausencia (derecha) del antibiótico.*

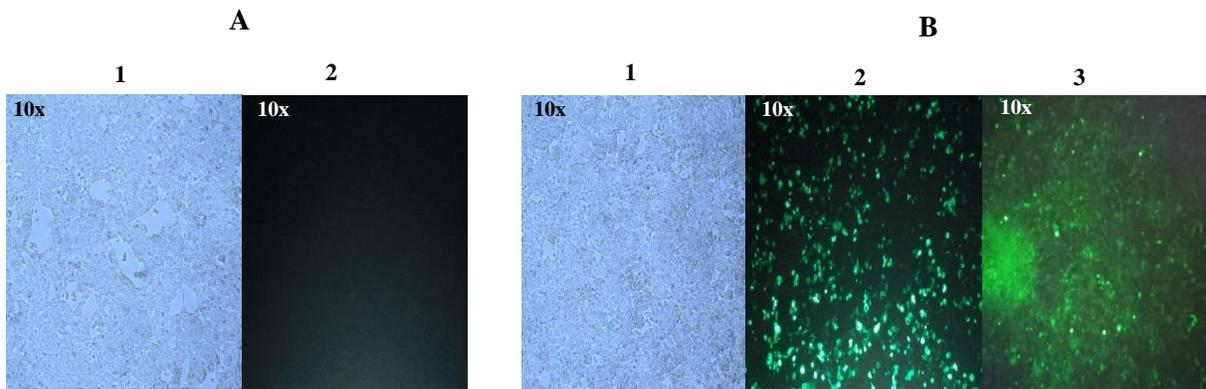


La generación de líneas celulares estables generadas con el sistema Tol2-transposasa se verificó mediante la selección con puromicina y la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP). Ambos

genes forman parte de un transcrito policistrónico, cuya expresión viene regulada por el promotor constitutivo EF1a ((Xiaoyin Wang et al., 2017). Los dos genes están separados por la secuencia P2A viral, que al ser traducida, va a separar la proteína aminoterminal (GFP) de la carboxiterminal (puromicina). La integración del transgén usando este sistema es aleatoria (dependiendo de la accesibilidad de la cromatina), y pueden ocurrir múltiples integraciones del transgén en el genoma. Nosotros logramos obtener modelos celulares transfectados con este sistema que adquirieron resistencia a puromicina. Sin embargo, al evaluar la expresión de la GFP obtuvimos resultados contradictorios. Por ejemplo, si bien observamos la expresión de la GFP en las líneas generadas en células HEK293 (**figura 11**), las líneas generadas en células NALM-6 no expresaban esta proteína en niveles detectables al microscopio de fluorescencia. Por lo tanto, analizamos la expresión de GFP por citometría de flujo y confirmamos una muy baja expresión de GFP en los tres modelos (**figura 12**).

### **Figura 11.**

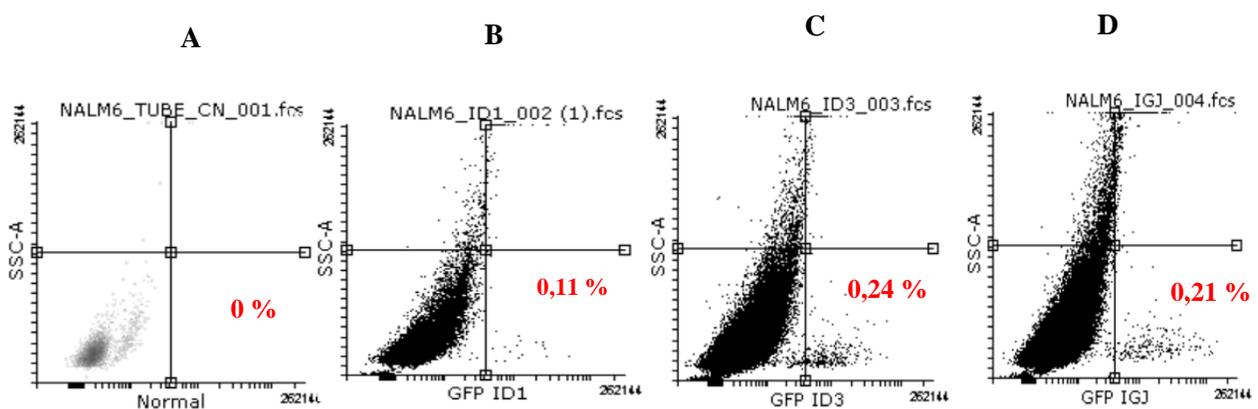
*Las líneas estables HEK293 modificadas genéticamente con sistema Tol2-transposasa, para cada uno de los genes de interés, expresan visiblemente la GFP. Fotografías de microscopía de campo claro (1) y fluorescencia (2, 3) para las líneas HEK293 no transfectadas (A) o transfectadas (B) con el sistema Tol2-transposasa. En esta figura se muestra la línea pST-ID1, evaluada a la primera (1,2) y a la tercera semana (3) después del tratamiento con puromicina. Resultados similares se obtuvieron para las líneas estables ID3 e IGJ.*



1. Visualización de campo claro 2. Visualización de fluorescencia con filtro de 525 nm a la primera semana 3. Visualización de fluorescencia a la tercera semana.

### Figura 12.

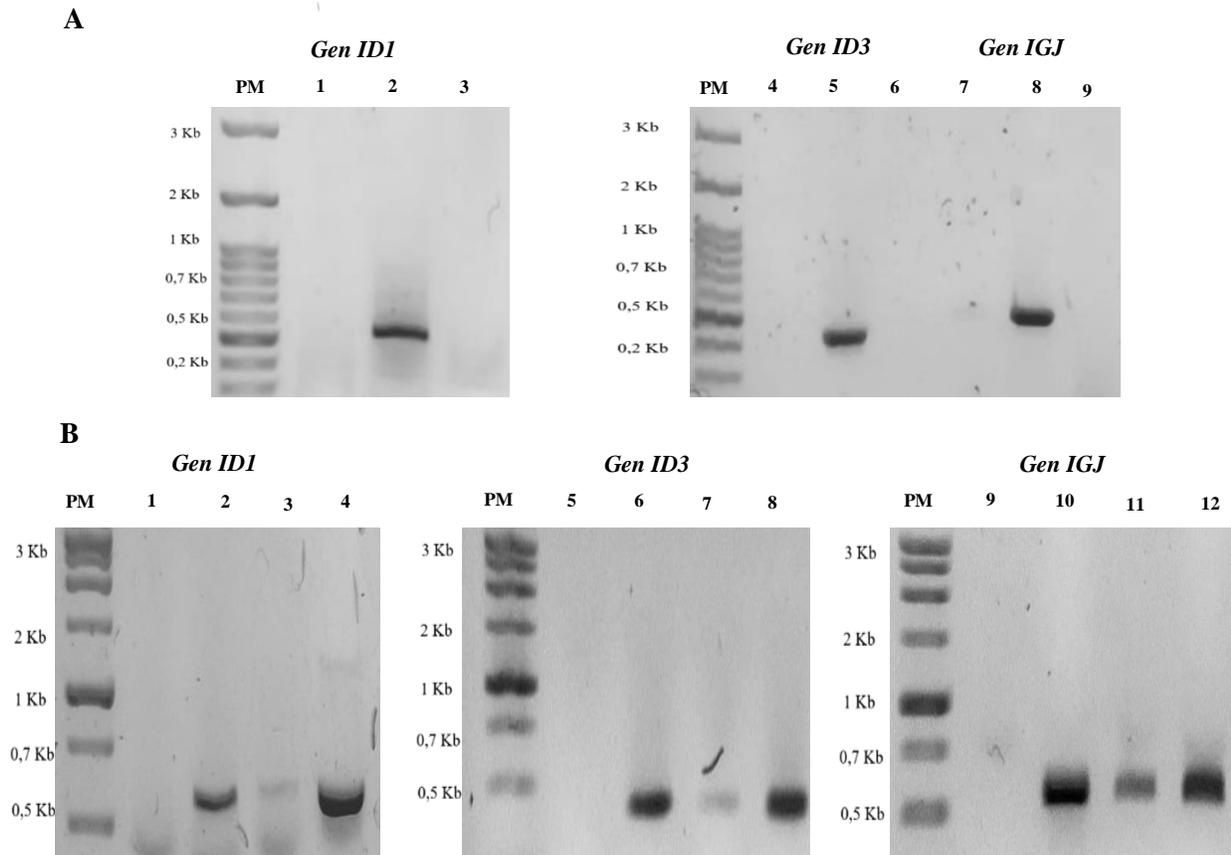
Las líneas estables NALM-6 modificadas genéticamente con el sistema Tol2-transposasa, para cada uno de los genes de interés, evidencian una baja expresión de GFP por citometría de flujo. Evaluación de fluorescencia mediante citometría de flujo para la línea base (A), la línea estable pST-ID1 (B) la línea estable pST-ID3 (C) y la línea estable pST-IGJ (D). El tiempo de evaluación fue a la tercera semana después del proceso de transfección.



Teniendo en cuenta los intrigantes resultados arriba mencionados, decidimos corroborar la presencia de los transgenes a nivel ADN genómico, para lo cual se realizó una PCR de punto final con los cebadores utilizados para la clonación inicial de cada gen de interés (**Tabla 1**). Los correspondientes transgenes se evidenciaron a nivel de ADN genómico para las 6 líneas modificadas genéticamente de NALM-6. En todos los casos, la intensidad del amplicón fue mayor para las líneas provenientes de la modificación con el sistema Tol2-Transposasa que con el sistema CRISPR/Cas9, lo que sugiere múltiples sitios de integración en el primer caso (**figura 13**). Las PCRs realizadas son específicas ya que la línea sin modificación genética de NALM-6 no amplificó con ninguna de las combinaciones evaluadas, en consecuencia decidimos continuar con los objetivos propuestos de la investigación.

**Figura 13.**

*Los transgenes se detectan específicamente en los genomas de las líneas celulares estables generadas mediante los sistemas Tol2-Transposasa y CRISPR/Cas9<sub>AAVSI</sub>. Evaluación por PCR usando cebadores específicos para los transgenes en el ADN genómico en líneas modificadas genéticamente NALM-6 con los sistemas Tol2-transposasa y CRISPR/Cas9. (A) La PCR es específica ya que la línea sin modificación genética no presentaron amplificación (B) las Líneas modificadas genéticamente amplifican su correspondiente transgén. El tiempo de extracción del ADN fue a la tercera semana después del proceso de transfección.*



(A) Al verificar la expresión de los transgenes en línea sin modificación genética se evidenció la ausencia de estos. **1:** Muestra de línea sin modificación genética (SMG), **2:** Control positivo (CP) para el gen *ID1*, **3:** Control negativo (CN), **4:** SMG, **5:** CP para el gen *ID3*, **6:** CN, **7:** SMG, **8:** CP para el gen *IGJ*, **9:** CN. (B) La presencia de los transgenes se demostró para todas las diferentes líneas generadas para estos dos sistemas. **1:** CN, **2:** NALM-6 pST-ID1+Tol2, **3:** NALM-6 pAAVS1-ID1+pXAT2, **4:** CP para el gen *ID1*, **5:** CN **6:** NALM-6 pST-ID3+Tol2, **7:** NALM-6 pAAVS1-ID3+pXAT2, **8:** CP para el gen *ID3*, **9:** CN **10:** NALM-6 pST-IGJ+Tol2, **11:** NALM-6 pAAVS1-IGJ+pXAT2, **12:** CP para el gen *IGJ*.

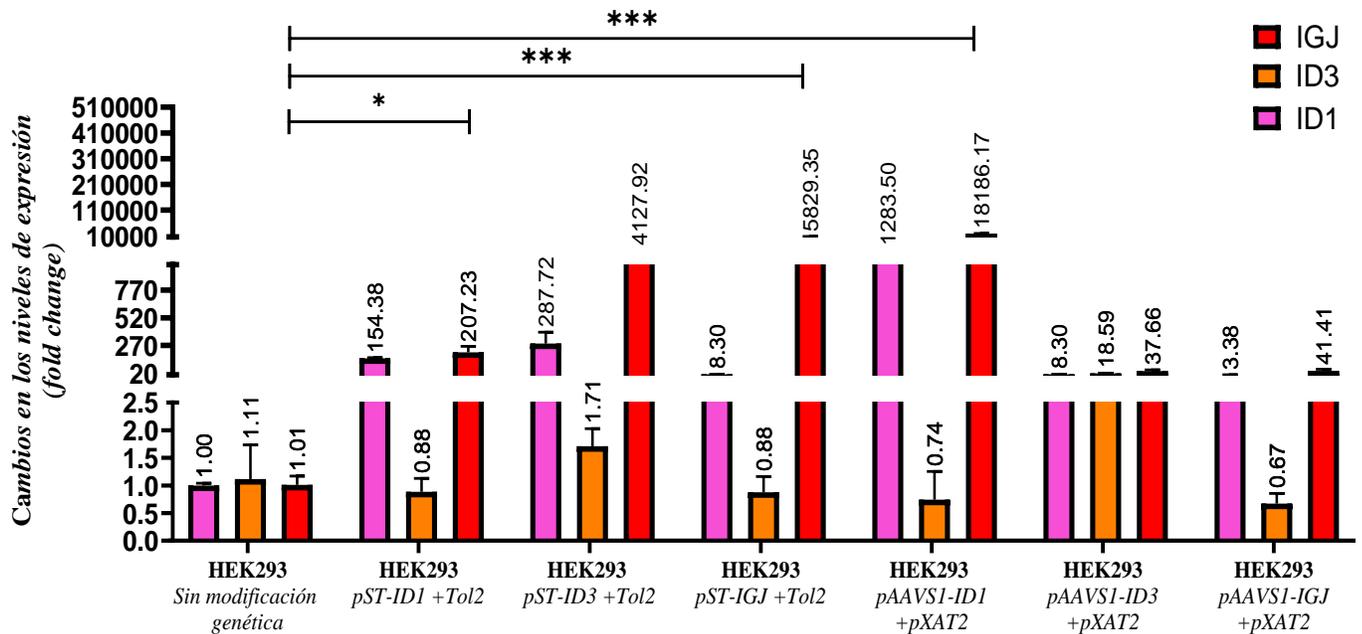
## 5.2. Resultados logrados para el objetivo específico 2

### 5.2.1 Análisis de qPCR de las líneas celulares HEK293 y NALM-6 modificadas genéticamente con el sistema Tol2-transposasa y CRISPR/Cas9.

Los cambios en los niveles de expresión de los transcritos de los diferentes genes de la firma génica de mal pronóstico fueron evaluados mediante RT-qPCR (PCR cuantitativa de transcripción inversa en tiempo real) usando cebadores diseñados para amplificar tanto los transcritos endógenos como los transcritos del transgén (**Tabla 3**). Si bien esta estrategia no distingue la expresión específica del transgén, si permite comparar la expresión acumulativa del gen endógeno más el transgén. Para el análisis se usó el software GraphPad Prism 8 y se utilizó como método estadístico ANOVA bidireccional (ANOVA Two-Way), donde las diferencias significativas fueron representadas \* $p < 0,033$  \*\*  $p < 0,002$  \*\*\*  $p < 0,001$  en los gráficos. En la línea HEK293 y NALM-6 sin modificación genética los niveles de expresión de los genes endógenos eran bajos y uniformes lo cual permitía una comparación idónea con los modelos modificados genéticamente (**Figura 14 y 15**).

#### **Figura 14.**

*La expresión relativa de los genes ID1, ID3 e IGJ en las líneas transgénicas HEK293 aumenta con relación a la línea base, pero lo hace de manera variable y característica. El ARN total se obtuvo a partir de  $1 \times 10^6$  células y se convirtió cDNA. Los niveles de expresión se cuantificaron por SYBR-Green, usando como gen de referencia GAPDH.*

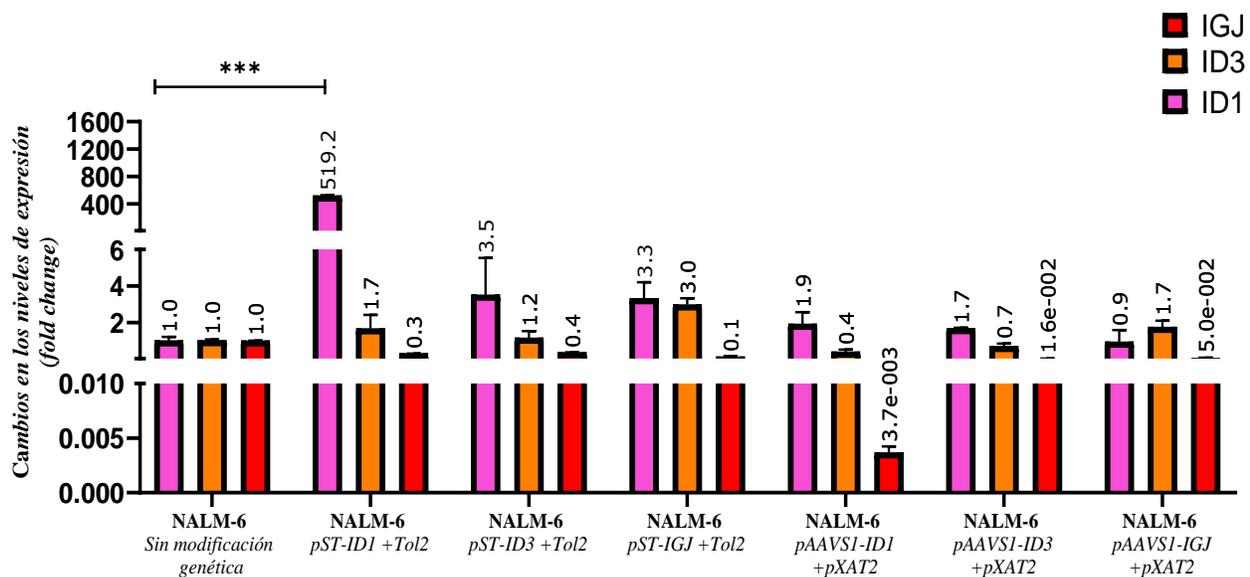


En las líneas modificadas genéticamente HEK293 con ambos sistemas se evidencia el incremento en la expresión de los genes de interés. Sin embargo, el patrón de expresión es variable pero muestra un aumento concomitante de los genes *ID1* e *IGJ*, incluso en la línea pST-ID3 (**Figura 14**), lo que sugiere una relación regulatoria entre estos dos genes en las líneas transgénicas HEK293. Sorprendentemente, en las líneas modificadas genéticamente NALM-6 no se evidenció esta relación y solo se observó la sobreexpresión del gen *ID1* en la línea NALM-6 pST-ID1 (Cambio de nivel de expresión de  $519,17 \pm 7,53$ ) (**Figura 15**). Estos resultados revelan un nivel de complejidad específico para el tipo celular NALM-6 que no habíamos anticipado en nuestro trabajo de investigación.

El siguiente paso en la caracterización de nuestras líneas transgénicas consistió en la evaluación de la expresión de las proteínas provenientes de los transgenes en las 12 líneas celulares transfectadas.

**Figura 15.**

Las líneas transgénicas NALM-6 no sobreexpresan significativamente los genes de la firma génica a excepción de *pST-ID1*. El ARN se obtuvo a partir de  $1 \times 10^6$  células y se convirtió cDNA. Los niveles de expresión se cuantificaron por SYBR-Green, usando como gen de referencia *GAPDH*.



### 5.2.2 Análisis de western Blot de las líneas celulares HEK293 y NALM-6 modificadas genéticamente con el sistema Tol2-transposasa y CRISPR/Cas9.

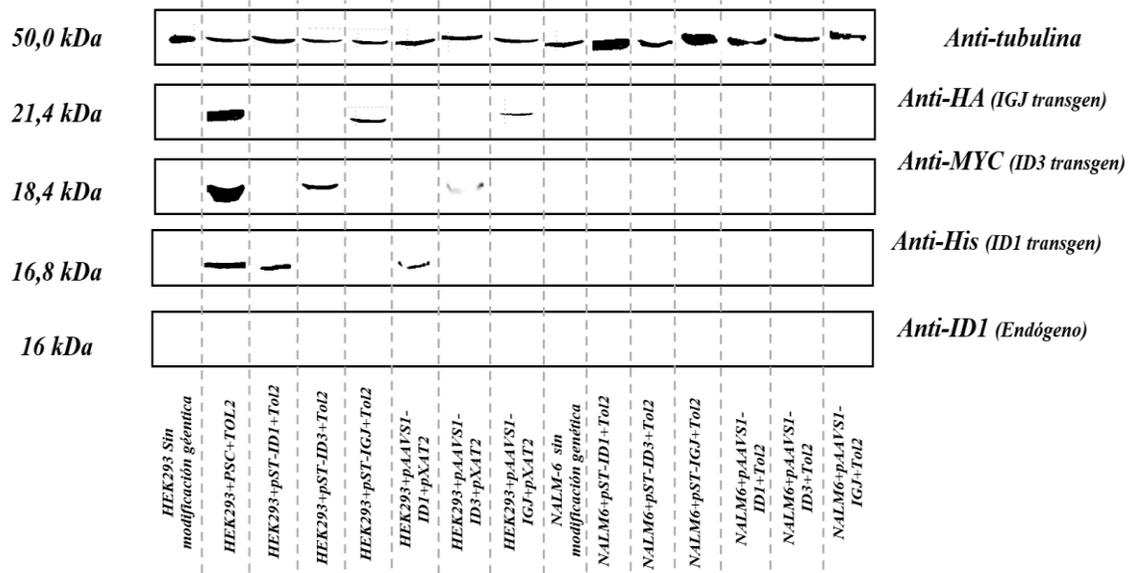
La presencia de las proteínas codificadas por el transgén fue evaluada por western blot en las líneas modificadas genéticamente HEK293 y NALM6, usando como control de carga la proteína beta tubulina, de 50 kDa. Como control positivo de expresión de los transgenes se usó la línea celular HEK293 pSC, generada en un trabajo previo de nuestra línea de investigación. La línea en cuestión tiene integrado el cassette policistrónico para la expresión simultánea de los 3 genes de la firma.

Las líneas celulares HEK293 modificadas genéticamente con los sistemas Tol2-transposasa y CRISPR/Cas9 expresan las proteínas de los transgenes en los tamaños esperados (**Figura 16**

izquierda). Sin embargo en las células NALM-6 modificadas genéticamente con estos mismos sistemas y con los mismos plásmidos, no se detectó expresión de ninguna proteína proveniente transgén (Figura 16 derecha).

### Figura 16.

En las diferentes líneas HEK293 se detecta la proteína transgénica de interés, sin embargo en las líneas NALM-6 no. Se realizó extracción de proteínas a partir de  $8 \times 10^6$  células, se tomó la fase soluble de los extractos y se corrieron en SDS-PAGE. La detección se hizo usando anticuerpos anti-His, anti-Myc, anti-HA, los cuales estaban dirigidos a los péptidos etiquetas de cada proteína.



Es necesario destacar que la extracción de las proteínas se realizó con el mismo número de semanas (3 semanas) para los 12 modelos y que no existió variación del protocolo entre ellos, por lo cual se podría plantear como hipótesis un mecanismo de silenciamiento en la línea NALM-6.

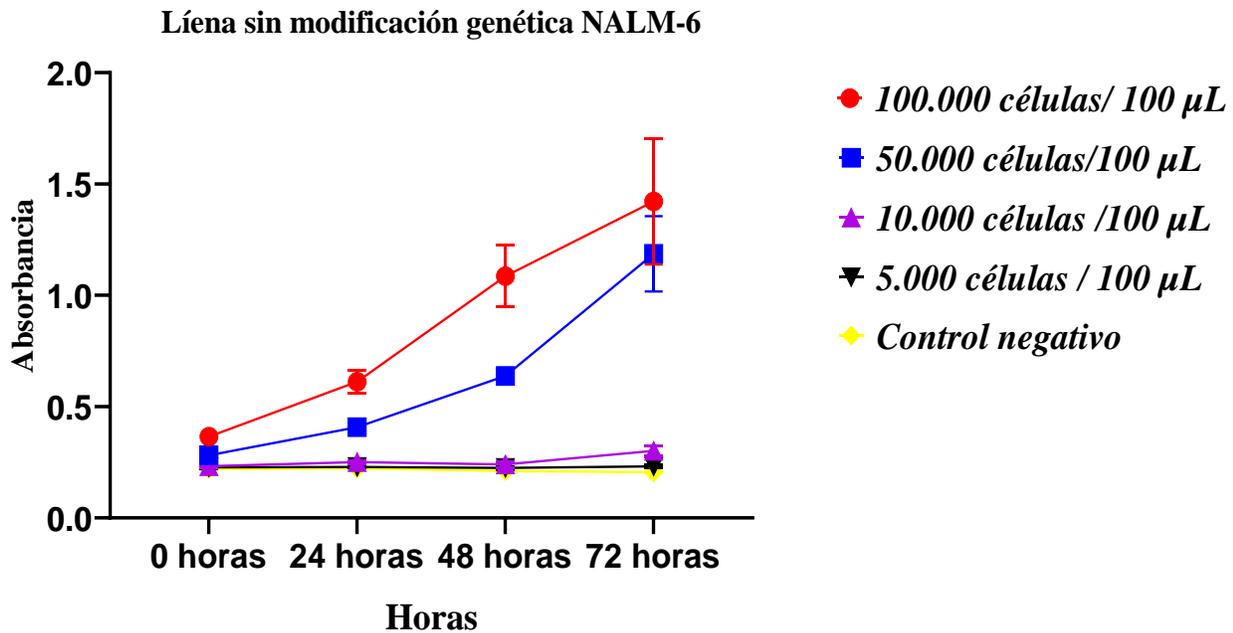
### 5.3 Resultados logrados para el objetivo específico 3

#### 5.3.1 Evaluación de la proliferación celular en los modelos genéticamente modificados con el sistema Tol2-transposasa y CRISPR/Cas9 en línea NALM-6.

La evaluación de la proliferación celular se realizó por métodos colorimétricos usando el reactivo de XTT. Para determinar la densidad celular apropiada para los análisis, se realizaron varias suspensiones de la línea NALM-6 sin modificación genética ( $5 \times 10^3$ -  $10 \times 10^5$  células/100 $\mu$ L) y la formación de la sal formazán se evaluó usando una longitud de onda 450 nm durante un periodo de 72 horas. La selección de la densidad celular apropiada se basó en la concentración que permitiera obtener valores de magnitudes diferenciales entre sí, sin que este valor superara la absorbancia de 1, ya que después de este valor se pierde la linealidad de la curva y la medición no es confiable (Abril Díaz et al., 2019). La densidad celular apropiada se determinó a 50.000 células/100  $\mu$ L (**Figura 17**).

#### **Figura 17.**

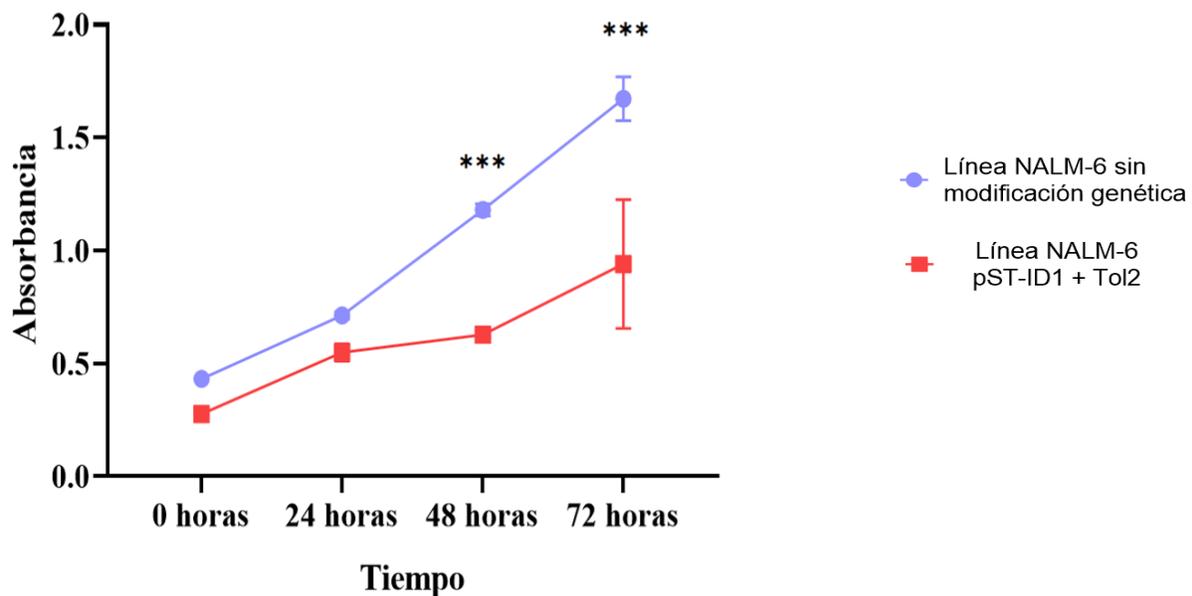
*El protocolo de proliferación celular se estandarizó usando diferentes densidades celulares iniciales. Se realizaron diferentes suspensiones celulares de la línea NALM-6. Se sembraron 100  $\mu$ L en pozos de placa de 96. Para cada día de medición, las células fueron incubadas por 4 horas con el reactivo XTT y posteriormente se realizó la lectura a una absorbancia de 450nm.*



La proliferación celular fue evaluada solamente en la línea estable NALM-6 pST-ID1, ya que esta fue la única de las 6 líneas generadas que mostró consistentemente altos niveles específicos del transcrito transgénico (*ID1*) aunque no así niveles detectables de la proteína transgénica (**Figura 14**). Notablemente, pudimos evidenciar una disminución significativa de la proliferación en esta línea celular (por ejemplo, los valores de OD<sub>450</sub> a 48 y 72h de esta línea fueron de  $0,627 \pm 0,013$  y  $0,941 \pm 0,258$  comparados con 1,18 y 1,671 en la línea no modificada genéticamente). Esto sugiere la existencia de un fenotipo de quiescencia propio de esta línea celular que puede deberse a algún mecanismo relacionado con la transcripción del transgén ID1, o debido a una alteración fisiológica causada por el sitio de integración del transgén en el genoma (**Figura 18**).

**Figura 18.**

La línea genéticamente modificada NALM-6 *pST-ID1* presenta una disminución significativa de la proliferación celular. Mediciones de la absorbancia a  $OD_{450}$  en células tratadas con XTT para la línea base (línea azul) o para la línea estable *pST-ID1* (línea roja) \*\*  $p < 0,002$  \*\*\*  $p < 0,001$



### 5.3.2 Evaluación del efecto de quimiorresistencia en los modelos genéticamente modificados con el sistema Tol2-transposasa y CRISPR/Cas9 en línea NALM-6.

Para evaluar el papel de la firma de expresión génica de mal pronóstico en la respuesta celular a fármacos convencionales en el tratamiento de LLA-B, se realizaron ensayos de quimiorresistencia a través de la evaluación de viabilidad celular utilizando las células NALM-6 con sobreexpresión del gen de interés y en células sin modificación genética, expuestas a diferentes concentraciones del agente quimioterapéutico.

Inicialmente se determinaron las concentraciones de quimioterapéutico que provocan una disminución de la viabilidad en la línea celular sin modificación genética durante un tiempo de análisis entre 0 y 72 horas. De esta manera, se evaluó un amplio rango de concentraciones de quimioterapéuticos y se seleccionaron aquellas concentraciones que reducían la viabilidad gradualmente (**Tabla 4**).

**Tabla 4.**

Selección de concentración de quimioterapéuticos\*

<b>Quimioterapéutico</b>	<b>Concentraciones</b>
<b>Citarabina</b>	25, 50,100,250 nM
<b>Dexametasona</b>	25, 50,100,250 nM
<b>Metotrexato</b>	5, 10, 50, 100 nM
<b>Doxorubicina</b>	0,75, 1, 10, 25 ng/mL
<b>Ciclofosfamida</b>	100,250,500, 1000 µg/mL

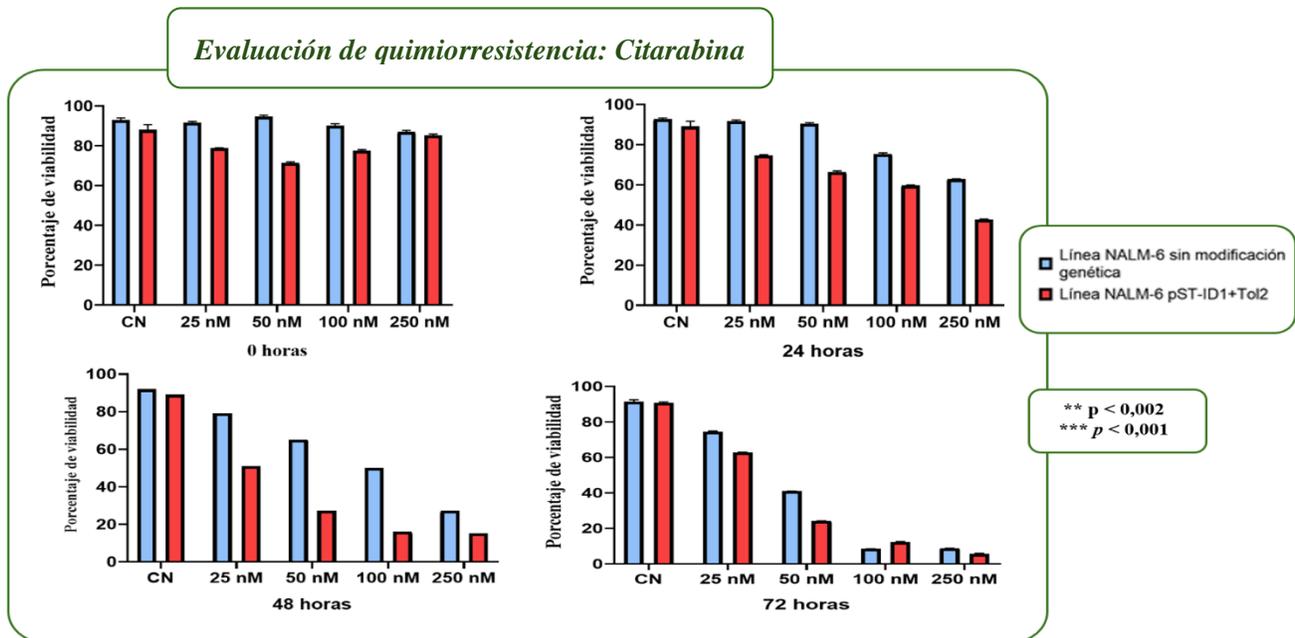
\*Las unidades de concentración para cada quimioterapéutico fueron establecidas de acuerdo a los valores previamente reportados en literatura para diferentes líneas celulares (Dehghan-Nayeri et al., 2017; Fernandes et al., 2020; Ghasemimehr et al., 2018; Kuznetsov et al., 2011; Zemanova et al., 2016).

Como se mencionó anteriormente, la línea NALM-6 pST-ID1 fue la única línea modificada genéticamente que mostró altos niveles de expresión del gen de interés, por lo cual la evaluación de quimiorresistencia se realizó solamente en esta línea estable (**Figura 19-23**). En comparación con las células NALM-6 sin modificación genética, las células con sobreexpresión del gen ID1 mostraron una

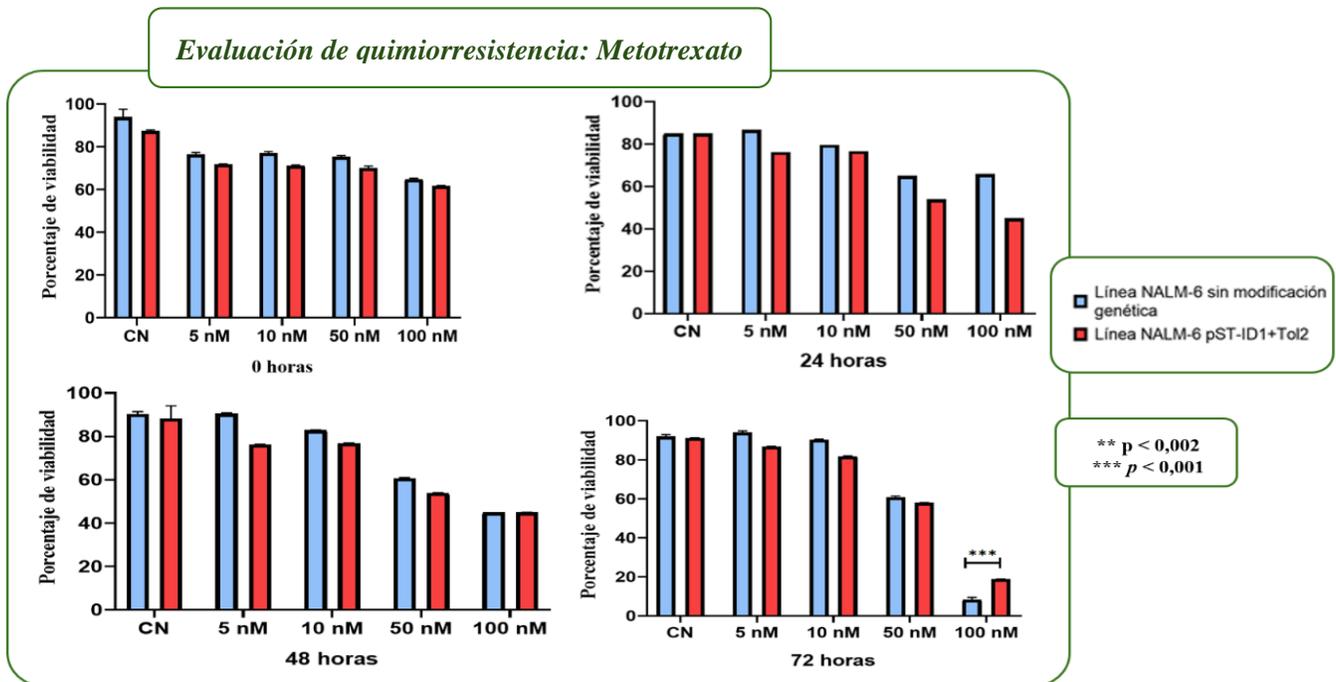
disminución de la sensibilidad celular a Dexametasona después de 24 y 48 horas con dosis incrementales de quimioterapia (**Figura 22**). Adicionalmente, como se muestra en la **figura 23**, La sobreexpresión del gen ID1 se asoció con porcentajes considerablemente más altos de células viables en comparación con las células sin modificación genética cuando las células fueron expuestas a 250 ug/mL, 500 ug/mL y 1000 ug/mL de ciclofosfamida a partir de las 24 horas de tratamiento. Estos resultados sugieren que la sobre-expresión de la firma génica podría tener un efecto inhibitorio sobre la apoptosis inducida por dexametasona y ciclofosfamida en células NALM-6. Lo cual además puede estar asociado con la quiescencia celular mostrada en la figura 18.

**Figura 19.**

*La viabilidad celular de la línea NALM-6 y NALM-6 pST ID1 tratadas con Citarabina decrece gradualmente con el tiempo y de manera similar a partir de una concentración de 25 nM. 5 x 10<sup>4</sup> células fueron sembradas en cada pozo, en triplicado, con concentraciones incrementales de Citarabina y se incubaron por 24, 48 y 72 horas. Al cabo del tiempo indicado, la viabilidad celular fue evaluada usando azul de tripán. \* $p < 0,033$ \*\*  $p < 0,002$  \*\*\*  $p < 0,001$*

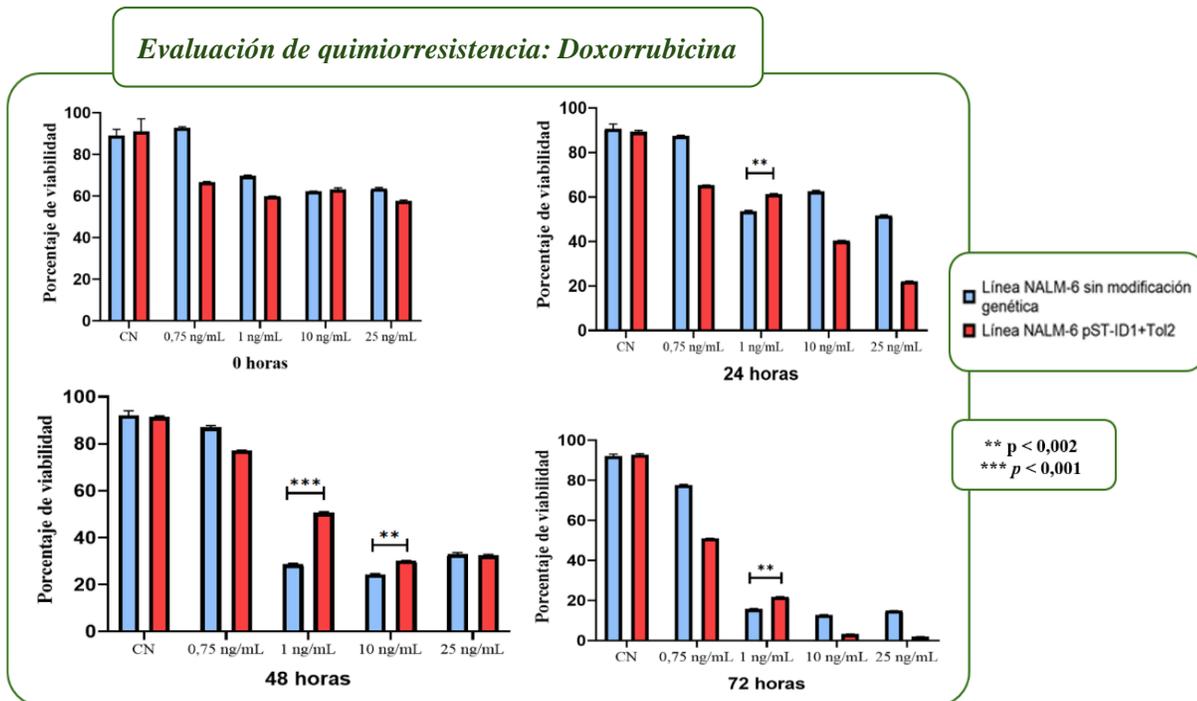
**Figura 20.**

La viabilidad celular de las líneas NALM-6 y NALM-6 pST ID1 tratadas con Metotrexato decrece gradualmente con el tiempo pero muestra una leve pero significativa diferencia a las 72h a 100 nM. 5 x 10<sup>4</sup> células fueron sembradas en cada pozo, en triplicado, con concentraciones incrementales de Metotrexato y se incubaron por 24, 48 y 72 horas. Al cabo del tiempo indicado, la viabilidad celular fue evaluada usando azul de tripán. \* $p < 0,033$  \*\*  $p < 0,002$  \*\*\*  $p < 0,001$



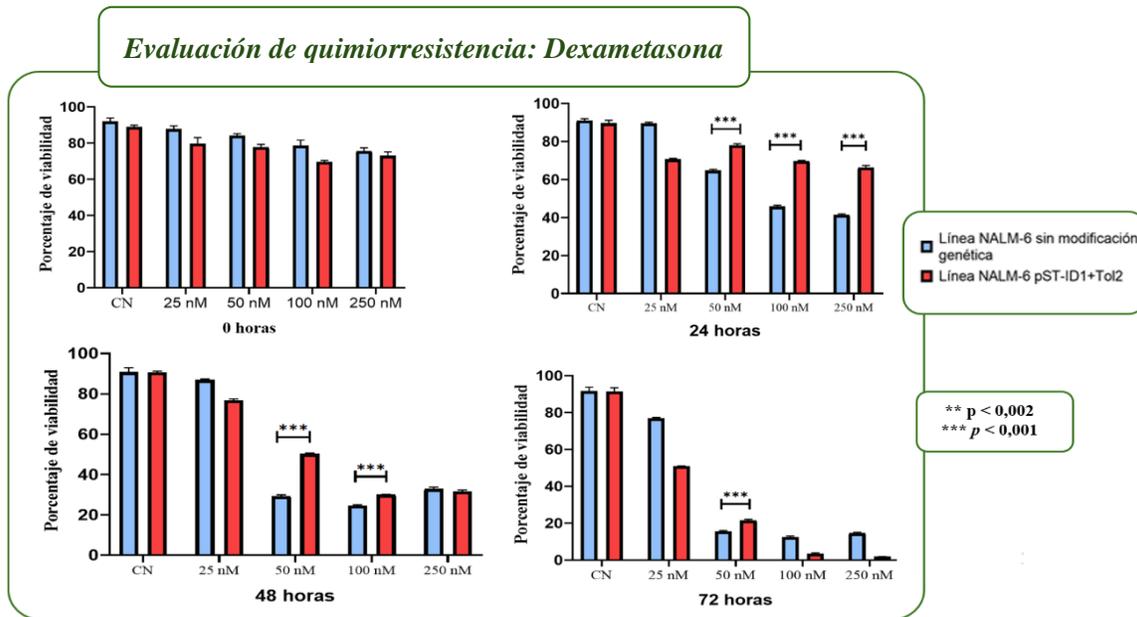
**Figura 21.**

La viabilidad celular de las líneas NALM-6 y NALM-6 pST ID1 tratadas con Doxorubicina decrece gradualmente con el tiempo y muestra diferencias leves pero significativas a una concentración de 1 ng/mL a partir de las 24h.  $5 \times 10^5$  células fueron sembradas en cada pozo, en triplicado, con concentraciones incrementales de Doxorubicina y se incubaron por 24, 48 y 72 horas. Al cabo del tiempo indicado, la viabilidad celular fue evaluada usando azul de tripán. \* $p < 0,033$ \*\*  $p < 0,002$  \*\*\*  $p < 0,001$



**Figura 22.**

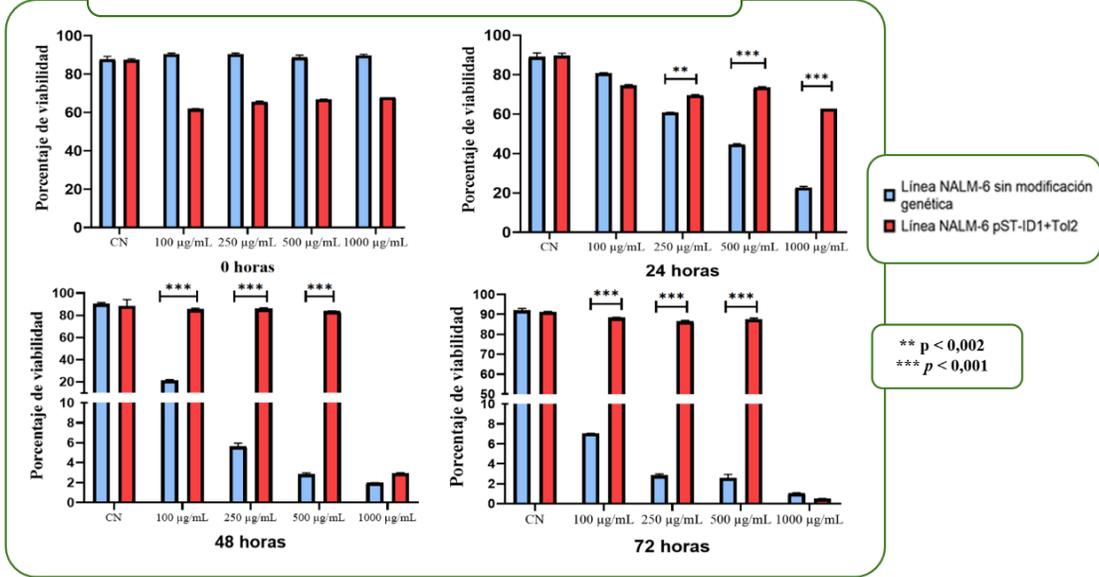
La viabilidad celular de las líneas NALM-6 y NALM-6 pST ID1 tratadas con Dexametasona decrece gradualmente con el tiempo y muestra diferencias significativas a una concentración de 50 nM a partir de las 24h.  $5 \times 10^4$  células fueron sembradas en cada pozo, en triplicado, con concentraciones incrementales de Dexametasona y se incubaron por 24, 48 y 72 horas. Al cabo del tiempo indicado, la viabilidad celular fue evaluada usando azul de tripán. Nótese un fenotipo consistente de resistencia de la línea NAML6-pST ID1 para las concentraciones de 50 nM, 100 nM y 250 nM a las 24h, aunque este fenotipo solo se observa para 50 nM a las 72h. \* $p < 0,033$  \*\*  $p < 0,002$  \*\*\*  $p < 0,001$



**Figura 23.**

La viabilidad celular de las líneas NALM-6 y NALM-6 pST ID1 tratadas con Ciclofosfamida decrece gradualmente con el tiempo y muestra diferencias significativas y sostenidas a concentraciones iguales o mayores de 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a partir de las 24h.  $5 \times 10^4$  células fueron sembradas en cada pozo, en triplicado, con concentraciones incrementales de Ciclofosfamida y se incubaron por 24, 48 y 72 horas. Al cabo del tiempo indicado, la viabilidad celular fue evaluada usando azul de tripán. Nótese un fenotipo consistente de resistencia de la línea NAML6-pST ID1 para las concentraciones de 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a partir de las 24h. \* $p < 0,033$ \*\*  $p < 0,002$  \*\*\*  $p < 0,001$ .

*Evaluación de quimiorresistencia: Ciclofosfamida*



## 6. Discusión

Uno de los principales desafíos en el tratamiento de la LLA es desarrollar enfoques terapéuticos específicos que tengan en cuenta la variabilidad de los determinantes biológicos de la enfermedad. En consecuencia, es necesario una mayor comprensión de la biología tumoral en individuos o grupos de individuos para desarrollar nuevos objetivos terapéuticos, aumentar la precisión de la estratificación del riesgo y mejorar la efectividad del tratamiento (Kowalczyk et al., 2020).

Las líneas celulares derivadas de cáncer humano son modelos apropiados para el estudio de los determinantes biológicos del cáncer ya que permiten evaluar hipótesis combinando estrategias de manipulación génica con tecnologías de alto rendimiento.

En este trabajo se utilizaron dos líneas celulares, HEK293 y NALM-6, para realizar las modificaciones genéticas deseadas. Estas líneas son isogénicas y permiten asociar cualquier cambio fenotípico de la célula al tipo de material genético con que se las modificó. Las células HEK293 son adherentes y fueron derivadas de células de riñón embrionario. Se ha reportado que a pesar de su origen epitelial, su maquinaria bioquímica es capaz de llevar a cabo la mayor parte del plegamiento y procesamiento post-traduccionales necesarios para generar proteínas funcionales y maduras a partir de un amplio espectro de ácidos nucleicos tanto de mamíferos como de no mamíferos (Thomas & Smart, 2005). Por otro lado, las células NALM-6 crecen en suspensión y son derivadas de un paciente de LLA en recaída en 1967. Específicamente, esta línea se ha convertido en una gran herramienta para estudiar mecanismos de crecimiento tumoral y metástasis, así como para evaluar los efectos de diversos fármacos. No obstante, la diferencia de su crecimiento presentó un reto en cuanto a la introducción del material genético.

A diferencia de la transfección de líneas celulares adherentes donde existen varios reportes, la transfección en líneas celulares en suspensión aún sigue siendo materia de estudio, generando nuevas estrategias para superar limitaciones (Maeder & Gersbach, 2016). Por tal razón, se empleó un protocolo de electroporación adaptado de una metodología previamente utilizada por nuestro grupo de investigación para transfección de líneas celulares en suspensión (Cardona et al., 2016).

Las células transfectadas en ambos casos fueron seleccionadas mediante la adquisición de resistencia a puromicina. En cuanto a los sistemas de integración, nosotros usamos el sistema Tol2-transposasa, que puede generar múltiples integraciones en el genoma, y el sistema CRISPR/Cas9<sub>AAVS1</sub>, que se inserta de manera específica en el cromosoma 19 humano. Ambos sistemas permitieron generar líneas estables resistentes a puromicina. En el caso de las líneas generadas mediante el sistema Tol2-transposasa, la resistencia a puromicina viene dada por la expresión de un cassette policistrónico GFP-T2A-puromicina regulado por el promotor constitutivo EF1a. Es de notar que, si bien las células HEK293 y NALM-6 generadas por este sistema generaron resistencia a puromicina, solo las células HEK293 presentaron una expresión evidente de la GFP (**Figura 11**).

Este fenómeno fue confirmado mediante citometría de flujo, en donde se vio una expresión apenas mayor que las líneas no modificadas. Este resultado es intrigante teniendo en cuenta que la GFP es el primer gen del policistrón separado de la puromicina por el péptido viral T2A. Nosotros creemos que los bajos niveles de expresión del policistrón son suficientes para conferir resistencia a la puromicina pero no son suficientes para poder detectar la GFP por microscopía de fluorescencia.

Para el sistema CRISPR/Cas9<sub>AAVS1</sub>, la resistencia a puromicina solo se produce si el transgén se inserta de manera correcta en el genoma por recombinación homóloga (ver arriba). Las líneas generadas fueron resistentes a puromicina y no pueden proliferar si el plásmido pAAVS1 no es cotransfectado con la Cas9-ARNg/AAVS1.

Adicionalmente para el caso de las líneas HEK293 modificadas genéticamente se observó un aumento en el número de células GFP positivas con el transcurso del tiempo de evaluación (**Figura 11**). No obstante, para el sistema Tol2-transposasa no se puede asegurar que la expresión de GFP y la resistencia a puromicina sean exclusivamente de la expresión integrada en el genoma, sino que provenga de la expresión episomal. En estudios posteriores, demostramos la presencia de episomas con cebadores dirigidos al gen de resistencia de Ampicilina. Las muestras de ADN genómico extraídas a la tercera semana después de la transfección de la línea celular NALM-6 pST-ID1, pST-ID3 e pST-IGJ se sometieron a amplificación por PCR de punto final, donde obtuvimos para las 3 condiciones amplificado esperado de aproximadamente 400bp (**Figura suplementaria 4**). Este resultado demuestra la presencia de la total integridad del plásmido.

Diferentes estudios han reportado que las líneas celulares de mamíferos pierden eventualmente el plásmido de forma episomal, ya que este no se transmite eficientemente a las células hijas (Xuan Wang et al., 2016). Además, los protocolos de transfección que se estandarizaron no logramos asegurar la presencia de ambos plásmidos en la misma célula, constructo de Tol2 (*pST-ID1*, *pST-ID3* e *pST-IGJ*) y el plásmido pCS2-transposase.

Para el sistema de CRISPR/Cas9 este problema no se evidenció debido que la integración en el genoma en locus AAVS1 permitía a la célula la adquisición de resistencia a puromicina y la expresión de manera episomal no ocurría (**figura 10**). Por lo cual este indicador si lograba diferenciar las líneas HEK293 y NALM-6 modificadas genéticamente, mostrando una mayor ventaja que el sistema Tol2-transposasa.

A diferencia de la lipofección, la electroporación de líneas celulares en suspensión genera una población mixta de células viables y no viables en el medio de cultivo por lo cual la selección de solamente de las células viables es necesario para continuar los estudios posteriores. Existen varias

alternativas para la separación de estas dos poblaciones, pero en su gran mayoría requieren equipos o insumos de alto costo. Se logró estandarizar exitosamente una metodología de separación celular con base en su densidad utilizando el reactivo OptiPrep. Este protocolo permitió separar las células NALM-6 viables transfectadas con el sistema Tol2-transposasa y CRISPR/Cas9 resistentes a puromicina.

Las líneas NALM-6 modificadas con el sistema Tol2-transposasa no mostraban una expresión significativa de la GFP en comparación con la línea NALM-6 sin modificación genética. Este resultado es diferente a lo obtenido en las líneas HEK293 modificadas genéticamente (**Figura 11**), en donde la expresión de la GFP se evidenció fácilmente por microscopia de fluorescencia.

Teniendo en cuenta que el gen *GFP* se encuentra antes del gen resistencia a puromicina (*PuroR*) y bajo la regulación del promotor constitutivo factor de elongación 1 ( $EF-1\alpha$ ) no se comprende muy bien los resultados obtenidos en la línea NALM-6 (Xiaoyin Wang et al., 2017). Se plantea la hipótesis que las células podrían estar silenciando la expresión del gen *GFP* por un mecanismo diferente a la metilación de regiones promotoras o modificación de histonas, posiblemente este sea un silenciamiento a nivel postranscripcional (ARN interferente) o incluso postraduccionales (modificaciones postraduccionales). Para evaluar esta hipótesis es necesario emplear un anticuerpo específico dirigido contra la proteína GFP o diseñar cebadores para amplificar el ARN mensajero de la GFP mediante RT-qPCR.

A pesar de que no todos los resultados de verificación de transfección fueran los esperados en las líneas NALM-6 modificada genéticamente, se realizó la evaluación de la presencia de los transgenes a nivel de ADN genómico para ambos sistemas de integración. Se demostró que los modelos transfectados contenían los transgenes de interés, a diferencia de la línea sin modificación genética, y además presentaban una diferencia de intensidad del amplicón, representando probablemente el número de copias del transgén por célula (**Figura 13**).

En los análisis de expresión génica y proteica se encontraron diferencias para ambos modelos celulares. En cuanto a la expresión génica en las líneas HEK293 se observó un aumento de la expresión del gen de interés, sin embargo en las 6 líneas modificadas genéticamente este aumento fue variable y, en general, la expresión de los genes *ID1* e *IGJ* aumentaban de manera concomitante pero con diferentes magnitudes. *En la línea pST-ID1 un cambio de expresión del gen ID1 y del gen IGJ de  $154,37 \pm 4,539$  vs  $207.235 \pm 54,21$  respectivamente, así mismo para la línea pST-ID3 ( $287,71 \pm 102.362$  vs  $4127,92 \pm 724,6$ ), línea pST-IGJ ( $8,3 \pm 0,28$  vs  $5829,349 \pm 1771,92$ ), línea pAAVSI-ID1 ( $1283,49 \pm 425,97$  vs  $18186,17 \pm 712,904$ ), línea pAAVSI-ID3 ( $8,29 \pm 1,53$  vs  $37,66 \pm 10,741$ ) y línea pAAVSI-IGJ ( $3,37 \pm 0,72$  vs  $41,41 \pm 13,936$ ).*

Lo anterior demuestra que si bien la tendencia de aumento *ID1* e *IGJ* se mantiene en esta línea celular, esta no sigue una misma relación. Si bien, en todos los casos el gen *IGJ* obtuvo mayor aumento de expresión, se desconoce la razón biológica de este aumento. Se podría sugerir la hipótesis que el gen *IGJ* esté involucrado en un tipo de mecanismo celular de defensa frente material foráneo. Sin embargo esta hipótesis preliminarmente fue evaluada incorporado un plásmido diferente a los creados en esta investigación, donde se encontró la ausencia del aumento de expresión del gen *IGJ*.

La expresión concomitante se podría explicar debido a que la naturaleza la proteína *ID1* es interactuar con diferentes proteínas, entre ellos, factores de transcripción donde posiblemente en este caso, esté inhibiendo al inhibidor de la expresión del gen *IGJ*. Por lo cual tendría sentido que la sobreexpresión de *ID1* e *IGJ* se esté dando de manera simultánea. Sin embargo, no se comprende muy bien cómo la expresión del gen *IGJ* aumenta la expresión del gen *ID1*, por lo cual otros estudios serían requeridos.

Así mismo, la sobreexpresión de *ID1* en los modelos donde el aporte de copias supernumerarias era para el gen *ID3* puede deberse a una regulación cruzada de *ID3* sobre *ID1*, y la autorregulación de

ID1. Estos dos genes tienen funciones complementarias y se ha reportado que las proteínas ID1 e ID3 son necesarias para mantener el estado indiferenciado de las células dentro del nicho de la médula ósea, la supervivencia celular y la regeneración de las células madre leucemogénicas (Gadomski et al., 2020).

Los niveles de cambio de expresión génica en la línea NALM-6 no concuerdan con lo anteriormente mencionado debido a que solo se obtuvo sobreexpresión del gen *ID1* en la línea NALM-6+pST-ID1. Adicionalmente, en esta línea no se observa una sobreexpresión del gen *IGJ* en comparación del gen *ID1* ( $519,17 \pm 7,53$  vs  $0,29 \pm 0,01$ ) Esto demuestra un comportamiento celular específico y destaca la importancia de evaluar la sobreexpresión de estos genes en una línea con las características celulares de linfoblasto. Al momento de la escritura de este manuscrito, existen varios reportes sobre el funcionamiento de las proteínas de la familia ID en procesos tumorales, a pesar de ello este es el primer reporte que estudia la relación de estas proteínas con el gen *IGJ* en modelos neoplásicos.

Es necesario mencionar que la línea de estudio NALM-6 fue aislada de un paciente adulto norteamericano de 19 años y debido a que no se cuenta con una línea celular comercial con características genéticas de población colombiana, esto podría representar una limitación en nuestro trabajo de investigación. Como se mencionó previamente, las características genéticas propiamente étnicas son importante en la biología tumoral y su respuesta al tratamiento.

En cuanto a la expresión proteica de los transgenes, se observó presencia de las proteínas provenientes de los transgenes entre los dos sistemas de integración en las líneas modificadas genéticamente HEK293 (**Figura 16**). No obstante, sin importar el sistema de integración los resultados obtenidos para las líneas NALM-6 modificadas genéticamente fueron negativos y no se evidencia proteína alguna proveniente de los transgenes. Este resultado es interesante porque el gen de interés está regulado por un promotor diferente al del gen de selección. En este caso el promotor es el CMV, de origen viral (ver arriba).

Nuestra hipótesis, y lo encontrado en la literatura hasta el momento de esta revisión, es que el promotor de genes tempranos-intermedios de Citomegalovirus Humano (pCMV) sufre con el tiempo algún mecanismo de silenciamiento (X. Yu et al., 2017). Varios estudios han demostrado que la metilación del promotor CMV está correlacionado con silenciamiento transcripcional en diversas líneas celulares. Debido a lo anterior, se han buscado promotores alternativos eucarióticos que produzcan niveles similares de expresión al CMV (Ebadat et al., 2017; Zúñiga et al., 2019).

Por lo tanto, esta observación, junto con los resultados del posible silenciamiento de la GFP en el sistema Tol2, sugerimos un complejo fenómeno de silenciamiento causado por este elemento viral. En experimentos realizados en nuestra línea de investigación, hemos encontrado que el reemplazo del promotor CMV por un promotor el sintético TREG, regulado por doxiciplina, reestablece la expresión de la GFP del sistema Tol2 en células NALM-6 (datos no mostrados).

El hecho de no encontrar la expresión de la proteína proveniente del transgén no nos desmotivó para seguir trabajando en nuestra hipótesis de trabajo, debido a que los anticuerpos que se usaron solo estaban dirigidos a los péptidos etiquetas de cada gen de interés, que en el caso del gen *IDI* era el péptido 6xHis. Se intentó realizar la detección de la proteína endógena utilizando un anticuerpo comercial anti-ID1, sin embargo, los resultados no fueron concluyentes ya que se detectó una banda de 70 KDa en vez de la banda esperada de 16kDa.

Como no pudimos verificar la presencia de la proteína con otro tipo de anticuerpo, creemos que la sobreexpresión observada en qPCR (Cambio de nivel de expresión  $519,17 \pm 7,53$ ) (**Figura 15**) se debe principalmente a la expresión endógena del gen. Los datos obtenidos hasta este punto no descartan la posibilidad de que existan cantidades mínimas de proteína transgénica no detectables por western blot y que estas sean la causa de los fenotipos encontrados.

Adicionalmente, el hecho de poder detectar proteínas transgénicas en células HEK293 demuestra que existe un mecanismo de silenciamiento del transgén específico de la línea celular NALM-6, que a su vez podría estar relacionado a mecanismos de metilación de regiones promotoras, modificación de histonas o incluso que este sea un silenciamiento a nivel postranscripcional (ARN interferente) o incluso postraduccionales (modificaciones postraduccionales).

Así mismo, en estudios preliminares realizados con modelos celulares transitorios, demostramos que sí es posible sobreexpresar los tres genes en el modelo celular NALM-6 utilizando plásmidos con la expresión de cada gen de forma episomal (Transitoria) (**Figuras suplementarias 1-3**). Se encontraron que los niveles de expresión eran altos a las 48 horas, y que posterior a este tiempo, la expresión del transcrito disminuía al analizarse por medio de RT-qPCR, además se encontró la sobreexpresión simultánea de los genes *ID1* e *IGJ*. Esto destaca la importancia de generar líneas de expresión estables y de buscar otras alternativas de expresión, como por ejemplo la expresión inducible de estos genes.

A pesar de que no fue posible demostrar la expresión de las proteínas provenientes directamente de los transgenes en NALM-6, nuestra hipótesis de trabajo era sobreexpresar los genes de la firma génica en este modelo celular, lo cual se logró en la línea celular pST-ID1. Por lo cual fue la única línea que se siguió trabajando para la evaluación de la proliferación celular y quimiorresistencia.

Al realizar la evaluación de proliferación celular en el modelo de NALM-6 pST-ID1, encontramos una proliferación celular reducida tras 48 y 72 horas, en comparación con la línea sin modificación genética (**Figura 18**). Existen dos explicaciones para este fenómeno, el primero es que sea un fenotipo de quiescencia otorgada por el aumento de la expresión del gen de interés. Recientemente se ha reportado que la expresión del gen *ID1* controla el equilibrio entre los estados de reposo y la proliferación de las células gliales radiales (CRG) (G. Zhang et al., 2020). En ese mismo estudio se

demostró que la expresión forzada de ID1 provocaba la quiescencia de las células madre neurales, mientras que el knockdown de ID1 aumenta el número de CGR proliferantes (G. Zhang et al., 2020).

Además, se ha reportado que el aumento de expresión del gen *RUNX1* mantiene el estado célula madre en modelos de células epiteliales de cáncer de ovario a través de la regulación positiva de los genes *ID1* e *ID3*, así mismo la resistencia a los quimioterapéuticos cisplatino y paclitaxel través de la regulación positiva de la proteína *BCL2* (Dhadve & Ray, 2022).

En nuestro estudio las células con sobre-expresión del gen ID1 demostraron ser más resistentes al tratamiento con ciclofosmida y dexametasona. Estos resultados podrían sugerir una posible resistencia a la terapia antiproliferativa conferida por el gen ID1 manteniendo un estado quiescente y una disminución de la entrada de las células a la fase S del ciclo celular como un posible mecanismo de evasión a la quimioterapia.

La segunda explicación es que el sitio de integración haya ocurrido en un lugar crítico para la fisiología de la célula y que no sea un efecto específico de la sobreexpresión del gen de interés.

Estos resultados son interesantes ya que se ha reportado en otros tipos de cáncer, que existen alteraciones en vías de señalización celular que involucra a los genes *ID* como la causa del aumento de división celular (Cáncer de próstata, Carcinoma hepatocelular, Cáncer de ovario, Cáncer de páncreas, Cáncer de esófago, Cáncer de pulmón, Cáncer de mama). Entre las vías alteradas encontramos inactivación de la vía p16INK4a/pRB responsable del incremento de la proliferación celular en próstata (María del Carmen Lagunas Cruz et al., 2014; Roschger & Cabrele, 2017) y el carcinoma hepatocelular (Yin et al., 2017)

Cheuk Man Hui et al., demostraron que la expresión de ID1 en células transfectadas de carcinoma de células escamosas de esófago condujo a una regulación positiva de MDM2 en los clones generados.

La proteína MDM2 es una oncoproteína que puede regular negativamente p53 bloqueando su actividad transcripcional o promoviendo su degradación (Hui et al., 2006).

Recientemente se ha reportado en células carcinoma de escamosas del esófago (ESCC) resistentes a 5-fluorouracilo (5-FU) muestran bajos niveles de microARN (miR)-338-5p, pero de manera interesante, la expresión forzada de miR-338-5p en estas células dio como resultado una regulación a la baja del gen *ID1* y la restauración de la sensibilidad tanto *in vitro* como *in vivo* al tratamiento con 5-FU (Han et al., 2019).

La evaluación de viabilidad celular mediante la metodología de azul de tripán nos permitió observar el cambio del porcentaje de células vivas en las diferentes concentraciones de los quimioterapéuticos Citarabina, Metotrexato, Doxorrubicina, Ciclofosfamida y Dexametasona (**Figuras 19-23**). En la línea NALM-6 pST-ID1 se observó un mayor porcentaje de viabilidad a diferentes concentraciones de los quimioterapéuticos Metotrexato, Doxorrubicina, Ciclofosfamida y Dexametasona por la metodología de azul tripán.

Si bien el mecanismo biológico por el cual se está confiriendo una mayor resistencia a estos agentes quimioterapéuticos no está del todo claro ni reportado, una posible explicación para la resistencia otorgada por el aumento de expresión del gen *ID1* a los glucocorticoides como Dexametasona, es a través de la reprogramación metabólica. Se ha descrito una disminución en la síntesis de ácidos grasos de novo, disminución de la vía AMPK, mTORC1, glucólisis y la pérdida de la receptor de glucocorticoides en línea celular (Li et al., 2021).

Teniendo en cuenta que quimioterapéuticos como el Metotrexato, inhibidor competitivo de la dihidrofolato-reductasa, y la Doxorrubicina, interfiere con las enzimas involucradas en la replicación de ADN durante el ciclo celular, es posible que la sobreexpresión del gen *ID1* esté relacionado a la

adquisición del fenotipo de quiescencia, y por consiguiente incrementa la viabilidad celular en presencia de estos quimioterapéuticos gracias a una menor tasa de replicación celular.

La Ciclofosfamida y Citarabina actúan principalmente generando daño directo al material genético. Desconocemos las razones de estos resultados, pero sugerimos que la línea modificada presenta mecanismos de inactivación y/o eflujo de estos agentes químicos. De manera alternativa, estas células pueden tolerar mejor los daños al ADN, de manera similar a lo reportado en otros estudios (Ghorbani et al., 2015).

Es importante resaltar la importancia de la firma génica, debido a que es posible que el mayor efecto de resistencia y quiescencia sea otorgada por la expresión concomitante de los 3 genes. No obstante, en nuestra investigación no se logró evaluar el aumento de la expresión del gen *ID3* e *IGJ*, pero se sugiere un posible papel de estos genes en la resistencia al tratamiento y que en conjunto con *ID1*, otorguen un fenotipo completo de resistencia a los tratamientos convencionales.

Finalmente, con los resultados obtenidos se demuestra que la sobreexpresión de los genes de esta firma génica de mal pronóstico en células NALM-6 es algo complejo y diferente a las células adherentes HEK293. El tipo de elemento regulatorio de la expresión de los genes de interés no es extrapolable entre los dos tipos de células. La línea celular que mostró cambios en la expresión del transcrito presentó cambios en el fenotipo de quimiorresistencia y proliferación celular. Este estudio contribuye a revelar la importancia de uno de los tres genes de la firma génica que puede estar influyendo en la menor supervivencia de pacientes colombianos.

## 7. Conclusiones

En el presente trabajo a) generamos constructos genéticos mediante la tecnología del ADN recombinante para la expresión constitutiva de los genes *ID1*, *ID3* e *IGJ*, b) modificamos genéticamente líneas celulares HEK293 adherentes y NALM-6 leucémicas no adherentes, usando el sistema Tol2-Transposasa y CRISPR/Cas9, c) observamos claras diferencias de expresión, a nivel transcripcional y traduccional, de los diferentes genes presentes en los cassettes integrados (el gen de interés y el gen reportero GFP) y d) la única línea transgénica NALM-6 que mostró sobreexpresión transcripcional, pST-ID1, disminuye su proliferación y muestra fenotipos variables de quimioresistencia, aunque logramos observar resultados consistentes de resistencia a dexametasona (*50 nM*, *100 nM* y *250 nM*) y ciclofosfamida (*250 µg/mL*, *500 µg/mL* y *1000 µg/mL*). Si bien no logramos evaluar la quimiorresistencia de la firma génica completa, debido a la carencia del modelo con sobreexpresión de los genes (*ID3* e *IGJ*) y todos en conjunto, los datos obtenidos nos motivan a seguir trabajando para esclarecer el papel de la firma génica de mal pronóstico y los procesos de recaída en pacientes con LLA.

Anexos

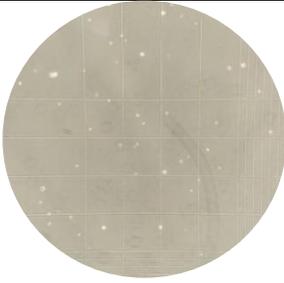
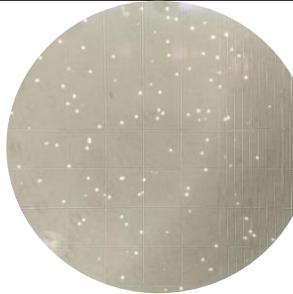
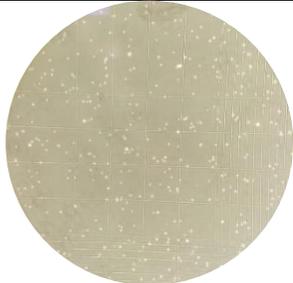
ANEXO 1. Secuenciación de los constructos de recombinación homóloga (CRISPR) y sistema Tol2-Transposasa.

<p><b>pAAVS1-ID1</b></p>	
<p><b>pAAVS1-ID3</b></p>	
<p><b>pAAVS1-IGJ</b></p>	
<p><b>pST-ID1</b></p>	
<p><b>pST -ID3</b></p>	
<p><b>pST -IGJ</b></p>	

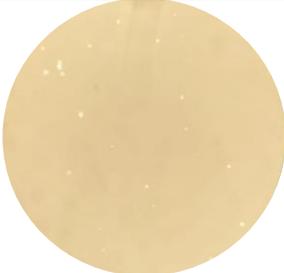
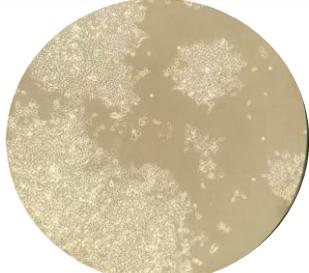
ANEXO 2. Purificación con medio de puromicina línea NALM-6 y HEK293.

NALM-6

<p>CN</p>	<p><i>pST-ID1+Tol2</i></p>	<p><i>pST -ID3+Tol2</i></p>	<p><i>pST -IGJ+Tol2</i></p>
<p><i>Viabilidad celular</i></p>			
<p>&gt;1%</p>	<p>91%</p>	<p>93%</p>	<p>94%</p>

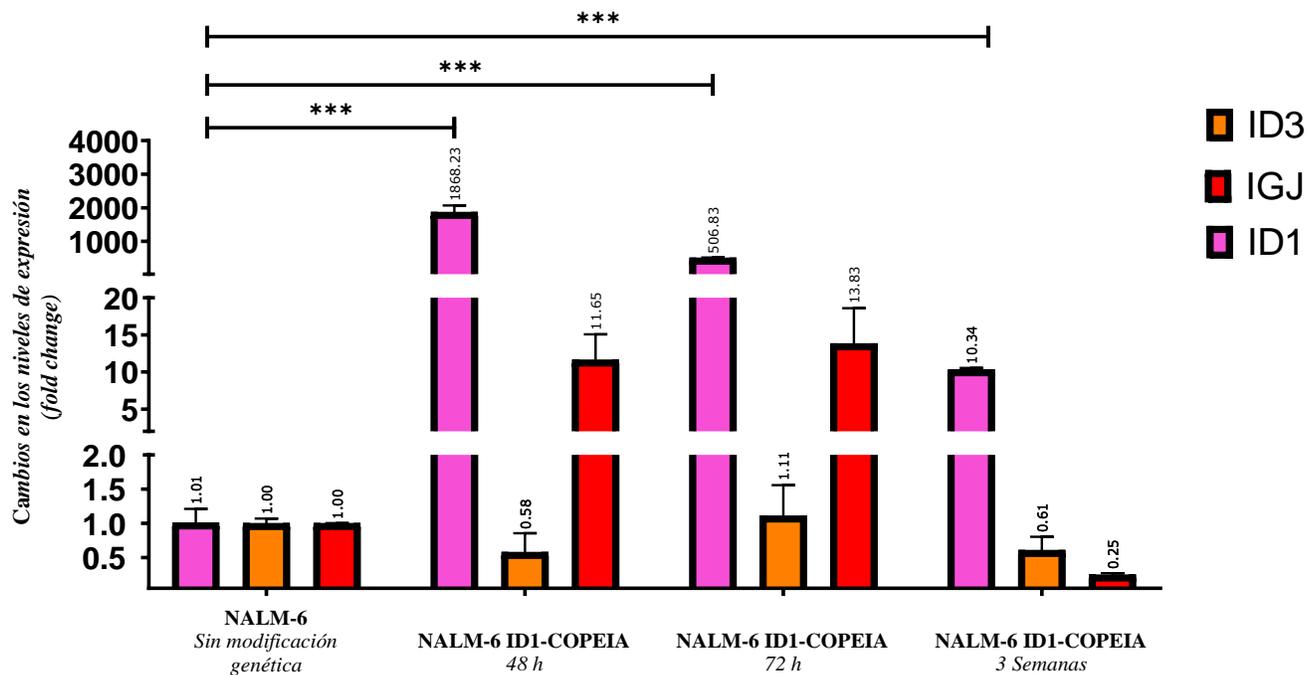
CN	<i>pAAVS1-ID1+pXAT2</i>	<i>pAAVS1-ID3+pXAT2</i>	<i>pAAVS1-IGJ+pXAT2</i>
			
<i>Viabilidad celular</i>			
>1%	89%	94%	91%

HEK293

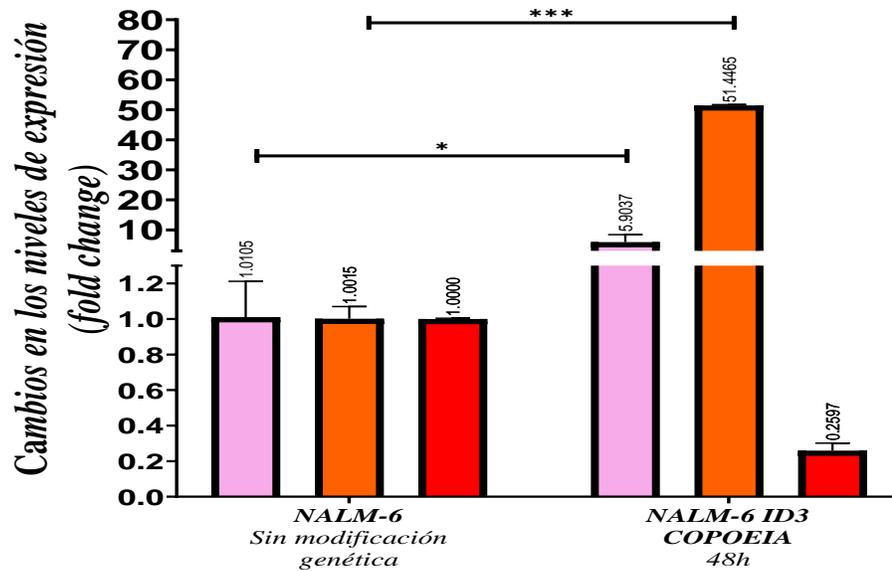
CN (día 3)	<i>pST-ID3+Tol2</i> (día 3)	<i>pST-ID3+Tol2</i> (día 7)	<i>pST-ID3+Tol2</i> (día 14)
			
<i>Confluencia por campo observado de 10x</i>			
<1%	30%	60%	>90%
CN (día 3)	<i>pAAVS1-ID3+pXAT2</i> (día 3)	<i>Paavs1-ID3+pXAT2</i> (día 7)	<i>pAAVS1-ID3+pXAT2</i> (día 14)
			
<i>Confluencia por campo observado de 10x</i>			
<1%	20%	40%	70%

**Figura suplementaria 1**

En las líneas transgénicas NALM-6 con expresión transitoria del plásmido *ID1-COPEIA*, la expresión relativa de los genes *ID1* e *IGJ* aumenta aunque lo hace de manera diferencial a las 48 y 72 horas. No obstante, al mes solo se mantiene la sobreexpresión del gen *ID1*. El ARN se obtuvo a partir de  $1 \times 10^6$  células y se convirtió cDNA. Los niveles de expresión se cuantificaron por SYBR-Green, usando como gen de referencia *GAPDH*. \* $p < 0,033$  \*\*  $p < 0,002$  \*\*\*  $p < 0,001$

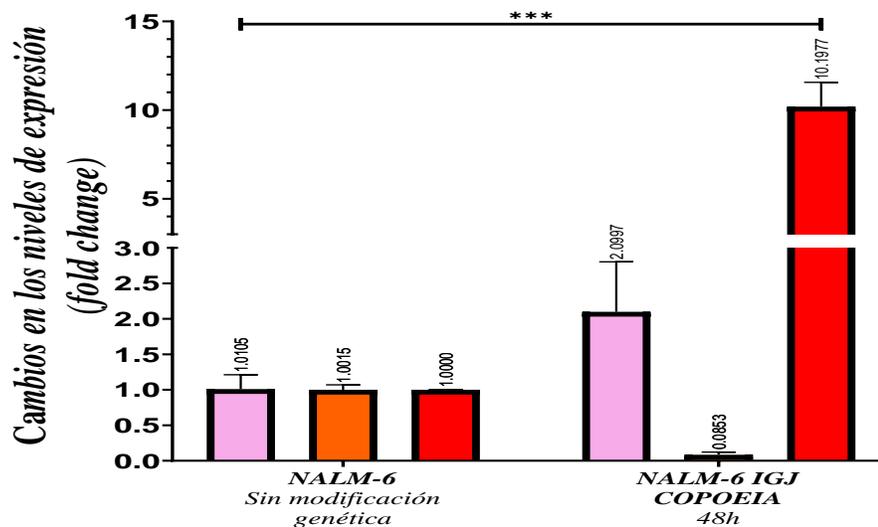
**Figura suplementaria 2**

En las líneas transgénicas NALM-6 con expresión transitoria del plásmido *ID3-COPEIA*, la expresión relativa de los genes *ID1* e *ID3* aumenta aunque lo hace de manera diferencial. El ARN se obtuvo a partir de  $1 \times 10^6$  células y se convirtió cDNA. Los niveles de expresión se cuantificaron por SYBR-Green, usando como gen de referencia *GAPDH*.



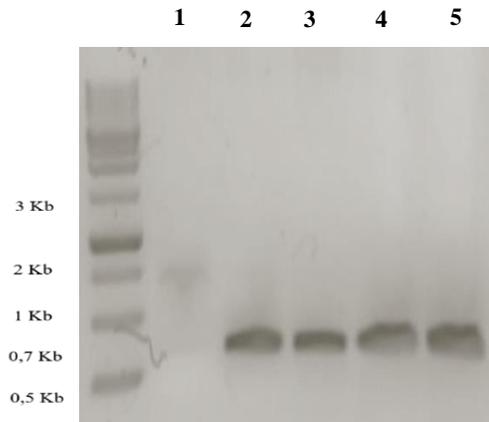
### Figura suplementaria 3

En las líneas transgénicas NALM-6 con expresión transitoria del plásmido IGJ-COPEIA, la expresión relativa de los genes *ID1* e *IGJ* aumenta aunque lo hace de manera diferencial. El ARN se obtuvo a partir de  $1 \times 10^6$  células y se convirtió cDNA. Los niveles de expresión se cuantificaron por SYBR-Green, usando como gen de referencia *GAPDH*.



**Figura suplementaria 4**

*El amplificado proveniente del gen de resistencia a Ampicilina (AmpR) se detecta en los modelos transfectados con el sistema Tol2-Transposasa. Indicando así, la presencia episomal del plásmido en las líneas celulares pST-ID1, pST-ID3 e pST-IGJ.*



**1:** Control Negativo de la PCR, **2:** pST-ID1, **3:** pST-ID3, **4:** pST-ID1 y **5:** Control positivo de la PCR (*molde plásmido pST-ID3*).

**Referencias bibliográficas**

- Abril Díaz, N., Bárcena Ruiz, A., Fernández Reyes, E., Galván Cejudo, A., Jorrín Novo, J., Peinado Peinado, J., Meléndez-Valdés, F., & Túnez Fiñana, I. (2019). Espectrofometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. *SAE Technical Papers*, 1-8. <https://doi.org/10.4271/841496>
- Adachi, N. (2010). High-efficiency gene targeting in a human pre-B cell line: towards the human gene knockout project. *Genome Biology*, 11(Suppl 1), P1. <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-s1-p1>
- Allemani, C., Matsuda, T., Di Carlo, V., Harewood, R., Matz, M., Nikšić, M., Bonaventure, A., Valkov, M., Johnson, C. J., Estève, J., Ogunbiyi, O. J., Azevedo e Silva, G., Chen, W.

Q., Eser, S., Engholm, G., Stiller, C. A., Monnereau, A., Woods, R. R., Visser, O., ... Coleman, M. P. (2018). Global surveillance of trends in cancer survival 2000–14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries. *The Lancet*, 391, 1023–1075. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)33326-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)33326-3)

Allemani, C., Weir, H. K., Carreira, H., Harewood, R., Spika, D., Wang, X. S., Bannon, F., Ahn, J. V., Johnson, C. J., Bonaventure, A., Marcos-Gragera, R., Stiller, C., Azevedo E Silva, G., Chen, W. Q., Ogunbiyi, O. J., Rachet, B., Soeberg, M. J., You, H., Matsuda, T., ... Miles, S. A. (2015). Global surveillance of cancer survival 1995–2009: Analysis of individual data for 25 676 887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2). *The Lancet*, 385(9972), 977–1010. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)62038-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)62038-9)

Alsadeq, A., Fedders, H., Vokuhl, C., Belau, N. M., Zimmermann, M., Wirbelauer, T., Spielberg, S., Vossen-Gajcy, M., Cario, G., Schrappe, M., & Schewe, D. M. (2017). The role of ZAP70 kinase in acute lymphoblastic leukemia infiltration into the central nervous system. *Haematologica*, 102(2), 346–355. <https://doi.org/10.3324/haematol.2016.147744>

Arber, D. A., Orazi, A., Hasserjian, R., Borowitz, M. J., Beau, M. M. Le, Bloomfield, C. D., Cazzola, M., Vardiman, J. W., Westergaard, T., Andersen, P. K., Pedersen, J. B., Olsen, J. H., Frisch, M., Sorensen, H. T., Wohlfahrt, J., & Melbye, M. (2016). The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, 127(20), 2391–2406. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-03-643544>.The

Ayala, M. V., Bonaud, A., Bender, S., Lambert, J., Carrion, C., Cogné, M., Pascal, V., & Sirac, C. (2020). *New models to study plasma cells in mouse based on the restriction of IgJ expression to antibody*.

Bacher, U., Kohlmann, A., & Haferlach, T. (2010). Gene expression profiling for diagnosis

and therapy in acute leukaemia and other haematologic malignancies. *Cancer Treatment Reviews*, 36, 637–646. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2010.05.002>

Bhatia, S., Sather, H. N., Heerema, N. A., Trigg, M. E., Gaynon, P. S., & Robison, L. L. (2002). Racial and ethnic differences in survival of children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 100(6), 1957–1964. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-02-0395>

Campana, D. (2009). Role of Minimal Residual Disease Monitoring in Adult and Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 23, 1083–1098. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2009.07.010>

Cardona, M. E., Simonson, O. E., Oprea, I. I., Moreno, P. M. D., Silva-Lara, M. F., Mohamed, A. J., Christensson, B., Gahrton, G., Dilber, M. S., Smith, C. I. E., & Arteaga, H. J. (2016). A murine model of acute myeloid leukemia with Evi1 overexpression and autocrine stimulation by an intracellular form of GM-CSF in DA-3 cells. *Leukemia & Lymphoma*, 57(1), 183–192. <https://doi.org/10.3109/10428194.2015.1043547>

Catañeda, A., Lérica, F., José, C., Myrna, S., Carrillo, F., & Sanchez, S. (2017). Análisis de la proliferación de células cancerosas con ANNONA MURICATA. *Jovenes de La Ciencia*, 3, 109–113.

Chávez-Jacobo, V. M. (2018). *El sistema de Edición genética CRISPR/cas y su uso como antimicrobiano Específico*. 21(2), 116–123. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2018.2.5>

Chen, C., Liu, Y., Rappaport, A. R., Kitzing, T., Schultz, N., Zhao, Z., Shroff, A. S., Dickins, R. A., Vakoc, C. R., Bradner, J. E., Stock, W., LeBeau, M. M., Shannon, K. M., Kogan, S., Zuber, J., & Lowe, S. W. (2014). MLL3 is a haploinsufficient 7q tumor suppressor in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*, 25, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.03.016>

Chiaretti, S., Zini, G., & Bassan, R. (2014). Diagnosis and subclassification of acute lymphoblastic leukemia. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 6(1). <https://doi.org/10.4084/mjhid.2014.073>

- Churampi, D. (2016). *Evaluación de la acción antiproliferativa del extracto acuoso de Physalis peruviana L. (Aguaymanto) en cultivos celulares de linfocitos humanos y mieloide crónica (K562) leucemia*. 91.  
[http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/5014/Churampi\\_md.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/5014/Churampi_md.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Cochrane, S. W., Zhao, Y., Perry, S., Urbaniak, T., & Sun, X. H. (2011). Id1 has a physiological role in regulating early B lymphopoiesis. *Cellular and Molecular Immunology*, 8(1), 41–49. <https://doi.org/10.1038/cmi.2010.58>
- Combariza, F., Casas, C. P., Rodríguez, M., Cardona, A. F., Ospina, E., & Grajales, M. (2007). Supervivencia en adultos con leucemia linfocítica aguda de novo tratados con el esquema HyperCVAD en el Instituto Nacional de Cancerología (Colombia), entre enero de 2001 y junio de 2005. *Rev Colomb Cancerol*, 11(2), 92–100.
- Cruz-Rodríguez, N., Combata, A. L., Enciso, L. J., Quijano, S. M., Pinzon, P. L., Lozano, O. C., Castillo, J. S., Li, L., Bareño, J., Cardozo, C., Solano, J., Herrera, M. V., Cudris, J., & Zabaleta, J. (2016a). High expression of ID family and IGJ genes signature as predictor of low induction treatment response and worst survival in adult Hispanic patients with B-Acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 35, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13046-016-0333-z>
- Cruz-Rodríguez, N., Combata, A. L., Enciso, L. J., Quijano, S. M., Pinzon, P. L., Lozano, O. C., Castillo, J. S., Li, L., Bareño, J., Cardozo, C., Solano, J., Herrera, M. V., Cudris, J., & Zabaleta, J. (2016b). High expression of ID family and IGJ genes signature as predictor of low induction treatment response and worst survival in adult Hispanic patients with B-Acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 35(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13046-016-0333-z>
- Cruz-Rodríguez, N., Combata, A. L., Enciso, L. J., Raney, L. F., Pinzon, P. L., Lozano, O. C., Campos, A. M., Peñaloza, N., Solano, J., Herrera, M. V., Zabaleta, J., & Quijano, S. (2017). Prognostic stratification improvement by integrating ID1/ID3/IGJ gene

expression signature and immunophenotypic profile in adult patients with B-ALL.

*Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 36, 1–12.

<https://doi.org/10.1186/s13046-017-0506-4>

Cruz-Rubio, S. G., Márquez-Benítez, Y., Lancheros, A. M., Mosquera-Heredia, M. J., & Oliveros-Barros, J. E. (2020). Descripción de líneas celulares sanguíneas de pacientes con blastos provenientes de cinco ciudades de Colombia. Serie de casos. *Block Caving – A Viable Alternative?*, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.solener.2019.02.027>

Curado, M. P., Pontes, T., Guerra-Yi, M. E., & De Camargo Cancela, M. (2011). Leukemia mortality trends among children, adolescents, and young adults in Latin America. *Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health*, 29(2), 96–102. <https://doi.org/10.1590/S1020-49892011000200004>

Debaize, L., Jakobczyk, H., Avner, S., Gaudichon, J., Rio, A. G., Sérandour, A. A., Dorsheimer, L., Chalmel, F., Carroll, J. S., Zörnig, M., Rieger, M. A., Delalande, O., Salbert, G., Galibert, M. D., Gandemer, V., & Troadec, M. B. (2018). Interplay between transcription regulators RUNX1 and FUBP1 activates an enhancer of the oncogene c-KIT and amplifies cell proliferation. *Nucleic Acids Research*, 46(21), 11214–11228. <https://doi.org/10.1093/nar/gky756>

Dehghan-Nayeri, N., Eshghi, P., Pour, K. G., Rezaei-Tavirani, M., Omrani, M. D., & Gharehbaghian, A. (2017). Differential expression pattern of protein markers for predicting chemosensitivity of dexamethasone-based chemotherapy of B cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 80(1), 177–185. <https://doi.org/10.1007/s00280-017-3347-0>

Den Boer, M. L., van Slegtenhorst, M., De Menezes, R. X., Cheok, M. H., Buijs-Gladdines, J. G., Peters, S. T., Van Zutven, L. J., Beverloo, H. B., Van der Spek, P. J., Escherich, G., Horstmann, M. A., Janka-Schaub, G. E., Kamps, W. A., Evans, W. E., & Pieters, R. (2009). A subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study. *The Lancet Oncology*, 10, 125–134.

[https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(08\)70339-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(08)70339-5)

- Dhadve, A. C., & Ray, P. (2022). An active RUNX1-ID1/ID3 axis governs differentiation and chemoresistance of cancer stem cell population in epithelial ovarian cancer cells. *Biocell*, 46(1), 75–86. <https://doi.org/10.32604/biocell.2022.016346>
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213), 1077–1088. <https://doi.org/10.1126/science.1258096>
- Ebadat, S., Ahmadi, S., Ahmadi, M., Nematpour, F., Barkhordari, F., Mahdian, R., Davami, F., & Mahboudi, F. (2017). Evaluating the efficiency of CHEF and CMV promoter with IRES and Furin/2A linker sequences for monoclonal antibody expression in CHO cells. *PLoS ONE*, 12(10), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185967>
- Enciso Olivera, L. J. (2016). Redefiniendo el plan: nuevas vías oncogénicas y nuevos paradigmas en leucemias agudas y crónicas. *Revista Colombiana de Cancerología*, 20(4), 147–149. <https://doi.org/10.1016/j.rccan.2016.12.001>
- Fernandes, E., Fonseca, T. G., Carriço, T., Mestre, N., Tavares, Á., & Bebianno, M. J. (2020). Cytotoxic responses of the anticancer drug cyclophosphamide in the mussel *Mytilus galloprovincialis* and comparative sensitivity with human cells lines. *Chemosphere*, 261. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127678>
- Franquiz, M. J., & Short, N. J. (2020). Blinatumomab for the treatment of adult B-cell acute lymphoblastic leukemia: Toward a new era of targeted immunotherapy. *Biologics: Targets and Therapy*, 14, 23–34. <https://doi.org/10.2147/BTT.S202746>
- Fullmer, A., O'Brien, S., Hagop, K., & Jabbour, E. (2009). Novel Therapies for Relapsed Acute Lymphoblastic Leukemia. *Current Hematologic Malignancy Reports*, 4, 148–156.
- Gacha Garay, M. J., Akle, V., Enciso, L., & Garavito Aguilar, Z. V. (2017). La leucemia linfoblástica aguda y modelos animales alternativos para su estudio en Colombia. *Revista Colombiana de Cancerología*, 21(4), 212–224. <https://doi.org/10.1016/j.rccan.2016.10.001>

- Gadomski, S., Singh, S. K., Singh, S., Sarkar, T., Klarmann, K. D., Berenschot, M., Seaman, S., Jakubison, B., Gudmundsson, K. O., Lockett, S., & Keller, J. R. (2020). Id1 and Id3 Maintain Steady-State Hematopoiesis by Promoting Sinusoidal Endothelial Cell Survival and Regeneration. *Cell Reports*, *31*, 1–27. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107572>
- Gallegos-Hernandez, G. F. (2018). Ensayos colorimétricos para la detección de citotoxicidad. In *Vldsupra* (Vol. 10, Issue 1).
- Ghasemimehr, N., Farsinejad, A., Mirzaee Khalilabadi, R., Yazdani, Z., & Fatemi, A. (2018). The telomerase inhibitor MST-312 synergistically enhances the apoptotic effect of doxorubicin in pre-B acute lymphoblastic leukemia cells. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *106*(June), 1742–1750. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.140>
- Ghorbani, A., Jeddi-Tehrani, M., Saidpour, A., Safa, M., Bayat, A. A., & Zand, H. (2015). PI3K/AKT and Mdm2 activation are associated with inhibitory effect of cAMP increasing agents on DNA damage-induced cell death in human pre-B NALM-6 cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *566*, 58–66. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.11.010>
- Gillet, J. P., Varma, S., & Gottesman, M. M. (2013). The clinical relevance of cancer cell lines. *Journal of the National Cancer Institute*, 452–458. <https://doi.org/10.1093/jnci/djt007>
- Gómez-Mercado, C. A., Segura-Cardona, A. M., Pájaro-Cantillo, D. E., & Mesa-Largo, M. (2020). Incidencia y determinantes demográficos de la leucemia linfocítica aguda en pacientes con cáncer pediátrico, Antioquia. *Universidad y Salud*, *22*(2), 112–119. <https://doi.org/10.22267/rus.202202.182>
- Gupta, D., Bhattacharjee, O., Mandal, D., Sen, M. K., Dey, D., Dasgupta, A., Kazi, T. A., Gupta, R., Sinharoy, S., Acharya, K., Chattopadhyay, D., Ravichandiran, V., Roy, S., & Ghosh, D. (2019). CRISPR-Cas9 system: A new-fangled dawn in gene editing. *Life Sciences*, *232*(116636), 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116636>

- Gupta, G. P., Perk, J., Acharyya, S., De Candia, P., Mittal, V., Todorova-Manova, K., Gerald, W. L., Brogi, E., Benezra, R., & Massagué, J. (2007). ID genes mediate tumor reinitiation during breast cancer lung metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(49), 19506–19511.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0709185104>
- Han, L., Cui, D., Li, B., Xu, W. W., Lam, A. K. Y., Chan, K. T., Zhu, Y., Lee, N. P. Y., Law, S. Y. K., Guan, X. Y., Qin, Y. R., Chan, K. W., Ma, S., Tsao, S. W., & Cheung, A. L. M. (2019). MicroRNA-338-5p reverses chemoresistance and inhibits invasion of esophageal squamous cell carcinoma cells by targeting Id-1. *Cancer Science*, *110*(12), 3677–3688.  
<https://doi.org/10.1111/cas.14220>
- Harvey, R. C., Mullighan, C. G., Wang, X., Dobbin, K. K., Davidson, G. S., Bedrick, E. J., Chen, I. M., Atlas, S. R., Kang, H., Ar, K., Wilson, C. S., Wharton, W., Murphy, M., Devidas, M., Carroll, A. J., Borowitz, M. J., Bowman, W. P., Downing, J. R., Relling, M., ... Willman, C. L. (2010). Identification of novel cluster groups in pediatric high-risk B-precursor acute lymphoblastic leukemia with gene expression profiling: Correlation with genome-wide DNA copy number alterations, clinical characteristics, and outcome. *Blood*, *116*(23), 4874–4884. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-08-239681>
- Heckl, D., Kowalczyk, M. S., Yudovich, D., Belizaire, R., Puram, R. V., McConkey, M. E., Thielke, A., Aster, J. C., Regev, A., & Ebert, B. L. (2014). Generation of mouse models of myeloid malignancy with combinatorial genetic lesions using CRISPR-Cas9 genome editing. *Nature Biotechnology*, 1–8. <https://doi.org/10.1038/nbt.2951>
- HERNÁNDEZ PAREDES, H. G. (2018). *Efecto antiproliferativo de la Betanina y coadyvante con vincristina en células de Leucemia Linfoblástica Aguda tipo T*.
- Hoffmann, K., Firth, M. J., Beesley, A. H., Freitas, J. R., Ford, J., Senanayake, S., De Klerk, N. H., Baker, D. L., & Kees, U. R. (2008). Prediction of relapse in paediatric pre-B acute lymphoblastic leukaemia using a three-gene risk index. *British Journal of Haematology*, *140*, 656–664. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.06981.x>

- Huang, X., Guo, H., Tammana, S., Jung, Y. C., Mellgren, E., Bassi, P., Cao, Q., Tu, Z. J., Kim, Y. C., Ekker, S. C., Wu, X., Wang, S. M., & Zhou, X. (2010). Gene transfer efficiency and genome-wide integration profiling of sleeping beauty, Tol2, and PiggyBac transposons in human primary t cells. *Molecular Therapy*, *18*(10), 1803–1813. <https://doi.org/10.1038/mt.2010.141>
- Hui, C. M., Cheung, P. Y., Ling, M. T., Tsao, S. W., Wang, X., Wong, Y. C., & Cheung, A. L. M. (2006). Id-1 promotes proliferation of p53-deficient esophageal cancer cells. *International Journal of Cancer*, *119*(3), 508–514. <https://doi.org/10.1002/ijc.21874>
- Hunger, S. P., & Mullighan, C. G. (2015). Redefining ALL classification: Toward detecting high-risk ALL and implementing precision medicine. *Blood*, 1–36. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-02-580043>
- Inaba, H., Greaves, M., & Mullighan, C. G. (2013). Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet*, *381*(9881), 1943–1955. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)62187-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)62187-4)
- Instituto Nacional de cancerología. (2018). *Tasa de mortalidad estandarizada por 100.000 personas-año según población mundial estándar (Segi), en ambos sexos, edades [0 - 80+], cáncer de leucemias linfoides, Santander, año 2018*.
- Jing, W., & Li, J. (2019). Identification of biomarkers for the prediction of relapse-free survival in pediatric B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Oncology Reports*, *41*, 659–667. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6846>
- Kaaijk, P., Kaspers, G. J. L., Van Wering, E. R., Broekema, G. J., Loonen, A. H., Hählen, K., Schmiegelow, K., Janka-Schaub, G. E., Henze, G., Creutzig, U., & Veerman, A. J. P. (2003). Cell proliferation is related to in vitro drug resistance in childhood acute leukaemia. *British Journal of Cancer*, *88*, 775–781. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600787>
- Kang, H., Chen, I. M., Wilson, C. S., Bedrick, E. J., Harvey, R. C., Atlas, S. R., Devidas, M., Mullighan, C. G., Wang, X., Murphy, M., Ar, K., Wharton, W., Borowitz, M. J., Paul Bowman, W., Bhojwani, D., Carroll, W. L., Camitta, B. M., Reaman, G. H., Smith, M. A.,

... Willman, C. L. (2010). Gene expression classifiers for relapse-free survival and minimal residual disease improve risk classification and outcome prediction in pediatric B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, *115*(7), 1394–1405.  
<https://doi.org/10.1182/blood-2009-05-218560>

Katz, A. J., Chia, V. M., Schoonen, W. M., & Kelsh, M. A. (2015). Acute lymphoblastic leukemia: an assessment of international incidence, survival, and disease burden. *Cancer Causes and Control*, 1627–1642. <https://doi.org/10.1007/s10552-015-0657-6>

Kaufman, R. J. (2000). Overview of vector design for mammalian gene expression. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part B Molecular Biotechnology*, *16*(2), 151–160.  
<https://doi.org/10.1385/MB:16:2:151>

Kee, B. L., Rivera, R. R., & Murre, C. (2001). Id3 inhibits B lymphocyte progenitor growth and survival in response to TGF- $\beta$ . *Nature Immunology*, *2*(3), 242–247.  
<https://doi.org/10.1038/85303>

Khan, S., Ullah, M. W., Siddique, R., Nabi, G., Manan, S., Yousaf, M., & Hou, H. (2016). Role of recombinant DNA technology to improve life. *International Journal of Genomics*, 2016.  
<https://doi.org/10.1155/2016/2405954>

Kirtane, K., & Lee, S. J. (2017). Racial and ethnic disparities in hematologic malignancies. *Blood*, *130*(15), 1699–1705. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-04-778225>

Koutsis, A., & Vervesou, E.-C. (2018). Diagnostic molecular techniques in haematology: recent advances. *Annals of Translational Medicine*, *6*(12), 242–242.  
<https://doi.org/10.21037/atm.2018.05.30>

Kowalczyk, T., Ciborowski, M., Kisluk, J., Kretowski, A., & Barbas, C. (2020). Mass spectrometry based proteomics and metabolomics in personalized oncology. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, *1866*, 1–18.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165690>

Krishnarao, A., Raghu Kiran, A., Ben, F., Lo, T.-W., & Wu, Y. (2018). *Genome editing and*

*engineering TALENs, ZFNs and CRISPRs to Molecular Surgery.*

- Kuiper, R. P., Schoenmakers, E. F. P. M., van Reijmersdal, S. V., Hehir-Kwa, J. Y., van Kessel, A. G., van Leeuwen, F. N., & Hoogerbrugge, P. M. (2007). High-resolution genomic profiling of childhood ALL reveals novel recurrent genetic lesions affecting pathways involved in lymphocyte differentiation and cell cycle progression. *Leukemia*, *21*, 1258–1266. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404691>
- Kuznetsov, J. N., Leclerc, G. J., Leclerc, G. M., & Barredo, J. C. (2011). AMPK and Akt determine apoptotic cell death following perturbations of one-carbon metabolism by regulating ER stress in acute lymphoblastic leukemia. *Molecular Cancer Therapeutics*, *10*(3), 437–447. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-10-0777>
- Lee, T. K. W., Man, K., Ling, M. T., Wang, X. H., Wong, Y. C., Lo, C. M., Poon, R. T. P., Ng, I. O. L., & Fan, S. T. (2003). Over-expression of Id-1 induces cell proliferation in hepatocellular carcinoma through inactivation of p16INK4a/RB pathway. *Carcinogenesis*, *24*(11), 1729–1736. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgg145>
- Li, Y., Zuo, C., & Gu, L. (2021). Characterization of a novel glucocorticoid-resistant human B-cell acute lymphoblastic leukemia cell line, with AMPK, mTOR and fatty acid synthesis pathway inhibition. *Cancer Cell International*, *21*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12935-021-02335-7>
- Liu, H., Li, M., Wang, Y., Piper, J., & Jiang, L. (2020). Improving single-cell encapsulation efficiency and reliability through neutral buoyancy of suspension. *Micromachines*, *11*(1). <https://doi.org/10.3390/mi11010094>
- Lobbestael, E., Reumers, V., Ibrahimi, A., Paesen, K., Thiry, I., Gijssbers, R., Van den Haute, C., Debyser, Z., Baekelandt, V., & Taymans, J. M. (2010). Immunohistochemical detection of transgene expression in the brain using small epitope tags. *BMC Biotechnology*, *10*. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-10-16>
- Lustosa de Sousa, D. W., de Almeida Ferreira, F. V., Cavalcante Félix, F. H., & de Oliveira

- Lopes, M. V. (2015). Acute lymphoblastic leukemia in children and adolescents: Prognostic factors and analysis of survival. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 223–229. <https://doi.org/10.1016/j.bjhh.2015.03.009>
- Maeder, M. L., & Gersbach, C. A. (2016). Genome-editing technologies for gene and cell therapy. *Molecular Therapy*, 24(3), 430–446. <https://doi.org/10.1038/mt.2016.10>
- María del Carmen Lagunas Cruz, Arturo Valle Mendiola, & Isabel Soto Cruz. (2014). Ciclo celular: Mecanismos de regulación. *Laboratorio de Oncología Molecular. Unidad de Investigación*, 2(Emplear técnicas cada vez más adecuadas para esta determinación es una necesidad clara, donde se espera obtener resultados de una manera rápida, eficiente, cuantitativa, objetiva y a bajos costos.), 98–107.
- Martinez, J. C., & Misnaza, S. P. (2018). Mortalidad por enfermedades huérfanas en Colombia, 2008-2013. *Biomédica*, 38, 198–208. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i0.3876>
- Meyer, L. K., Huang, B. J., Delgado-Martin, C., Roy, R. P., Hechmer, A., Wandler, A. M., Vincent, T. L., Fortina, P., Olshen, A. B., Wood, B. L., Horton, T. M., Shannon, K. M., Teachey, D. T., & Hermiston, M. L. (2020). Glucocorticoids paradoxically facilitate steroid resistance in T cell acute lymphoblastic leukemias and thymocytes. *Journal of Clinical Investigation*, 130(2), 863–877. <https://doi.org/10.1172/JCI130189>
- Miranda-Filho, A., Piñeros, M., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Monnereau, A., & Bray, F. (2018). Epidemiological patterns of leukaemia in 184 countries: a population-based study. *The Lancet Haematology*, 5(1), e14–e24. [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(17\)30232-6](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(17)30232-6)
- Mita, A., Ricordi, C., Miki, A., Barker, S., Khan, A., Alvarez, A., Hashikura, Y., Miyagawa, S., & Ichi, H. (2008). The purification method using iodixanol(Optiprep)-based density gradient significantly reduce cytokine/chemokine production from human islet preparations, leading to prolong cell survival during culture. 86(2), 2008.

- Morgan, M. M., Johnson, B. P., Livingston, M. K., Schuler, L. A., Alarid, E. T., Sung, K. E., & Beebe, D. J. (2016). Personalized in vitro cancer models to predict therapeutic response: Challenges and a framework for improvement. *Pharmacology and Therapeutics*, 165, 79–92. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.05.007>
- Mrózek, K., Harper, D. P., & Aplan, P. D. (2009). Cytogenetics and Molecular Genetics of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 23(5), 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2009.07.001>
- Mullighan, C. G. (2012). Molecular genetics of B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(10), 3407–3415. <https://doi.org/10.1172/JCI61203.ETV6-RUNX1>
- Mullighan, C. G., Goorha, S., Radtke, I., Miller, C. B., Coustan-Smith, E., Dalton, J. D., Girtman, K., Mathew, S., Ma, J., Pounds, S. B., Su, X., Pui, C. H., Relling, M. V., Evans, W. E., Shurtleff, S. A., & Downing, J. R. (2007). Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*, 446, 758–764. <https://doi.org/10.1038/nature05690>
- Mullighan, C. G., Su, X., Zhang, J., Radtke, I., Phillips, L. A., Miller, C. B., Ma, J., Liu, W., Cheng, C., Schulman, B., & Harvey, R. C. (2009). Deletion of IKZF1 and Prognosis in Acute Lymphoblastic Leukemia Charles. *The New England Journal of Medicine*, 360(5), 1–11.
- Mullighan, C. G., Zhang, J., Harvey, R. C., Collins-Underwood, J. R., Schulman, B. A., Phillips, L. A., Tasian, S. K., Loh, M. L., Su, X., Liu, W., Devidas, M., Atlas, S. R., Chen, I. M., Clifford, R. J., Gerhard, D. S., Carroll, W. L., Reaman, G. H., Smith, M., Downing, J. R., ... Willman, C. L. (2009). JAK mutations in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(23), 9414–9418. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811761106>
- Nishida, H., Yamazaki, H., Yamada, T., Iwata, S., Dang, N. H., Inukai, T., Sugita, K., Ikeda, Y., & Morimoto, C. (2009). CD9 correlates with cancer stem cell potentials in human B-

acute lymphoblastic leukemia cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 382, 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.02.123>

Nørgaard, J. M., Olesen, L. H., & Hokland, P. (2004). Changing picture of cellular drug resistance in human leukemia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 50, 39–49. [https://doi.org/10.1016/S1040-8428\(03\)00173-2](https://doi.org/10.1016/S1040-8428(03)00173-2)

O'Brien, C. A., Kreso, A., Ryan, P., Hermans, K. G., Gibson, L., Wang, Y., Tsatsanis, A., Gallinger, S., & Dick, J. E. (2012). ID1 and ID3 Regulate the Self-Renewal Capacity of Human Colon Cancer-Initiating Cells through p21. *Cancer Cell*, 21, 777–792. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.04.036>

Oceguera-Yanez, F., Kim, S. Il, Matsumoto, T., Tan, G. W., Xiang, L., Hatani, T., Kondo, T., Ikeya, M., Yoshida, Y., Inoue, H., & Woltjen, K. (2016). Engineering the AAVS1 locus for consistent and scalable transgene expression in human iPSCs and their differentiated derivatives. *Methods*, 101, 43–55. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.12.012>

Paul, S., Kantarjian, H., & Jabbour, E. J. (2016). Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *Mayo Clinic Proceedings*, 91(11), 1645–1666. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2016.09.010>

Pauli, C., Hopkins, B. D., Prandi, D., Shaw, R., Fedrizzi, T., Sboner, A., Sailer, V., Augello, M., Puca, L., Rosati, R., McNary, T. J., Churakova, Y., Cheung, C., Triscott, J., Pisapia, D., Rao, R., Mosquera, J. M., Robinson, B., Faltas, B. M., ... Rubin, M. A. (2017). Personalized in vitro and in vivo cancer models to guide precision medicine. *Cancer Discovery*, 7(5), 462–477. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-1154>

Pieters, R., & Den Boer, M. L. (2003). Molecular Pharmacodynamics in Childhood Leukemia. *International Journal of Hematology*, 78, 402–413. <https://doi.org/10.1007/BF02983812>

Pollyea, D., Kohrt, H. E., Juan, Y., Chang, E. T., Gomez, S., & Clarke, C. A. (2014). Acute Leukemia in Adult Hispanic Americans: Differences in Incidence Rates by Nativity. *Journal of Cancer Prevention & Current Research*, 1(1), 9870–9877.

<https://doi.org/10.15406/jcpcr.2014.01.00005>

- Ramos-Peñañiel, C. O., Olarte-Carrillo, I., Santoyo-Sánchez, A., Castellanos-Sinco, H., Montaña-Figueroa, E., León-González, G., Cabrera-Ozuna, S., Collazo-Jaloma, J., & Martínez-Tovar, A. (2016). Factores pronósticos de remisión en pacientes con leucemia linfoblástica aguda posterior a primer recaída. *Revista Colombiana de Cancerología*, 20(4), 159-166. <https://doi.org/10.1016/j.rccan.2016.11.001>
- Ravandi, F., Faderl, S., Kebriaei, P., & Kantarjian, H. (2007). Modern treatment programs for adults with acute lymphoblastic leukemia. *Current Hematologic Malignancy Reports*, 2, 169-175. <https://doi.org/10.1007/s11899-007-0023-1>
- Roschger, C., & Cabrele, C. (2017). The Id-protein family in developmental and cancer-associated pathways. *Cell Communication and Signaling*, 15(7), 1-26. <https://doi.org/10.1186/s12964-016-0161-y>
- Ryu, S. M., Hur, J. W., & Kim, K. (2019). Evolution of CRISPR towards accurate and efficient mammal genome engineering. *BMB Reports*, 52(8), 475-481. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2019.52.8.149>
- Sánchez-Rivera, F. J., & Jacks, T. (2015). Applications of the CRISPR-Cas9 system in cancer biology. *Nature Reviews Cancer*, 1-9. <https://doi.org/10.1038/nrc3950>
- Sharma, P., Patel, D., & Chaudhary, J. (2012). Id1 and Id3 expression is associated with increasing grade of prostate cancer: Id3 preferentially regulates CDKN1B. *Cancer Medicine*, 187-197. <https://doi.org/10.1002/cam4.19>
- Slone, W. L., Moses, B. S., Evans, R., Piktel, D., Martin, K. H., Petros, W., Craig, M., & Gibson, L. F. (2016). Modeling chemotherapy resistant leukemia in vitro. *Journal of Visualized Experiments*, 108(e53645), 1-7. <https://doi.org/10.3791/53645>
- Song, C., Pan, X., Ge, Z., Gowda, C., Ding, Y., Li, H., Li, Z., Yochum, G., Muschen, M., Li, Q., Payne, K. J., & Dovat, S. (2016). Epigenetic regulation of gene expression by Ikaros, HDAC1 and Casein Kinase II in leukemia. *Leukemia*, 30, 1436-1440.

<https://doi.org/10.1038/leu.2015.331>

Sridhar, K., Singh, A., Butzmann, A., Jangam, D., & Ohgami, R. S. (2019). Molecular genetic testing methodologies in hematopoietic diseases: current and future methods.

*International Journal of Laboratory Hematology*, 41(S1), 102–116.

<https://doi.org/10.1111/ijlh.13024>

Styczynski, J., Wysocki, M., Debski, R., Czyzewski, K., Kolodziej, B., Rafinska, B., Kubicka, M., Koltan, S., Koltan, A., Pogorzala, M., Kurylak, A., Olszewska-Slonina, D., Balwierz, W., Juraszewska, E., Wieczorek, M., Olejnik, I., Krawczuk-Rybak, M., Kuzmich, M., Kowalczyk, J., ... Stanczak, E. (2007). Predictive value of multidrug resistance proteins and cellular drug resistance in childhood relapsed acute lymphoblastic leukemia.

*Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 133, 875–893.

<https://doi.org/10.1007/s00432-007-0274-1>

Tallman, M. S. (2006). New agents for the treatment of acute myeloid leukemia. *Best Practice and Research: Clinical Haematology*, 19(2), 311–320.

<https://doi.org/10.1016/j.beha.2005.11.006>

Terwilliger, T., & Abdul-Hay, M. (2017). Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer Journal*, 7(e577), 1–12.

<https://doi.org/10.1038/bcj.2017.53>

Thomas, P., & Smart, T. G. (2005). HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 51(3 SPEC. ISS.), 187–200. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2004.08.014>

Universidad Industrial de Santander. (n.d.). *Comité Técnico Ambiental y Sanitario*.

Vera, A. M., Pardo, C., Duarte, M. C., & Suárez, A. (2012). Análisis de la mortalidad por leucemia aguda pediátrica en el instituto nacional de cancerología. *Biomedica*, 32, 355–364. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v32i3.691>

Vizcaíno, M., Lopera, J. E., Martínez, L., Reyes, I. D. los, & Linares, A. (2016). Guía de

atención integral para la detección oportuna, diagnóstico, tratamiento y seguimiento de leucemia linfocítica aguda en niños, niñas y adolescentes. *Revista Colombiana de Cancerología*, 17-27. <https://doi.org/10.1016/j.rccan.2015.08.003>

Wang, Xiaoyin, Xu, Z., Tian, Z., Zhang, X., Xu, D., Li, Q., Zhang, J., & Wang, T. (2017). The EF-1 $\alpha$  promoter maintains high-level transgene expression from episomal vectors in transfected CHO-K1 cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 21(11), 3044-3054. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13216>

Wang, Xuan, Le, N., Denoth-Lippuner, A., Barral, Y., & Kroschewski, R. (2016). Asymmetric partitioning of transfected DNA during mammalian cell division. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(26), 7177-7182. <https://doi.org/10.1073/pnas.1606091113>

Wojtuszkiewicz, A., Peters, G. J., Van Woerden, N. L., Dubbelman, B., Escherich, G., Schmiegelow, K., Sonneveld, E., Pieters, R., Van De Ven, P. M., Jansen, G., Assaraf, Y. G., Kaspers, G. J. L., & Cloos, J. (2015). Methotrexate resistance in relation to treatment outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Hematology and Oncology*, 8, 1-13. <https://doi.org/10.1186/s13045-015-0158-9>

Yagita, K., Yamanaka, I., Emoto, N., Kawakami, K., & Shimada, S. (2010). Real-time monitoring of circadian clock oscillations in primary cultures of mammalian cells using Tol2 transposon-mediated gene transfer strategy. *BMC Biotechnology*, 10. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-10-3>

Yin, X., Tang, B., Li, J. H., Wang, Y., Zhang, L., Xie, X. Y., Zhang, B. H., Qiu, S. J., Wu, W. Z., & Ren, Z. G. (2017). ID1 promotes hepatocellular carcinoma proliferation and confers chemoresistance to oxaliplatin by activating pentose phosphate pathway. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 36(1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/s13046-017-0637-7>

Young, C. L., Britton, Z. T., & Robinson, A. S. (2012). Recombinant protein expression and purification: A comprehensive review of affinity tags and microbial applications.

*Biotechnology Journal*, 7(5), 620–634. <https://doi.org/10.1002/biot.201100155>

Yu, X., Geng, W., Zhao, H., Wang, G., Zhao, Y., Zhu, Z., & Geng, X. P. (2017). Using a commonly down-regulated cytomegalovirus (CMV) promoter for high-level expression of ectopic gene in a human B Lymphoma cell line. *Medical Science Monitor*, 23, 5943–5950. <https://doi.org/10.12659/MSM.906240>

Yu, Y., Guo, Y., Tian, Q., Lan, Y., Yeh, H., Zhang, M., Tasan, I., Jain, S., & Zhao, H. (2020). An efficient gene knock-in strategy using 5'-modified double-stranded DNA donors with short homology arms. *Nature Chemical Biology*, 16(4), 387–390. <https://doi.org/10.1038/s41589-019-0432-1>

Zemanova, J., Hylse, O., Collakova, J., Vesely, P., Oltova, A., Borsky, M., Zaprazna, K., Kasparkova, M., Janovska, P., Verner, J., Kohoutek, J., Dzimkova, M., Bryja, V., Jaskova, Z., Brychtova, Y., Paruch, K., & Trbusek, M. (2016). Chk1 inhibition significantly potentiates activity of nucleoside analogs in TP53-mutated B-lymphoid cells. *Oncotarget*, 7(38), 62091–62106. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11388>

Zhang, G., Ferg, M., Lübke, L., Takamiya, M., Beil, T., Gourain, V., Diotel, N., Strähle, U., & Rastegar, S. (2020). Bone morphogenetic protein signaling regulates Id1-mediated neural stem cell quiescence in the adult zebrafish brain via a phylogenetically conserved enhancer module. *Stem Cells*, 38(7), 875–889. <https://doi.org/10.1002/stem.3182>

Zhang, J., Mullighan, C. G., Harvey, R. C., Wu, G., Chen, X., Edmonson, M., Buetow, K. H., Carroll, W. L., Chen, I. M., Devidas, M., Gerhard, D. S., Loh, M. L., Reaman, G. H., Relling, M. V., Camitta, B. M., Bowman, W. P., Smith, M. A., Willman, C. L., Downing, J. R., & Hunger, S. P. (2011). Key pathways are frequently mutated in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia: A report from the Children's Oncology Group. *Blood*, 118(11), 3080–3087. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-03-341412>

Zhang, X., Rastogi, P., Shah, B., & Zhang, L. (2017). B lymphoblastic leukemia/lymphoma: New insights into genetics, molecular aberrations, subclassification and targeted

therapy. *Oncotarget*, 8(39), 66728–66741. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19271>

Zúñiga, R. A., Gutiérrez-González, M., Collazo, N., Sotelo, P. H., Ribeiro, C. H., Altamirano, C., Lorenzo, C., Aguillón, J. C., & Molina, M. C. (2019). Development of a new promoter to avoid the silencing of genes in the production of recombinant antibodies in chinese hamster ovary cells. *Journal of Biological Engineering*, 13(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13036-019-0187-y>