



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla



Facultad de Medicina
Licenciatura en Biomedicina

Instituto de Fisiología

**Laboratorio de Oncoinmunología
CIBIOR, IMSS**

***Organoides personalizados como sistemas de estudio de sensibilidad a
quimioterapéuticos para leucemia linfoblástica***

para obtener el título de

Licenciado en Biomedicina

Presenta

Jiovanni Amador Cardoso

Director

Dra. Rosana Pelayo Camacho

Codirector

Dr. Juan Carlos Balandrán Juárez

H. Puebla de Zaragoza, Pue. Enero, 2021



AGRADECIMIENTOS

Estas palabras nacen en un frío atardecer de invierno, pero desde el calor de mi interior que emana al recordar a todas las personas que me apoyaron en el rodar de mi camino.

Mis palabras pueden ser las mismas pero mis agradecimientos son los más sinceros al Dr. Juan Carlos Balandrán que ha cimentado mi vida como investigador, es para mí un gran honor ser parte de sus alumnos en formación; no hay suficientes palabras, actos ni obsequios para demostrar lo infinitamente agradecido que estoy con usted. Gracias por su confianza, tolerancia, apoyo y esperanza que depositó en todo momento en mí y por supuesto en nuestro trabajo de investigación.

A la Dra. Rosana Pelayo, que en el gustoso día de conocerla me acepto en su nicho. Mi más grande agradecimiento por permitir formarme en su laboratorio y extender mi universo en la ciencia. Sin duda, tiene el mejor laboratorio del mundo.

A mis compañeros de laboratorio Dalia, Rubí, Armando y Aurora que eran mis estrellas que alumbraban mis momentos oscuros de mi investigación. Muchas gracias por regalarme su confianza, conocimiento, artículos, momentos y desayunos.

A mis amigos los patitos; Iñaki que en todo momento no permitió que me rindiera en mi investigación y a Gaby con quien tantas veces corría al CIBIOR después de clases, valoro y agradezco mucho tu apoyo, comprensión y por ayudarme a aclarar mis momentos de penumbra.

A mis padres, Mario y Cristina, que siempre han estado conmigo, en lo económico, en lo académico, en lo social y familiar. Agradezco mucho ser su hijo, y el esfuerzo que depositan en mí para que me supere a mí mismo. No hay nada en el mundo para agradecer el esfuerzo que das mamá, por desvelarte conmigo, aun después del trabajo, mientras seguía estudiando en las noches y a ti papá, por el esfuerzo que das por entender la ciencia y querer ayudarme a encontrar las respuestas. Para ustedes les regalo mi corazón. Y por supuesto a mi hermano Jeter que, en mis

momentos de más tensión, estrés, tristeza o ira, siempre tenías un plan para degradar esas emociones y así regresar fresco a mis estudios. A mi hermana Jessica y sobrino Manuel, que siempre me llenan mis días de alegrías y sonrisas con su peculiar espíritu de madre e hijo. Son mis ídolos.

Un agradecimiento infinito para el equipo que me recibió en mi estancia en el Hospital Infantil de México Federico Gómez, Dra. Briceida Lopez, Mtro. Israel Parra, Mtra. Tania, Dr. Félix Gaytán, Dra. Elisa Dorantes y a la química Natalia, sin ustedes no tendría estos resultados y el conocimiento de las leucemias directo de pacientes. Y por supuesto, un doble agradecimiento al Mtro. Armando, quien me recibió en su hogar y área de trabajo.

A mis amigos de universidad, Keyla, Brenda y su bebé Emmanuel, que hacían de las clases un mejor momento. Para Fernanda y Jonathan, que tantas veces desayunamos juntos; aprecio mucho su amistad. Y a Ameyalli, mi amiga de toda mi carrera universitaria, con quien tantas exposiciones y momentos pasamos juntos. Y a mis amigos de la vida, Miriam y Roberto Carlos, gracias por siempre darme ánimos.

Quiero agradecer al Dr. Marcos Flores, por permitirme dar mis primeros pasos en la ciencia y por sus seminarios mensuales, sin ellos no hubiera conocido al laboratorio de Oncoinmunología.

Para concluir, agradezco a mis familiares, abuelitos, tíos y primos que siempre han estado pendientes de mi para brindarme de muchas maneras su apoyo incondicional. Finalmente, en memoria de mis tíos Yasmín, Froylan y Eloísa, que en dondequiera que estén sus almas, puedan gozar conmigo el final de esta etapa. Siempre los llevaré en mi mente y corazón.

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. ANTECEDENTES	4
3.1 Antecedentes generales	4
3.1.1 Hematopoyesis	4
3.1.2 El microambiente hematopoyético	6
3.1.3 Leucemia linfoblástica aguda	9
3.1.4 Epidemiología	10
3.2. Antecedentes específicos	12
3.2.1 Células troncales leucémicas y células iniciadoras de la leucemia	12
3.2.2 El microambiente hematopoyético leucémico	13
3.2.3. Organoides tridimensionales de células estromales mesenquimales	14
3.2.4 Quimioterapia como tratamiento de la leucemia aguda linfoblástica	16
3.2.5 DL50 de los medicamentos de quimioterapia.....	20
3.2.6 Quimioterapéuticos y mecanismo de acción	20
4. JUSTIFICACIÓN	25
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26
6. HIPÓTESIS CIENTÍFICA	27
7. OBJETIVOS	27
7.1 Objetivo general	27
7.2 Objetivos particulares	27
8. MATERIAL Y MÉTODOS	28
8.1 Diseño del estudio.....	28
8.2 Ubicación espacio-temporal	28
8.3 Estrategia de trabajo	28
8.4 Muestreo	28
8.4.1 Definición de la población	28
8.4.2 Selección de la muestra.....	28
8.4.3 Criterios de selección de la muestra	29
8.4.4 Diseño y tipo de muestreo	29
8.4.5 Tamaño de la muestra	29
8.5 Definición de las variables y escalas de medición	29
8.6 Método de recolección de datos.....	30
8.7 Técnicas y procedimientos	30

8.8 Análisis de datos	32
8.9 Diseño estadístico	32
9. RESULTADOS	33
9.1 Evaluación de la permeabilidad de los organoides leucémicos a doxorrubicina.	33
9.2 Las células leucémicas quedan protegidas de la quimioterapia al interior de los organoides.	34
9.3 Estandarización de las plataformas de predicción de resistencia/sensibilidad a fármacos a través de líneas celulares de LLA-B.....	36
9.4 Sensibilidad de células mononucleares de pacientes con LLA al diagnóstico a los fármacos terapéuticos.	38
9.5 La sensibilidad blastos leucémicos primarios a fármacos terapéuticos puede determinarse a través de las plataformas tridimensionales.	42
10. DISCUSIÓN	45
11. CONCLUSIONES	55
12 BIBLIOGRAFÍA	56
ABREVIATURAS	64

1. RESUMEN

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es la principal causa de mortalidad por enfermedad en niños a nivel mundial, a pesar de que más del 70% tienen remisión completa, un 30% presentan recaída y actualmente no se cuenta con una herramienta diagnóstica que permita identificarlos. Por ello, esta investigación tuvo como propósito desarrollar una prueba de laboratorio que brinde información personalizada sobre la sensibilidad y resistencia a fármacos en pacientes con LLA para que contribuya a la optimización de su tratamiento, mediante el uso de organoides como sistemas de estudio de leucemia infantil y simuladores de la biología de la médula ósea leucémica, que permitan evaluar la sensibilidad o resistencia de la célula leucémica a los agentes quimioterapéuticos. Para el establecimiento de las plataformas se utilizó la línea celular de estroma murino OP9 para la construcción de esferoides, así como líneas celulares de LLA y blastos leucémicos derivados de pacientes. Los sistemas de organoides tridimensionales fueron expuestos a diferentes agentes quimioterapéuticos y la viabilidad de las células tumorales fue monitoreada a través de exclusión de azul de tripán y por citometría de flujo. Aunque la sensibilidad/ quimiorresistencia a diferentes agentes quimioterapéuticos fue variable, se demostró la potencial aplicabilidad del sistema para monitoreo temprano de la respuesta a la terapia y para identificar perfiles quimiorresistentes.

2. INTRODUCCIÓN

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) Infantil es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Las leucemias agudas son un grupo de enfermedades malignas oligoclonales de la médula ósea (MO), caracterizadas por el dominio de blastos altamente proliferativos que sustituyen progresivamente el tejido hematopoyético normal, ocasionando un descenso progresivo de las células troncales hematopoyéticas y, en consecuencia, la pérdida funcional de la hematopoyesis por la agresión a los nichos hematopoyéticos. Los avances en su investigación durante la última década nos han permitido comprender mejor su base genética y biológica para el tratamiento farmacológico, a pesar del éxito de los esquemas de quimioterapia actuales, más del 30% de los pacientes leucémicos no alcanza remisión completa y recaen de manera temprana, en la mayoría de los casos con un desenlace fatal, sin poder identificar a la población más vulnerable o con mayor tendencia a desarrollar resistencia a la terapia ya que no existe en el mundo alguna plataforma para predecir la respuesta biológica temprana de los agentes quimioterapéuticos.

Los mecanismos de resistencia a agentes quimioterapéuticos incluyen una mayor actividad de bombas expulsoras de fármacos, transferencia de proteínas anti-apoptóticas por parte de las células del microambiente, cambios metabólicos e inducción de estados de quiescencia. Por otro lado, la existencia de células iniciadoras de la leucemia con propiedades de troncalidad sugiere que son la población responsable de los fenómenos de resistencia y la recaída.

Tanto las células troncales hematopoyéticas como los blastos leucémicos son altamente dependientes de sus nichos en la MO. De los distintos nichos hematopoyéticos descritos, el nicho formado por células estromales mesenquimales parece ser de mayor relevancia para los progenitores linfoides debido a los factores que producen. Antecedentes del laboratorio han demostrado que el mantenimiento de blastos leucémicos se ve favorecido a través de co-cultivos con esferoides estromales. Los organoides leucémicos están compuestos por células estromales y blastos que en conjunto simulan algunas características de la médula ósea como la

hipoxia que favorecen las propiedades de troncalidad. Por lo tanto, hipotetizamos que este sistema podría ser trasladado para investigar el efecto de la quimioterapia en las células leucemias en un contexto microambiental simulado *in vitro*.

3. ANTECEDENTES

3.1 Antecedentes generales

3.1.1 Hematopoyesis

La producción de las células del torrente sanguíneo es un proceso complejo y altamente regulado que inicia en las células troncales hematopoyéticas (CTH) que de forma gradual y ordenada dan lugar a progenitores y precursores que formarán las distintas células maduras circulantes. A este proceso se le conoce como hematopoyesis y tiene lugar en la medula ósea (MO) desde el nacimiento y hasta el fin de la vida (1).

Como población seminal del sistema hematopoyético, las CTH poseen dos propiedades importantes: la autorrenovación y la multipotencialidad. Se ha descrito que hay una CTH por cada 100 mil células nucleadas de la MO y sólo 5 a 10% de ellas están en mitosis. Al dividirse, una de ellas permanece como una CTH para mantener su número y una de las células hijas puede iniciar los programas de diferenciación linfóide y/o mielóide, las cuales corresponden a menos del 0.5% del total de células de la MO. A lo largo de la diferenciación la multipotencialidad se va restringiendo concomitante a la ganancia de funciones especializadas específicas de cada linaje maduro. El compartimento de células precursoras es reconocible por su morfología a pesar de su inmadurez y pueden ser identificados a través de microscopía de luz con la ayuda de tinciones convencionales. Las células precursoras constituyen la gran mayoría de las células de la MO (un poco más del 90% de las células hematopoyéticas residentes en la cavidad medular). Finalmente, los precursores hematopoyéticos al madurar generan a las células sanguíneas circulantes que se clasifican en dos grandes linajes: mielóide y linfóide (**Figura 1**) (2). Dentro del mielóide se encuentran los granulocitos (neutrófilos, basófilos y eosinófilos), monocitos, macrófagos, eritrocitos, megacariocitos, células cebadas y células dendríticas mieloides, mientras que en el segundo reconocemos a los linfocitos B, los linfocitos T y diversas subpoblaciones de células linfoides innatas (o linfocitos innatos), incluidas las células NK, y algunas categorías de células dendríticas de pasado linfóide. Las células de linaje mielóide son producidas a

través de un proceso dinámico conocido como mielopoyesis, en tanto que las de linaje linfoide son producto de la linfopoyesis (3).

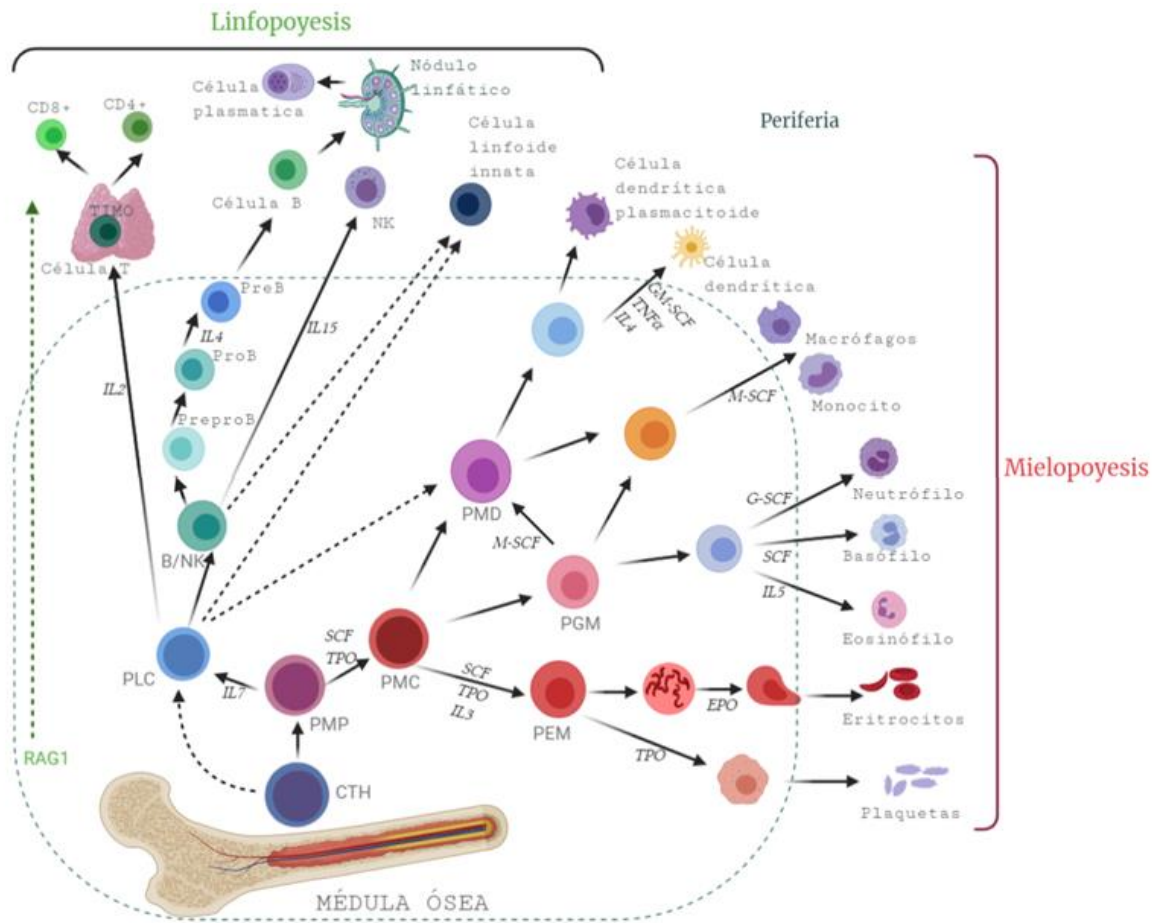


Figura 1. Mapa de la Hematopoyesis Humana. La presencia de las células sanguíneas maduras es el resultado de un proceso altamente organizado, regulado por factores transcripción y por señales microambientales a partir de las células troncales hematopoyéticas (CTH) dentro de la médula ósea, con excepción de los linfocitos T, cuya diferenciación ocurre en el timo, después de que sus progenitores migren desde la médula ósea. Progenitor Multipotente (PMP), Progenitor Linfocito Común (PLC), Progenitor Mieloide Común (PMC), Progenitor Eritroide/Megacariocito (PEM), Progenitor Granulocito/Monocito (PGM), Progenitor Monocito Dendrítico (PMD). (Modificado de Pelayo, Balandrán y Ruiz-Argüelles. Academia Nacional de Medicina, 2018).

3.1.2 El microambiente hematopoyético

A partir del nacimiento y hasta la muerte del individuo, la médula ósea (MO) es el principal órgano hematopoyético. Es un tejido esponjoso que se localiza en el interior de los huesos y está formado por varios componentes celulares como el componente hematopoyético, y el estromal, destacando las fracciones mesenquimal y endotelial (4). Las células troncales estromales mesenquimales (CTM) conforman al componente mesenquimal y dan lugar a los osteoblastos, adipocitos y condrocitos, que también forman parte del nicho medular. En cuanto al componente vascular que está integrado por células endoteliales que participa en el tráfico celular y de nutrientes (4).

Tanto las CTH, las células progenitoras tempranas y las terminalmente diferenciadas crecen en estrecha comunicación con el microambiente de la MO donde están expuestas a combinaciones y concentraciones variables de citocinas y factores de crecimiento (4). Las CTH y los progenitores no se encuentran distribuidos de forma aleatoria, sino que, viven en estrecha cercanía de poblaciones estromales que facilitan las propiedades de troncalidad a lo largo de la vida. Se propone que, el “nicho” debe satisfacer dos criterios: que en él resida la célula progenitora *in vivo* y que promueva su mantenimiento (5).

Dentro del microambiente hematopoyético y su enorme complejidad celular, se reconocen tres zonas o nichos formados por diversas poblaciones no hematopoyéticas que rigen la homeostasis del desarrollo inmuno-hematopoyético a lo largo de la vida, fundamentada en la alta organización celular y zonas de baja tensión de oxígeno, hipoxia (**Figura 2**). El nicho endosteal u osteoblástico: se encuentra en superficie ósea mantenido osteoblastos, producen altos niveles de CXCL12, SCF (*stem cell factor*), Wnt, Notch, trombopoyetina, N- Caderina y angiopoyetina-1. El nicho vascular está formado por el endotelio celular de los sinusoides y arteriolas que expresan moléculas de adhesión, como P-selectina, VCAM-1, ICAM-1 y a su vez, también producen factores de nicho como CXCL12, SCF, entre otros, regulan principalmente el tráfico y la comunicación hacia la periferia. Por otro lado, el nicho reticular/perivascular está conformado por células

estromales mesenquimales, poblaciones que expresan Nestina, el receptor de Leptina y Prx1 y se superpone con las células CAR (del inglés, *CXC12-abundant reticular cells*) que producen los niveles más altos de CXCL12 (6).

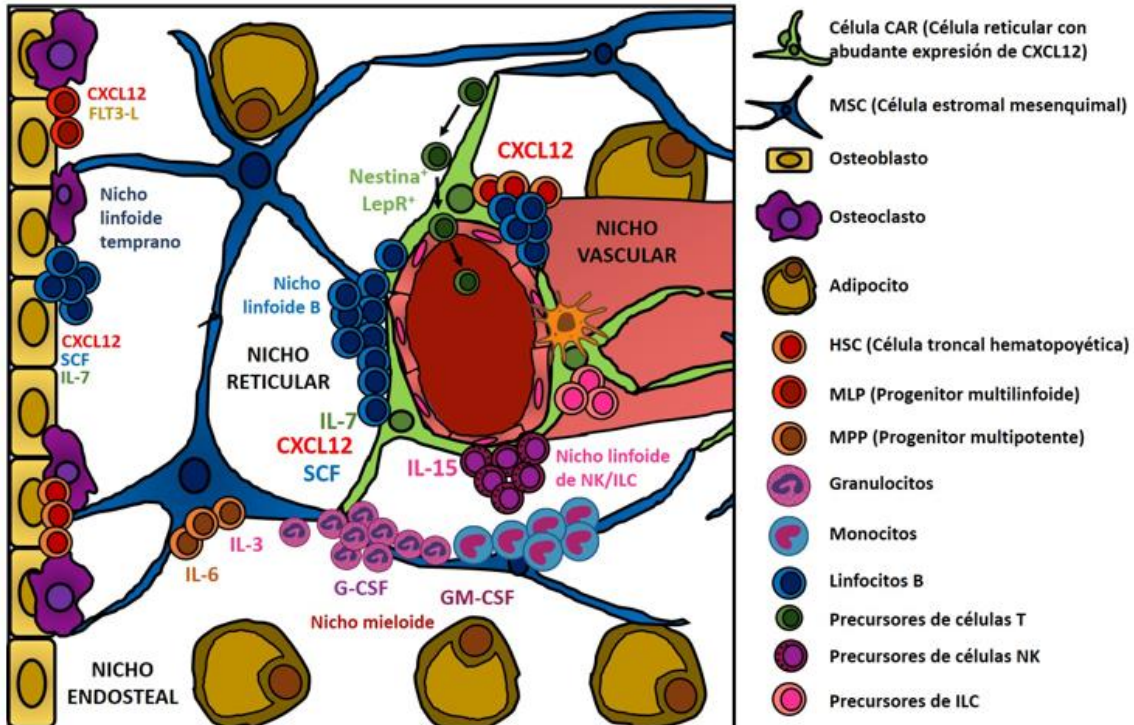


Figura 2. Componentes del Microambiente Hematopoyético. A la luz del conocimiento actual y gracias a la investigación en ratones se conocen nichos hematopoyéticos para las células troncales: el nicho endosteal está soportado por osteoblastos y se ubica en el endostio cerca de la superficie del hueso, mientras que el nicho reticular o perivascular comprende a células endoteliales y células mesenquimales especializadas en la liberación de CXCL12. En gran coordinación, el microambiente hematopoyético promueve las propiedades de troncalidad y regula las decisiones de diferenciación hacia los diferentes linajes sanguíneos maduros. (Pelayo R, Balandrán JC & Ruiz-Argüelles. Ontogenia de la inmunidad. Academia Mexicana de Medicina, 2018).

Los experimentos que han dado luz para el descubrimiento de las células que establecen los nichos que permiten el desarrollo de células linfoides y su función han sido realizados en ratones reporteros y/o genéticamente modificados. En este sentido, los ratones deficientes en la producción de IL-7 carecen de todas las células del sistema linfoides, por lo que este es uno de los factores linfopoyéticos clave (7). En etapas previas a la expresión del receptor de IL-7, existe otra molécula que regula el desarrollo linfoides, que fue definido inicialmente como SDF-1 (factor

derivado de estroma 1) y posteriormente identificado como la quimiocina CXCL12, que principalmente, estimulaba la proliferación de linfocitos B (8). De forma reiterada, los modelos experimentales han permitido señalar que el CXCL12 expresado por osteoblastos forman el nicho linfóide más temprano del que se tiene conocimiento, ya que la interrupción genética de esta quimiocina produce un decremento en las células progenitoras linfoides, pero no de las CTH o de los progenitores mieloides (9).

La expresión funcional de CXCR4 (el receptor de CXCL12) es esencial para la producción eficiente de linfocitos B, NK y células dendríticas plasmacitoides además de ser indispensable para el mantenimiento de CTH en el nicho, por lo que su interrupción también es letal para la linfopoyesis. El ratón reportero de CXCL12 ayudó a evidenciar la localización de las células reticulares CAR a lo largo de toda la MO. Las investigaciones más recientes señalan que IL-7 y SCF también son producidas abundantemente por poblaciones de CAR, lo que las coloca como el principal nicho linfóide (5).

Aunque el nicho endosteal se ubica en la superficie ósea, el microambiente hematopoyético es un *continuum* celular donde los nichos vasculares y perivasculares son abundantes a lo largo de la topografía de la MO para formar unidades hematopoyéticas que proveen a las células en desarrollo los factores de crecimiento y citocinas necesarias para su diferenciación, mantenimiento y proliferación (1).

De gran interés, las células estromales mesenquimales (CEM) han sido investigadas por sus propiedades inmunorreguladoras, ya que son altamente productoras de IL10, lo que favorece la formación de poblaciones reguladoras o supresoras de la respuesta inmune. Hasta el momento se desconoce su papel en el desarrollo de los componentes celulares de inmunovigilancia, pero fuertes evidencias derivadas del estudio de neoplasias hematológicas malignas sugieren su participación inhibitoria o activadora de fenotipos inmunosupresores en la MO, lo que potencialmente tendría valor en la dinámica de crecimiento tumoral y vigilancia inmunológica.

La evidencia del posible papel de las CEM en la fisiopatología de las enfermedades hematológicas emana tanto de estudios clínicos, como de experimentos en modelos animales ya que la modificación en la expresión de algunas moléculas en las CEM puede inducir enfermedades mieloproliferativas, displasias hematológicas e, incluso, la transformación leucémica de las células hematopoyéticas. Se ha demostrado que la delección de la endonucleasa *Dicer1* del procesamiento de miARN selectivamente en osteoprogenitores mesenquimales induce hematopoyesis marcadamente desordenada (10) y la expresión de β -catenina nuclear en células de linaje osteoblástico (11) lo cual produce fenotipos aberrantes hematopoyéticos, aunque la aberración esté presente en las células del estroma. *Dicer1* es una endonucleasa de ARNasa III esencial para la biogénesis de miARN y el procesamiento de ARN. Los miARN regulan el destino de las células hematopoyéticas y la regulación negativa global de los miARN por la delección de *Dicer1* promueve la tumorigénesis de una manera autónoma de las células cancerosas. En conjunto, estos hallazgos indican que lesiones genéticas en el microambiente de la MO tiene el potencial de promover enfermedades hematológicas. Lo cual, de manera interesante, sugiere que el microambiente juega un papel importante en el inicio de programas patológicos (12).

3.1.3 Leucemia linfoblástica aguda

La hematopoyesis es un proceso altamente regulado y cuando sus mecanismos controladores se ven alterados pueden desencadenarse patologías graves. Dentro de las enfermedades hematológicas, las de mayor frecuencia durante la edad pediátrica son las leucemias agudas, un grupo de enfermedades malignas oligoclonales de la MO, caracterizadas por el dominio de blastos altamente proliferativos que sustituyen progresivamente el tejido hematopoyético normal, ocasionando un descenso progresivo de las CTH y, en consecuencia, la pérdida funcional de la hematopoyesis por la agresión a los nichos hematopoyéticos.

Se hipotetiza que la leucemia se inicia por mutaciones dentro de una CTH o células en diferenciación que adquieren propiedades de troncalidad, lo cual desencadena la incapacidad de las células precursoras para madurar y alteraciones en el ciclo

celular. Aunque su etiología no ha sido del todo esclarecida, su estallido está ligado a eventos macroambientales y microambientales que inducen daño al DNA, tales como la radiación ionizante, factores químicos como el benceno, cloranfenicol y otros agentes alquilantes (13).

3.1.4 Epidemiología

De acuerdo con el último reporte GLOBOCAN del 2018, las leucemias forman parte del 54.3% de otros tipos de cáncer que reporta, con un 1.3% de su prevalencia. Si delimitamos la incidencia en edades menores a 19 años, las leucemias representan el 28.6% (**figura 3**), siendo la principal causa de muerte infantil por enfermedad con un 36.8% (**figura 4**).

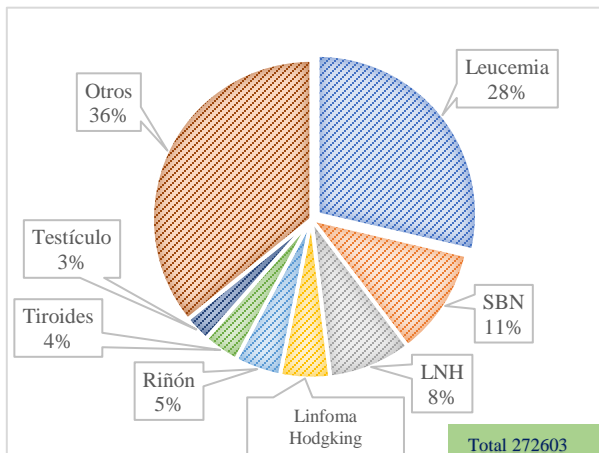


Figura 3. Porcentaje de incidencia de cáncer en personas de 0 a 19 años en ambos sexos en el mundo. (GLOBOCAN, 2018). LNH, Linfoma No Hodgkin; SBN, Síndrome Bing Neel.

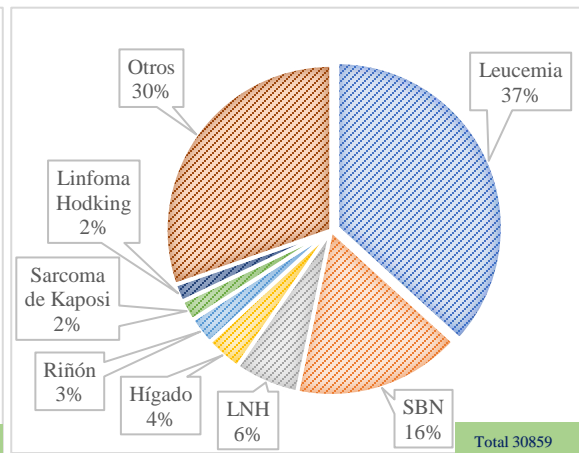


Figura 4. Porcentaje de muertes por cáncer en personas de 0 a 19 años en ambos sexos en el mundo (GLOBOCAN, 2018). LNH, Linfoma No Hodgkin; SBN, Síndrome Bing Neel

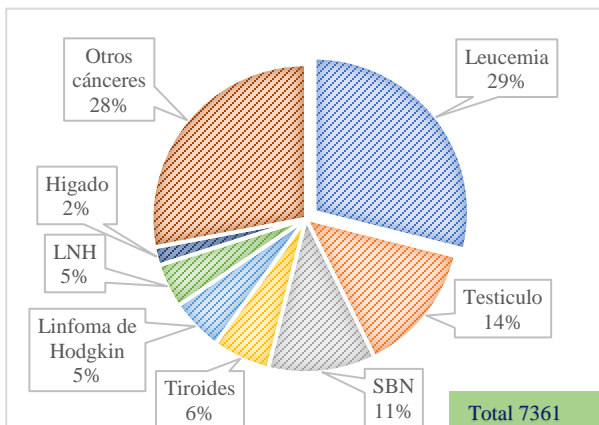


Figura 5. Porcentaje de incidencia de cáncer en personas de 0 a 19 años en ambos sexos en México (GLOBOCAN, 2018). LNH, Linfoma No Hodgkin; SBN,

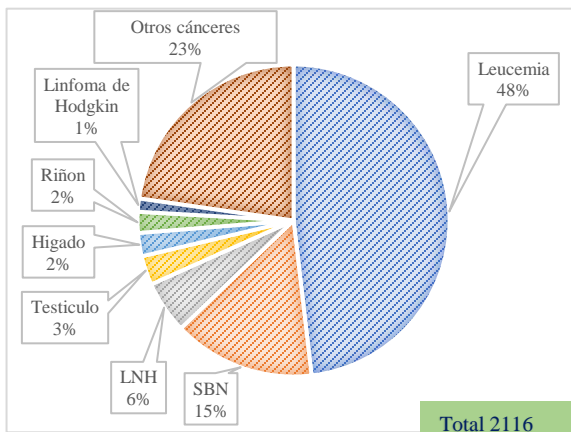


Figura 6. Porcentaje de muertes por cáncer en personas de 0 a 19 años en ambos sexos de México (GLOBOCAN, 2018). LNH, Linfoma No Hodgkin; SBN, Síndrome Bing Neel.

En México se reportó en 2018 que el cáncer de mayor incidencia en población menor de 19 años fue la leucemia con una incidencia de 28.9% (**figura 5**) y mortalidad del 48.2% (**figura 6**). De estos números un 25% corresponden a leucemia linfoblástica aguda (LLA), siendo el principal mal que aqueja a la población infantil, teniendo este grupo una recuperación promedio del 75% (14).

Del número de leucemias agudas que aquejan a la población infantil mexicana, nuestro grupo reportó que un 13.27% corresponden a leucemia mieloide aguda y tan solo un 8.85% corresponden a LLA de linaje T. Mientras que un 26.55% pertenecen a LLA de subtipo ProB, un 19.47% son PreB y un 31.86% a un linaje mixto ProB/PreB. Siendo así la LLA de linaje B (LLA-B) la de mayor incidencia con una suma de prevalencia del 77.88% (15). Se ha reportado en Oaxaca, que alrededor de un 85% corresponden a leucemias de linaje linfocítico y entre 15-20% a un linaje mieloide (**figura 7**).

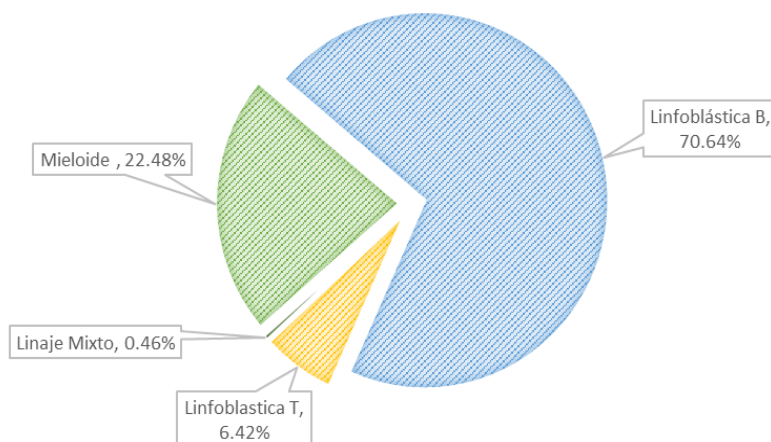


Figura 3. *Porcentaje de incidencia de Leucemias Agudas (LA) de edad pediátrica en Oaxaca, México, 2018 (Modificado de Juárez-Avendaño et al, 2020).*

3.2. Antecedentes específicos

3.2.1 Células troncales leucémicas y células iniciadoras de la leucemia

La médula ósea (MO) y en ocasiones el torrente sanguíneo se ve poblado de blastos de manera rápida durante las leucemias agudas. De acuerdo con los trabajos del Dr. John Dick, una célula troncal leucémica es aquella capaz de iniciar la leucemia mieloide con las mismas características que en el paciente. En ese trabajo seminal se ha confirmado la existencia de una población CD34⁺CD38⁻ carente de marcadores hematopoyéticos de células maduras dentro de la MO leucémica capaz, de proliferar y mantenerse en el tumor de forma indefinida gracias a su capacidad autorrenovadora a través de trasplantes seriados en ratones inmunodeficientes (16). Sin embargo, el Dr. J. Vormoor demostró que esto no se cumplía para las leucemias linfoides ya que cualquier blasto puede en cualquier estadio de diferenciación funcionar como una célula iniciadora de la leucemia, sin el requerimiento de cumplir con el inmunofenotipo clásico para CTH. Comprobando así la existencia de un modelo estocástico más que un modelo jerárquico (17). Aún no se conoce con precisión cómo identificar a las células iniciadoras de la leucemia (CIL) en leucemias linfoides por inmunofenotipo, pero su existencia y funcionalidad es indiscutible.

Se reconoce que dos poblaciones de células troncales coexisten en el nicho hematopoyético leucémico, las células troncales hematopoyéticas (CTH) y las células iniciadoras de la leucemia (CIL). El resto de los blastos de la leucemia se diferencian de las CIL ya que estas se encuentran ciclando, no presentan propiedades de troncalidad, no son tan dependientes del nicho y son blanco de la quimioterapia debido a su alta tasa de proliferación. Las CIL se caracterizan por permanecer en quiescencia, por lo que no son afectadas por la quimioterapia estándar, además de que se encuentran protegidas dentro del nicho leucémico. De este modo se sospecha que deben ser las responsables de las recaídas (18). Entonces, la existencia de las CIL y el papel protector del nicho hematopoyético son factores cruciales para la respuesta y sensibilidad a la quimioterapia aplicada al paciente pediátrico con leucemia aguda.

3.2.2 El microambiente hematopoyético leucémico

Como se mencionó previamente, el microambiente hematopoyético está conformado por tres grandes nichos: endosteal, reticular y vascular. Estos muros y techos secretan factores de crecimiento, citocinas y otros nutrientes que permiten el establecimiento de las CTH y el desarrollo normal del tejido. Durante el estrés celular causado por la inflamación asociado al crecimiento tumoral, sus propiedades, composición y arquitectura son editadas en favor de la malignidad leucémica, comprometiendo la producción hematopoyética normal (19).

Uno de los factores que primariamente se editan es CXCL12, las células de LLA-B que colonizan nichos perivascuales CXCL12⁺ desencadenan su regulación negativa y potencialmente el desplazamiento de las células CD34⁺ normales (20). Lo anterior es una evidencia de la prevalencia de defectos funcionales en los componentes solubles y celulares del microambiente durante la LLA (21) así como el papel remodelador microambiental de los productos solubles de las células leucémicas.

La remodelación que sufren las células estromales mesenquimales (CEM) durante la leucemia parece ser estable pero dependiente del tumor, lo cual sugiere eventos epigenéticos completamente reversibles después de la remisión debido al

restablecimiento de la hematopoyesis normal (22). El nicho leucémico también juega un papel crucial durante la evasión de la terapia, formando un obstáculo para el tratamiento y proporcionando elementos anti-apoptóticos, de este modo, las células leucémicas quedan protegidas por células estromales de la MO bajo un santuario protector.

3.2.3. Organoides tridimensionales de células estromales mesenquimales

Similar a la linfopoyesis normal, los precursores de LLA de células B dependen en gran medida de su microambiente ya que entran rápidamente en apoptosis cuando se cultivan incluso con las condiciones más sofisticadas de nutrientes. Particularmente, los ensayos funcionales con células primarias se han visto obstaculizados por la incapacidad de expandir el tumor *ex vivo*. Los co-cultivos a corto plazo de blastos leucémicos con CEM se han utilizado para probar medicamentos terapéuticos y documentar la protección mediada por el nicho (23). Sin embargo, los nichos protectores de CEM y el soporte leucemogénico no pueden ser completamente imitados por los cultivos convencionales en monocapa en dos dimensiones (2D) (24), debido a la falta de conectividad celular y señales hipóxicas que contribuyen al mantenimiento de la leucemia *in vivo* (25). En nuestro grupo de trabajo se ha desarrollado un modelo tridimensional (3D) basado en esferoides multicelulares de CEM de un tamaño proporcional al número de células que lo integra, que permite el mantenimiento de blastos leucémicos (Baladrán et al. en revisión). Este sistema de cultivo libre de andamios es capaz de recapitular al interior un perfil hipóxico que se asemeja más al escenario *in vivo* de la MO, promoviendo a su vez las propiedades de troncalidad. Por otra parte, este modelo de organoide leucémico promueve la producción eficiente de factores del nicho, es el caso de *stem cell factor* (SCF) y CXCL12 (**figura 8**). Otras de las ventajas es la capacidad de mantener las propiedades leucemogénicas de las células de LLA-B, ya que ciertas células ingresan dentro del organoide permaneciendo en quiescencia. Interesantemente, la capacidad de CIL en modelos de xenotrasplante es sustancialmente incrementada comparado con cultivos convencionales.

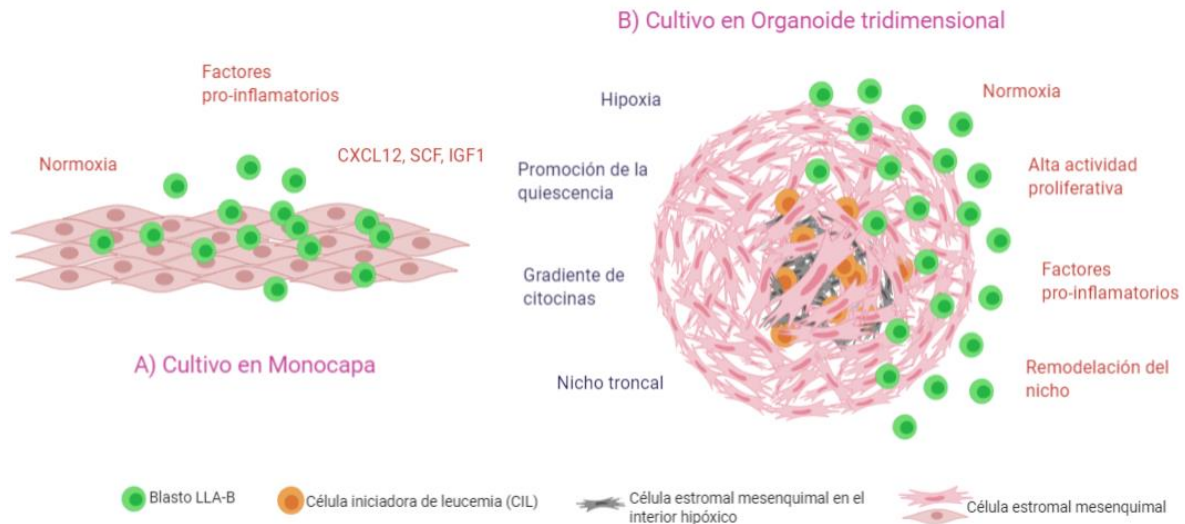


Figura 8. A) Cultivo de células leucémicas en monocapa (2D) y B) cultivo de células leucémicas en organoide (3D). El sistema tridimensional es capaz de emular el microambiente leucémico de la médula ósea, en su interior un ambiente hipóxico para las células iniciadoras de la leucemia y en su exterior la normoxia, donde los blastos leucémicos se mantienen con gran actividad metabólica (Modificado de Zambetti N. 2016; Baladrán JC, 2017) (30)

Utilizando este modelo se ha demostrado que la colonización leucémica remodela el nicho mesenquimal concomitante al desplazamiento de progenitores normales cuyo contenido se ve drásticamente disminuido en la LLA-B (26,27). Presumiblemente las CIL permanecen dentro ya que esta estructura le proporciona un ambiente hipóxico altamente promotor de estados de quiescencia, a diferencia de los blastos, que poseen una alta tasa de proliferación y la secreción de factores inflamatorios que permiten la remodelación del nicho hematopoyético.

En resumen, como parte de las interacciones dinámicas entre las células leucémicas y el microambiente de la MO, nichos específicos proporcionan santuarios donde éstas pueden evadir la muerte inducida por la quimioterapia y adquirir un fenotipo resistente a los medicamentos. Los estudios sobre la biología de las células troncales o iniciadoras leucémicas en el contexto microambiental han identificado blancos terapéuticos emergentes que incluyen receptores de quimiocinas, moléculas de adhesión y proteínas relacionadas con la hipoxia, entre otras (28,29).

3.2.4 Quimioterapia como tratamiento de la leucemia aguda linfoblástica

El reconocimiento de la heterogeneidad de la LLA y sus implicaciones en el pronóstico obliga a realizar numerosos estudios durante el diagnóstico, incluyendo el fenotipo inmunológico de las células neoplásicas, estudios citogenéticos y/o moleculares, etc. La mayoría de los especialistas dedicados al tratamiento de las leucemias están actualmente de acuerdo en que los tratamientos uniformes para todos los pacientes con LLA son obsoletos (21).

La estrategia más efectiva para el tratamiento de las leucemias agudas es la quimioterapia, la cual se usa desde hace más de 50 años. Su estandarización proviene del perfeccionamiento de años de estudio y uso empírico. En 1786 Thomas Fowler desarrolló una combinación de trióxido de arsénico y bicarbonato de potasio, que más tarde en 1865 H. Lissauer aplicó a pacientes con leucemia, convirtiéndose hasta principios del siglo XX en la terapia estándar para esta enfermedad. Sin embargo, su respuesta era impredecible. Fue hasta pasada la segunda guerra mundial, que se observó que el gas mostaza eliminaba selectivamente a las células del sistema hematopoyético y Goodman y Gilman analizaron el efecto de pequeñas dosis de mustina (un derivado del gas mostaza) en un paciente con linfoma no Hodgking. Este paciente entró en remisión completa, siendo esta la primera demostración de que el cáncer podría ser tratado con agentes farmacológicos. Varios pacientes fueron tratados de la misma manera, sin embargo, unas semanas después los pacientes recayeron y los síntomas reaparecieron con mayor intensidad provocando la muerte. Por alguna razón los compuestos derivados de la mostaza nitrogenada no podían ejercer un efecto duradero. Este fenómeno se repitió en pacientes con leucemia aguda y crónica.

En la década de 1940, Sydney Farber descubrió que la producción de células hematopoyéticas y de blastos requiere de la utilización de ácido fólico. Con esto en mente decidió utilizar aminopterina en pacientes con LLA, un antagonista del ácido fólico sintetizado por Yellapragada Subbarao. Sus resultados fueron favorables, extendiendo la vida de sus pacientes por más de 6 meses, a diferencia del mes de vida al diagnóstico de la enfermedad. A partir de entonces Farber, reconocido como

el padre de la quimioterapia moderna, emprendió una cruzada contra la leucemia buscando más fármacos con actividad antitumoral, motivando a nuevos institutos y la creación de centros de investigación oncológica a desarrollar nuevos quimioterapéuticos con diferentes blancos de la célula leucémica. A partir de 1965, la quimioterapia combinada había llegado para quedarse. El conocimiento de la actividad leucémica y el desarrollo de nuevos quimioterapéuticos, permitió que grandes centros oncológicos como el NCI, M.D. Anderson, St. Jude y Stanford trataran a sus pacientes con distintas combinaciones de fármacos, esquemas o protocolos que daban mejores resultados. Aunando a la quimioterapia, el trasplante de MO vino a reforzar la estadística de supervivencia en pacientes pediátricos (31).

Los esquemas de quimioterapias actuales consisten en 4 etapas de tratamiento: 1) ventana esteroidea, 2) inducción a la remisión, 3) consolidación y 4) mantenimiento (**figura 9**). El riesgo de que algunos pacientes desarrollen resistencia a fármacos más rápidamente que otros ha hecho que el tratamiento de elección de las LLA sea quimioterapia intensa orientada a erradicar las clonas leucémicas antes de que aparezcan los estados de resistencia. La ventana esteroidea tiende a identificar a los pacientes con blastos resistente a los esteroides y poder asignar a una categoría de riesgos (21). El siguiente evento es la inducción a la remisión, fase de la quimioterapia con la mezcla de más de cuatro agentes quimioterapéuticos. Su principal papel es disminuir el número de blastos al punto de remitir la sintomatología del paciente. La fase de consolidación consiste en eliminar los blastos presentes en circulación y MO. Y finalmente la fase de mantenimiento, se concentra en la prevención de la recaída.

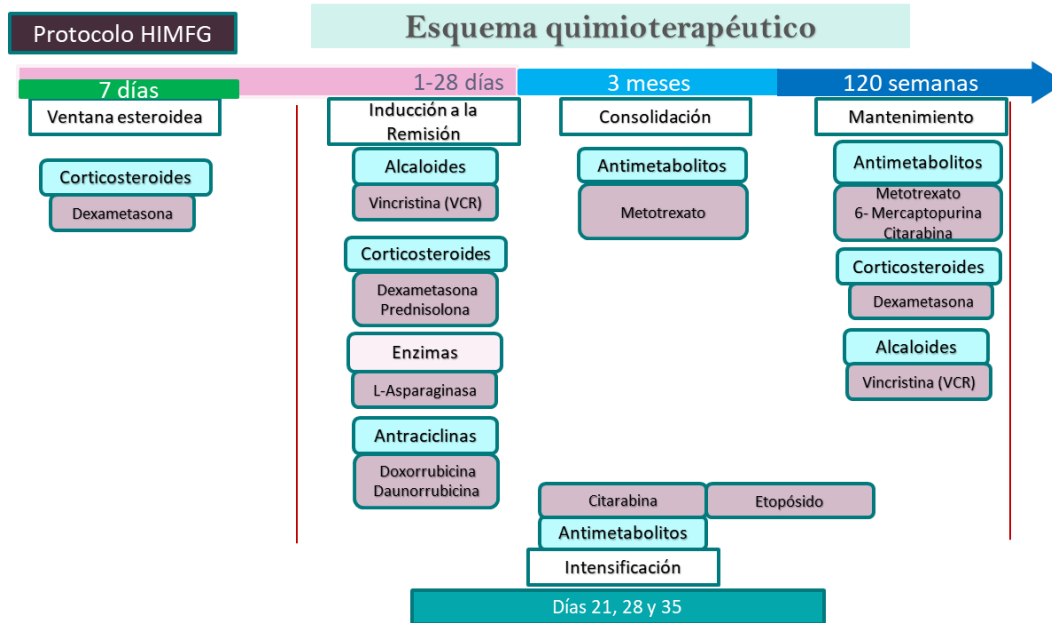


Figura 4. Fases de la quimioterapia. Los protocolos de quimioterapia para LLA pueden variar de acuerdo con el grado de riesgo de la leucemia, entre hospitales y aún más entre países. Sus similitudes son que se basan a un protocolo eficaz ya fundamentado y probado, así como las etapas que involucra. Esquema quimioterapéutico para LLA de bajo riesgo del Hospital Infantil de México Federico Gómez, basado en el esquema St. Jude (HIMFG, 2019).

Entre las etapas de inducción a la remisión y consolidación, en pacientes de alto riesgo se aplica la profilaxis al sistema nervioso central (SNC), con el fin de eliminar o prevenir la infiltración de blastos, ya que el SNC actúa como un santuario para los blastos siendo protegidos por la barrera hematoencefálica permitiendo que la quimioterapia no alcance las concentraciones adecuadas o inclusive no la atraviesen.

Los quimioterapéuticos se utilizan en combinaciones debido a sus distintos blancos terapéuticos sobre los blastos, están diseñados para interactuar en su rápida actividad mitótica, la velocidad de replicación de las células sanguíneas normales, responsable de acuerdo con los cálculos de Skipper, de generar dos mil millones de células malignas por cada célula leucémica en dos semanas (31). Algunos de estos quimioterapéuticos se muestran en la **tabla 1**.

Tabla 1. *Quimioterapéuticos y sus blancos celulares.* La efectividad de los quimioterapéuticos sobre los blastos de LLA está relacionado a la alta actividad metabólica que poseen, atacando un blanco estratégico que propicie su muerte. (32-42)

Alquilantes		Antimetabolitos	
Ciclofosfamida		5-Fluorouracilo (5-fu)	
Antraciclinas (Antibióticos antitumorales)		6- Mercaptopurina (6-MP)	
Daunorrubicina		Citarabina (Ara-C)	
Doxorrubicina		Metotrexato	
Inhibidores de mitosis		Inhibidores de TOPO-II	
Vincristina		Etopósido (VP-16)	
Enzimas		Corticoesteroides	
L-asparaginasa		Prednisona	
		Dexametasona	

Inhibidor de formación del uso mitótico **Daño al DNA** **Antifolato**

Inhibición de topoisomerasa II **Síntesis de ácidos nucleicos**

*El color de letra indica el blanco celular respecto al color de cuadro.

La quimioterapia aplicada en pacientes con LLA pediátricos, logran una sobrevida mayor al 90% en países desarrollados y un 20% de fracaso al tratamiento, es decir, recaída o incluso la muerte. La razón de que en países en vías de desarrollo se tenga una sobrevida menor puede deberse a distintos mecanismos intrínsecos y extrínsecos, donde la de mayor peso es la alta prevalencia de factores moleculares de mal pronóstico como el retraso en la detección oportuna de la enfermedad mínima/medible residual (EMR).

3.2.5 DL50 de los medicamentos de quimioterapia

En trabajos anteriores realizados en el laboratorio de Oncoinmunología (CIBIOR-IMSS) se realizaron las pruebas de dosis-respuesta para determinar la dosis letal 50 (DL50) para cada quimioterapéutico. Las concentraciones se muestran en la **tabla 2**.

Tabla 2. DL50 para cada quimioterapéutico.

Daunorrubicina (Dau)	5.5×10^{-6} mmol/ μ L
Dexametasona (Dex)	5.6×10^{-6} mmol/ μ L
Vincristina (Vin)	2.16×10^{-3} mmol/ μ L
Citarabina (Cit)	4.11×10^{-4} mmol/ μ L
Metotrexato (Met)	5.5×10^{-6} mmol/ μ L

3.2.6 Quimioterapéuticos y mecanismo de acción

3.2.6.1 Citarabina (ara-C)

La Citarabina es un análogo de desoxicitidina comúnmente utilizado en el tratamiento de enfermedades hematológicas malignas, pero sin actividad en tumores sólidos. Este medicamento es uno de los agentes individuales más activos en el tratamiento de la leucemia mieloide aguda. La penetración intracelular de ara-C depende de la concentración plasmática. Con regímenes que incluyen dosis convencionales de ara-C (concentraciones plasmáticas de 0.5–1 μ M), la expresión del transporte de nucleósidos equilibrante humano que facilita la proteína 1 (hENT1) es el factor limitante de la tasa de absorción de ara-C. El resultado clínico es pobre en pacientes que tienen mieloblastos con baja expresión de este transportador (32). Una vez dentro de la célula, el paso limitante de la velocidad en el anabolismo intracelular es la conversión a arabinosil CMP por la desoxitidina cinasa. La ara-C se descompone en el metabolito no tóxico uracil arabinosido por la citidina desaminasa y el arabinosil CMP puede desfosforilarse por las 5'-nucleotidasas citoplasmáticas (33). La citotoxicidad de la ara-C es causada por la inhibición directa de las ADN polimerasas y la incorporación de arabinosil CTP en el ADN, lo que conduce a la terminación de la cadena y la detención de la síntesis de ADN.

3.2.6.2 Daunorrubicina (DNR)

Daunorrubicina es una antraciclina, agente antineoplásico usado como componente estándar de diversos regímenes para el tratamiento de leucemias (34). Es un antibiótico antitumoral producido por *Streptomyces coeruleorubidus* y *S. peucetius* (35). La DNR es un fármaco antineoplásico que ejerce sus efectos citotóxicos/antiproliferativos mediante la interferencia con una serie de funciones bioquímicas y biológicas en las células blanco. Aunque no se ha aclarado completamente el o los mecanismos exactos de la acción, en lo principal el fármaco parece inhibir el ADN y la síntesis del ARN dependiente del ADN formando un complejo con el ADN, vía intercalación entre los pares base y la hélice. DNR también puede interferir con las actividades de la polimerasa y topoisomerasa II, mediante la regulación de la expresión genética y reacciones de oxidación/reducción (que generan radicales libres altamente reactivos/tóxicos). También se ha postulado una interacción directa entre DNR y la membrana celular produciendo alteraciones en la capa doble de la superficie celular. DNR es máximamente citotóxica durante la fase S, pero el fármaco no es específico en cuanto a ciclo o fase (34,35).

3.2.6.3 Dexametasona (DEX)

Los glucocorticoides como la dexametasona, fueron los primeros medicamentos introducidos en el tratamiento de la LLA hace más de 50 años y desde entonces se han mantenido en el centro del tratamiento de la LLA y otras neoplasias linfoides (36). Su blanco es el bloqueo de la síntesis de proteínas por acción directa sobre el DNA (37). Los fármacos glucocorticoides, análogos sintéticos del cortisol, ingresan a la célula principalmente a través de la interacción con el receptor de glucocorticoides NR3C1, que funciona como factor de transcripción activado por ligando. La señalización de glucocorticoides es integral en el control de la mayoría de los sistemas fisiológicos, induciendo respuestas amplias, diversas y pleiotrópicas. En el tratamiento de la LLA y otros tumores linfoides, la terapia con corticoides explota la capacidad de los glucocorticoides para inducir selectivamente

la apoptosis en las células linfoides. Las respuestas transcripcionales a la activación del receptor de glucocorticoides son específicas del tejido y del contexto, y la respuesta proapoptótica selectiva a la señalización del receptor de glucocorticoides en las células linfoides depende de su capacidad para inducir la regulación positiva transcripcional de las moléculas de BCL2 en restringida por los linfoblastos de LLA, que codifica el factor proapoptótico BH3 a solo BIM (38,39). Gran parte de su mecanismo de acción está regulado por el papel de sus receptores, que muestran una localización intracelular, los que activan diversos factores de transcripción que modifican la expresión de proteínas asociadas con la apoptosis como lo son la molécula Bim, la granzima A, moléculas proapoptóticas como GPR65/TDAG8 y otras proteínas implicadas en la vías intrínseca y extrínseca de la apoptosis.

La importancia de la terapia con glucocorticoides en la ALL está subrayada por la fuerte asociación de la resistencia primaria a los glucocorticoides con el mal pronóstico y la resistencia in vitro a los glucocorticoides se asocia con un pronóstico desfavorable (36).

En la LLA infantil se ha establecido el término pre-inducción con esteroides, estos se administran de forma progresiva durante siete días y al día +7, se verifica la cuenta de blastos en sangre periférica; si esta es menor de $1 \times 10^3/\mu\text{L}$, se considera como una respuesta favorable a esteroides, dicho hallazgo ha sido considerado de pronóstico favorable en diversas series pediátricas (37).

3.2.6.4 Metotrexato (MTX)

Es uno de los actuales quimioterapéuticos más utilizados dentro de la inducción a la remisión. Se le conoce como un antagonista del ácido fólico y en la actualidad es utilizado no solo como tratamiento del cáncer, sino también para el tratamiento de artritis reumatoide, psoriasis y otras enfermedades autoinmunes. Otros usos son para la prevención de la enfermedad injerto contra hospedero después del trasplante. Su uso en la LLA se ha convertido en componente de su esquema de tratamiento con una remisión en pacientes de alrededor de un 70% de niños. Por el contrario, con el linaje mieloide, el MTX es inefectivo en el tratamiento de leucemia mieloide aguda (LMA) (40).

La absorción de metotrexato está mediada por el transportador de folato SLC19A1 y por una vía endocítica activada por un receptor de folato. Una vez dentro de la célula, el MTX es poliglutamado por la enzima folilpoliglutamato sintasa, formando poliglutamatos de metotrexato. Como consecuencia inhiben la enzima dihidrofolato reductasa capaz de convertir el dihidrofolato (FH2) en tetrahydrofolato (FH4) dentro de la vía encargada de donar átomos de carbono para la síntesis de *novo* de purinas, pirimidinas y poliaminas, lo que conduce a una deficiencia de tetrahydrofolato y sus derivados de aductos de carbono en las células que se replican. La falta de tetrahydrofolato conduce a un deterioro de la síntesis de purina y timidina, una inhibición de la replicación del ADN y muerte celular (40).

La muerte celular causada por el MTX depende de la duración de la inhibición de la enzima, el nivel de reducción de folatos en la célula y la presencia de otros factores que inhiben la apoptosis, por ejemplo, productos del gen p53 mutante o un aumento en la expresión del gen BCL-2 (40).

3.2.6.5 Vincristina (VCR)

La vincristina se ha utilizado ampliamente en la terapia contra el cáncer por más de 30 años (41). La vincristina, conocida como alcaloide de la vinca, es un aislado de las hojas del *Catharanthus roseus*, es un agente anticancerígeno antimitótico que se usa para tratar varios tipos de cáncer (leucemia, linfoma, mama, pulmón, neuroblastoma). La vincristina es un agente en la terapia de inducción y mantenimiento de la LLA infantil. La VCR se une a la subunidad β -tubulina de los heterodímeros α/β -tubulina, al desestabilizar la estructura provoca la despolimerización de los microtúbulos. Como los microtúbulos son cruciales para la división celular, son objetivos efectivos para la terapia contra el cáncer. Además, la interacción coordinada de los microtúbulos con otros componentes del citoesqueleto es esencial para muchos procesos celulares y estudios proteómicos recientes han identificado cambios en las proteínas de unión a la tubulina y las proteínas de unión a la actina en las líneas celulares de leucemia resistente a los antimicrotúbulos (42).

En conclusión, el tratamiento actual de las leucemias agudas consiste en la combinación de fármacos que permiten atacar diferentes ejes regulatorios que

controlan la proliferación celular que van desde inhibidores del ciclo celular, moléculas quelantes del DNA e interruptores de las síntesis de proteínas y antimetabolitos (**Figura 10**).

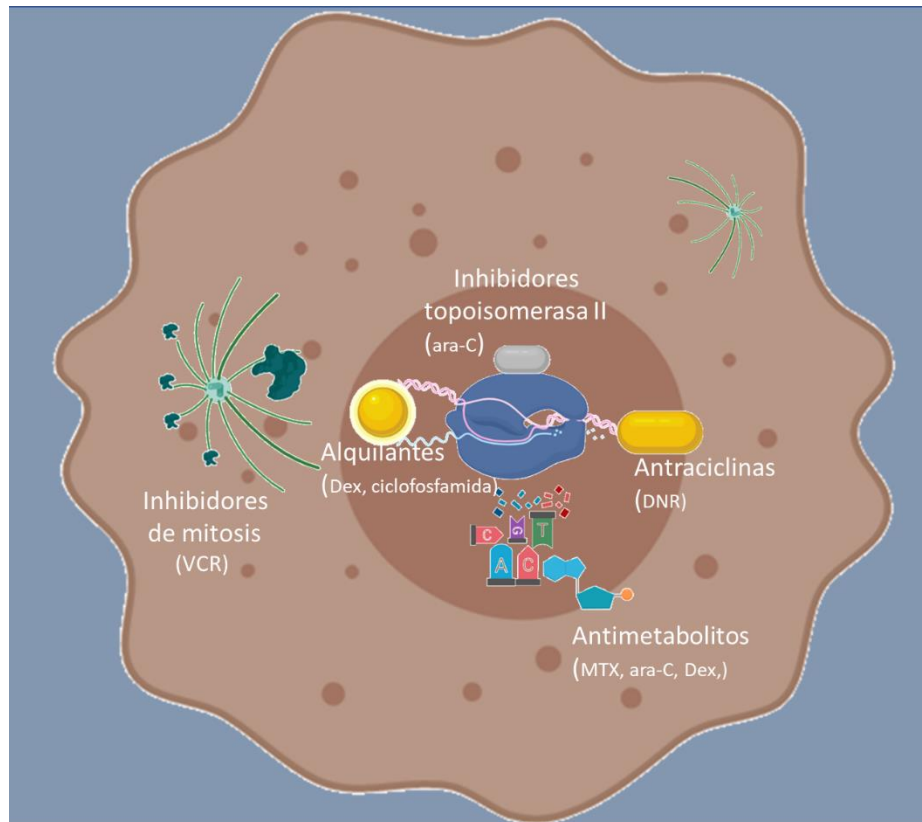


Figura 10. Blancos moleculares del tratamiento farmacológico de LLA. Panorama general del nivel de los blancos moleculares de los quimioterápicos dentro de una célula leucémica. VCR- Vincristina, Dex-dexametasona, ara-C-citarabina, DNR-daunorrubicina, MTX-metrotexato (32-42).

4. JUSTIFICACIÓN

El cáncer es la principal causa de muerte en la población de niños por enfermedad, donde las leucemias son las más frecuentes. A pesar del éxito de los esquemas de quimioterapia actuales, más del 25% de los pacientes leucémicos no alcanza remisión completa y recaen de manera temprana, con un desenlace fatal.

Debido a la gran heterogeneidad biológica y molecular de este grupo de enfermedades no ha sido posible identificar a la población más vulnerable o con mayor tendencia a desarrollar resistencia a la terapia, principalmente por la falta de modelos experimentales que permitan el mantenimiento de células leucémicas *in vitro*; y por la alta dependencia de las células leucémicas con su microambiente dentro de la medula ósea.

El estándar de oro para estudiar las enfermedades de sistema hematopoyético es el sistema de xenotrasplante en ratones inmunodeficientes, sin embargo, requiere de cierta infraestructura y cuidados especiales, lo que genera costos elevados para su mantenimiento. En el laboratorio hemos diseñado una plataforma tridimensional de cultivo a partir de las células estromales mesenquimales que dan soporte a las células leucémicas *ex vivo* a muy bajo costo.

A la fecha, el factor pronóstico de mayor peso es el tratamiento suministrado y la enfermedad mínima/medible residual (EMR). Sin embargo, esta medición se realiza una vez que se inicia el tratamiento. La implementación de un sistema que permita simular las propiedades de la MO que impacte en el mantenimiento de las células leucémicas será indispensable para probar los agentes quimioterapéuticos y evaluar sus respuestas tempranamente. Adicionalmente, contar con una herramienta pronóstica que incluya señales microambientales para identificar a los pacientes quimiorresistentes de manera temprana será de alto beneficio para el especialista clínico en la toma de decisiones terapéuticas.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

México es uno de los países con mayor mortalidad por leucemia linfoblástica aguda (LLA), tasa que se ha ido incrementando considerablemente. El estado del arte actual de los factores con mayor peso en la predicción de la recaída es la determinación de la enfermedad mínima/medible residual (EMR) aunque cada vez se encuentra al alcance de la mayoría de los pacientes, la EMR se realiza una vez que se inició el tratamiento para monitorear su eficacia.

Ni los blastos leucémicos o las células iniciadoras de la leucemia (CIL) funcionan como unidades autónomas e independientes, sino que dependen en gran medida del microambiente de la MO, que les ofrece un nicho de protección mediado por interacciones dinámicas y señales reguladoras esenciales para su mantenimiento, proliferación y supervivencia. Al ser la LLA una enfermedad que inicia y progresa en la médula ósea, y considerando que la compleja estructura tridimensional de este órgano es decisiva para la organización de nichos especializados, el estudio integral de dicha patología requiere el entendimiento de la alta comunicación celular de su microambiente en la malignidad por lo que el desarrollo de nuevas terapias debe considerar al microambiente.

No existe en el mundo alguna plataforma para predecir la respuesta temprana de los agentes quimioterapéuticos individuales o en combinación antes de su aplicación en los pacientes y mucho menos en contexto del microambiente donde la enfermedad se desarrolla por lo que la implementación de una plataforma de predicción de respuesta terapéutica temprana resulta bastante atractiva para la medicina de precisión.

6. HIPÓTESIS CIENTÍFICA

Los organoides como sistemas de estudio de leucemia infantil y simuladores de la medula ósea leucémica, permitirán evaluar la sensibilidad o resistencia de las células leucémicas a los agentes quimioterapéuticos.

7. OBJETIVOS

7.1 Objetivo general

Desarrollar una plataforma de laboratorio que brinde información personalizada sobre la sensibilidad y resistencia a fármacos en pacientes con leucemia linfoblástica aguda y que contribuya a la optimización de su tratamiento.

7.2 Objetivos particulares

- Estandarización del modelo 3D a través de líneas celulares de LLA-B.
- Evaluación de la viabilidad celular a través de citometría de flujo de las células leucémicas expuestas a diferentes fármacos y en combinación en cultivos 3D.
- Generar organoides individualizados con células primarias de pacientes leucémicos y determinar el grado de sensibilidad/quimiorresistencia a diferentes agentes quimioterapéuticos.

8. MATERIAL Y MÉTODOS

8.1 Diseño del estudio

El presente proyecto tiene un enfoque de investigación cuantitativo, con la finalidad de estudio analítico, de secuencia temporal longitudinal de cronología prospectiva y por su control de la asignación de factores de los hechos, es experimental con papel traslacional.

8.2 Ubicación espacio temporal

La investigación se aplicó a todas las muestras de trabajo que corresponden a aspirados de médula ósea pediátricas obtenidas del Hospital de Especialidades del IMSS, Puebla, así como del Hospital Infantil Federico Gómez de la CMDX durante los años 2019 y hasta marzo del 2020.

8.3 Estrategia de trabajo

La investigación se realizó después de recuperar cada aspirado de médula ósea de pacientes pediátricos al diagnóstico de LLA. Se trabajó con todas las muestras obtenidas durante los periodos comprendidos en el espacio temporal. Se obtuvieron células mononucleares de cada muestra y se colocaron en co-cultivo con esferoides de células estromales OP-9. Se incubaron con los agentes quimioterapéuticos y se evaluó su viabilidad a las 48 horas por citometría de flujo y por exclusión de azul de tripano. Se evaluaron los datos con el software FlowJo y la estadística por GrandPad Prisma 6.

8.4 Muestreo

8.4.1 Definición de la población

Pacientes pediátricos del sexo masculino o femenino menores de 18 años que fueron diagnosticados con LLA libres de tratamiento.

8.4.2 Selección de la muestra

Aspirados de médula ósea en tubos de recolección con un volumen mayor a 1 mL de aquellos pacientes pediátricos que fueron diagnosticados con LLA de recién inicio de su patología.

8.4.3 Criterios de selección de la muestra

8.4.3.1 Criterios de inclusión

- Muestras de aspirados de medula ósea (AMO) de pacientes pediátricos con LLA al diagnóstico.
- Menores de 18 años de sexo femenino y masculino.
- Pacientes cuyos padres leyeron y firmaron la carta de consentimiento informado.

8.4.3.2 Criterios de exclusión

- Muestras de AMO de pacientes pediátricos con LLA de recaída o enfermedad mínima residual.
- Mayores a 18 años.
- Muestras con viabilidad celular menor del 70% o de tiempo de procesamiento superior a 1 día.

8.4.3.3 Criterios de eliminación

- Muestras de AMO que no sean de LLA, viabilidad celular menor al 50%.
- Muestras provenientes de AMO de pacientes en remisión o en tratamiento.
- Muestras que no sean de LLA.
- Pacientes cuyos padres no aceptaron participar.

8.4.4 Diseño y tipo de muestreo

Por la naturaleza del estudio este trabajo tiene un diseño no probabilístico y un muestreo por cuotas, ya que se seleccionan a todos los pacientes que cuenten con la descripción de la definición de muestra.

8.4.5 Tamaño de la muestra

El número recolectado de muestras de AMO de pacientes con LLA infantil durante el espacio temporal establecido.

8.5 Definición de las variables y escalas de medición

Para el estudio se definieron las siguientes variables, las primeras corresponden a variables categóricas cualitativas y son:

- Sensible a la quimioterapia: el resultado arroja muerte celular de células leucémicas tras aplicar quimioterapia después de 48 horas de tratamiento.
- Quimiorresistente: el resultado arroja viabilidad celular de células leucémicas tras aplicar quimioterapia después de 48 horas de tratamiento.

8.6 Método de recolección de datos

Se utilizaron aspirados de médula ósea de pacientes pediátricos con LLA obtenidos por médicos oncólogos profesionales de las instituciones participantes. Se condujeron los co-cultivos y la viabilidad fue evaluada por exclusión de azul de tripano y citometría de flujo, utilizando marcadores celulares de superficie y moléculas impermeables alquilantes del DNA.

8.7 Técnicas y procedimientos

Líneas celulares

Células de leucemia linfoblástica aguda de células B: Nalm6, REH y RS4:11 de un bajo pase celular obtenidas de ATTC y cultivadas en las condiciones especificadas.

Células estromales médula ósea de ratón OP9 y MS-5 de bajo pase celular obtenidas de ATTC y cultivadas en las condiciones especificadas.

Muestras biológicas

Aspirados de medula ósea (AMO) de pacientes con LLA pediátricos.

Obtención de células mononucleares

A partir de AMO las células mononucleares fueron recuperadas a través de un gradiente de densidad. Brevemente, las muestras fueron diluidas con PBS 1X en proporción 1:1. Por otro lado, en tubo falcón estéril de 15 ml se colocó el mismo volumen de Ficoll de la muestra previo a la dilución y sobre el Ficoll se colocó la muestra diluida procurando no romper las fases. Se centrifugó a 400 g durante 20 minutos y se recuperó el anillo de células mononucleares (CMN) formado entre la interfase del plasma/PBS 1X y el Ficoll.

Formación de esferoides y monocapas de células estromales OP9

25,000 células OP9 en un volumen de 100 microlitros de medio de cultivo alfa-MEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) y antibióticos, se sembraron en placas de 96 pozos de fondo plano para los escenarios 2D y en placas de 96 pozos de fondo redondo recubiertos de agarosa 1% para los cultivos 3D, y fueron incubados a temperatura de 36,5 °C, 5% CO₂. Posterior a 24 horas, las monocapas y/o esferoides estromales estaban listos para los siguientes experimentos.

Preparación de quimioterapéuticos

Por cada quimioterapéutico por separado, se mezclaron 999 µL de medio RPMI con 1 µL de Daunorrubicina (5.5×10^{-6} mmol/µL), Dexametasona (5.6×10^{-6} mmol/ µL), Vincristina (2.16×10^{-3} mmol/ µL), Citarabina (4.11×10^{-4} mmol/ µL) o Metotrexato (5.5×10^{-6} mmol/ µL). Para la combinación (Mix) de fármacos se mezclaron 995 microlitros de medio RPMI y 1 µL de cada agente. Para el grupo control se usó medio RPMI (vehículo).

Ensayo de sensibilidad inducción a la remisión

Los experimentos incluyeron 3 escenarios de cultivo denominados “Libre de estroma” (LE), “Monocapa” (2D) y “Esferoide” (3D). En el primer escenario se sembraron 7 pozos con 50,000 células mononucleares en un volumen de 50 µL de medio RPMI, a un pozo se colocaron 50 µL del medio con la concentración de trabajo de cada agente quimioterapéutico y el control. Para el escenario 2D las CMN se co-cultivaron con la monocapa de OP9 previamente preparada, se adicionó el mismo número de CMN en presencia de los agentes quimioterapéuticos. Para el escenario 3D, se agregaron en cada pozo con un esferoide formado, 50,000 células de las líneas celulares, CMN o blastos leucémicos purificados en presencia de los agentes quimioterapéuticos y control. Los cultivos permanecieron a 36,5 °C, 5% CO₂ durante 48 horas.

Viabilidad por exclusión de azul de tripano (AT)

Al pasar 48 horas de incubación, las células fueron cosechadas. Para los co-cultivos en 2D, las células leucémicas o CMN se recuperaron cuidadosamente con ayuda de la pipeta evitando despegar la monocapa estromal. Para el caso de los cultivos

3D, el organoide fue retirado cuidadosamente, lavado con 100 μ L de PBS 1x en otro pozo y finalmente incubado en 100 μ L de tripsina 0.25% a 36,5 °C durante 10 minutos. Posterior a la incubación, el esferoide se disgregó mecánicamente con ayuda de la pipeta para obtener una suspensión celular. Para cada condición se determinó la viabilidad celular en cámara de Neubauer con ayuda del microscopio óptico combinando 10 μ L de cada muestra y 10 μ L de AT.

Citometría de flujo

Las células recuperadas de cada condición se colocaron en tubos de 5 mL y se incubaron con el anticuerpo anti-CD45 y/o anti-CD19 y marcadores de viabilidad celular como DAPI y/o 7-AAD durante 15 min a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de incubación se realizaron lavados con 1 mL de PBS 1 x centrifugando a 1500 rpm durante 5 min. El sobrenadante fue descartado y el botón celular resuspendido con 200 μ L de PBS 1x. Las muestras se adquirieron en el citómetro FACSCanto II (BD Biosciences).

8.8 Análisis de datos

Los datos se analizaron utilizando el software FlowJo 10.0.8 (LLC). El software GrandPad Prism V6 (GraphPad) se utilizó para realizar análisis de datos estadísticos.

8.9 Diseño estadístico

La diferencia dentro de los grupos se estableció mediante pruebas ANOVA de dos vías y aplicando estadística no paramétrica Kruskal-Wallis, considerando valores de probabilidad significativos <0.05 .

9. RESULTADOS

9.1 Evaluación de la permeabilidad de los organoides leucémicos a doxorrubicina. Se prepararon organoides leucémicos con esferoides estromales OP9 y la línea celular NALM6 co-cultivados por 48 horas. Posteriormente, los organoides se retiraron cuidadosamente de cada pozo, se lavaron y se incubaron con Doxorrubicina 5 nM por diferentes tiempos. Después de la incubación, se digirieron enzimáticamente y se realizó el marcaje de CD45 para distinguir a los blastos leucémicos de las células estromales mediante citometría de flujo. La doxorrubicina es capaz de permear al interior de la estructura tridimensional de los organoides debido a la adquisición de fluorescencia roja tanto en la población de blastos CD45⁺ (recuadro rojo) y en la población estromal (recuadro verde) a medida que pasa el tiempo de incubación (**Figura 11**). La permeabilidad de los organoides por el fármaco también fue confirmada por microscopia de fluorescencia (**Figura 11**).

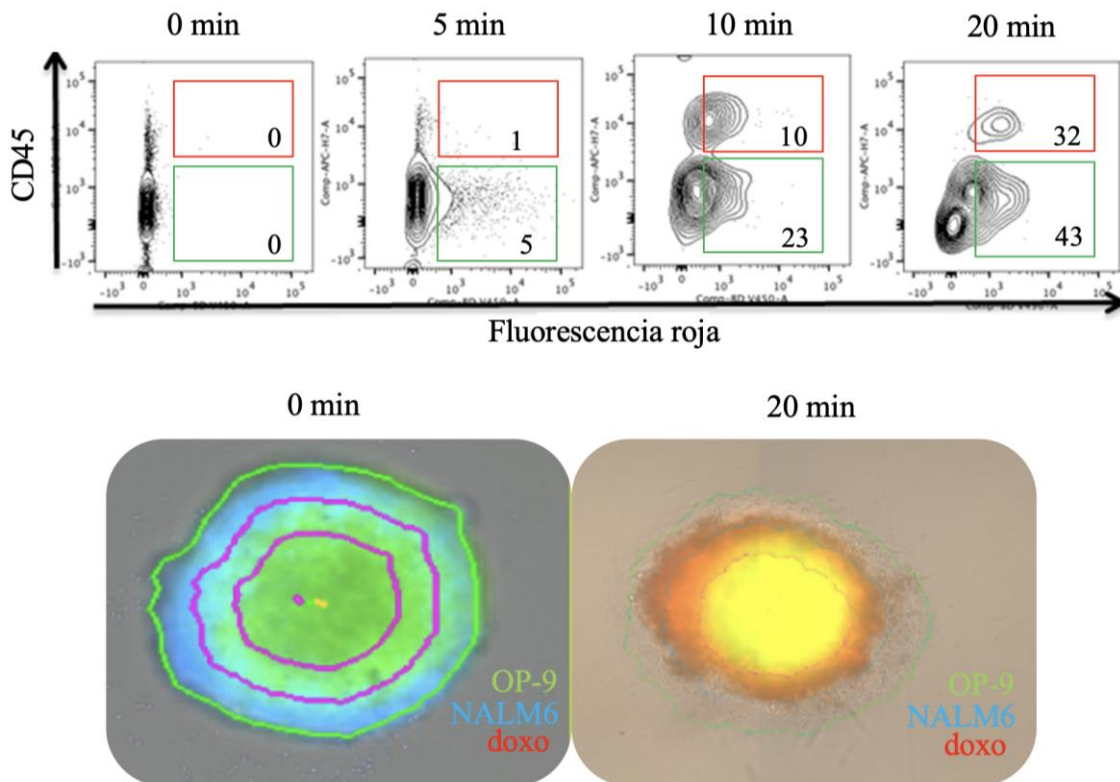


Figura 11. Los organoides leucémicos son permeables a fármacos como doxorrubicina. Diferentes organoides leucémicos fueron incubados con doxorrubicina (doxo) 5nM durante 5, 10 o 20 minutos. Posteriormente, fueron lavados, digeridos enzimáticamente y marcados con CD45. Se muestra el

porcentaje de cada población (panel superior). La permeabilidad de organoides OP9-GFP (verde) formados con células NAML6 (azul) para la doxorubicina (rojo) fue confirmada por microscopía de fluorescencia (panel inferior).

9.2 Las células leucémicas quedan protegidas de la quimioterapia al interior de los organoides.

Una vez confirmada la permeabilidad de los organoides a agentes terapéuticos se evaluaron las posibles diferencias en la viabilidad celular entre las poblaciones del interior de los organoides y aquellas que se encontraron en el exterior al momento de la cosecha. Para investigar lo anterior, diferentes organoides leucémicos fueron incubados con Daunorrubicina, dexametasona, vincristina, Citarabina, metotrexato o en combinación (MIX) durante 48 horas. Posteriormente, los organoides fueron retirados del pozo del cultivo, lavados y disgregados enzimáticamente. Las suspensiones celulares del exterior de los organoides y aquellas obtenidas tras la digestión enzimática fueron sometidas a un marcaje con CD45 y DAPI. Interesantemente, el tratamiento con dexametasona y prednisona no mostró diferencias significativas entre los grupos. Sin embargo, existen diferencias entre la viabilidad de las células que habitan el interior (azul) de las estructuras con aquellas que residen fuera (verde) de las mismas bajo tratamiento con vincristina, Citarabina, metotrexato o la combinación (MIX) (**Figura 12a**). Estos resultados confirman que las células que residen al interior de los organoides quedan protegidas contra algunos agentes quimioterapéuticos (**Figura 12b**). En contraste, las células que habitan nichos externos resultaron sensibles a algunos fármacos y al tratamiento combinado (**Figura 12c**).

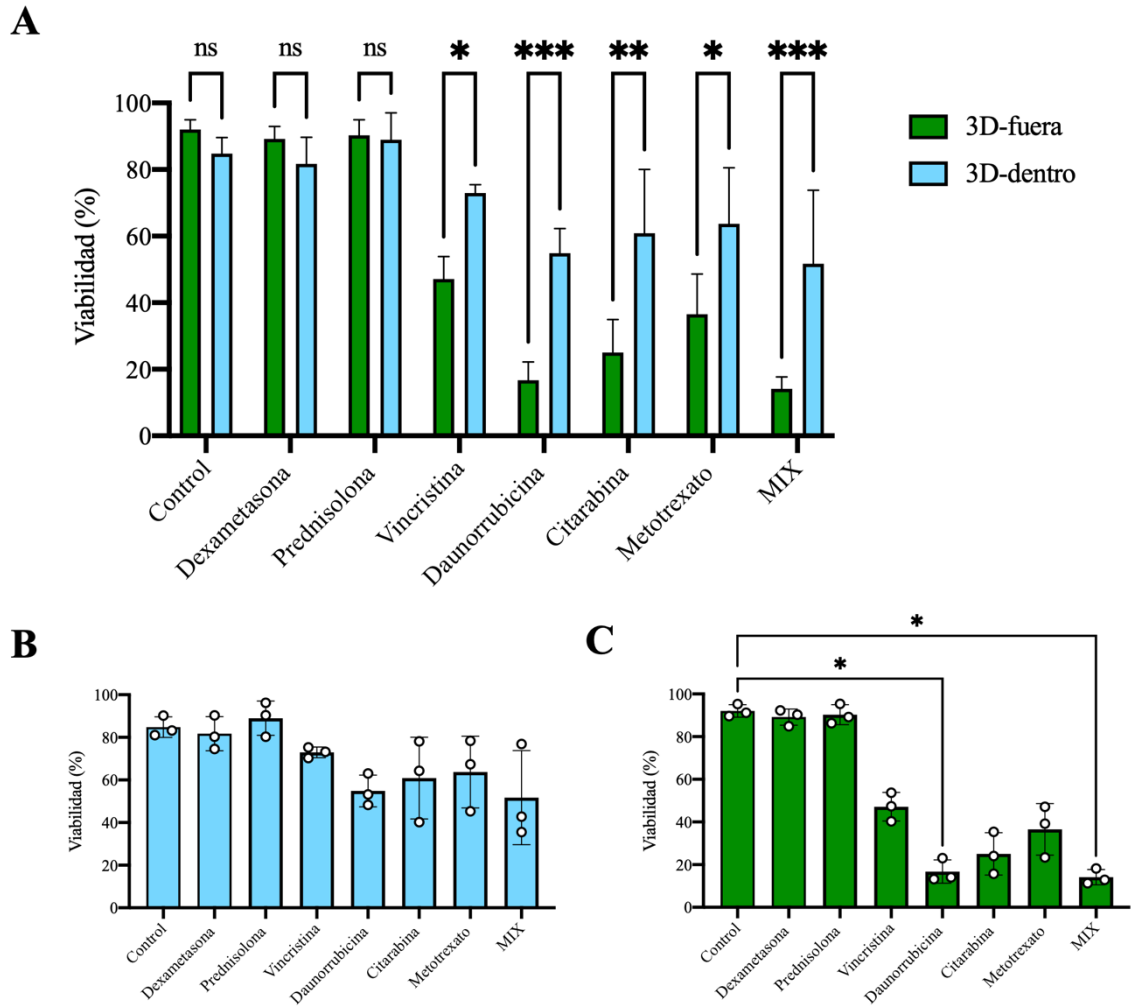


Figura 12. Las células leucémicas quedan protegidas de la quimioterapia al interior de los organoides. (A) Organoides leucémicos fueron expuestos durante 48 horas a diferentes fármacos y la viabilidad celular de los blastos CD45⁺ fue evaluada a través de citometría de flujo en las células recuperadas del (B) interior (azul) de los organoides y del (C) exterior (verde). $p < 0.05$.

9.3 Estandarización de las plataformas de predicción de resistencia/sensibilidad a fármacos a través de líneas celulares de LLA-B.

Para la construcción de los organoides de medula ósea se utilizó la línea celular OP9 y tres líneas celulares de LLA-B: NALM6, REH y RS4:11. Para evaluar la actividad antitumoral de los fármacos de la quimioterapia estándar, las células leucémicas se cultivaron en escenarios libres de estroma (LE) o en co-cultivo con monocapas (2D) y en esferoides estromales (3D) en presencia de las diferentes drogas terapéuticas durante 48 horas. Debido a las observaciones previas, para el caso del modelo 3D se optó por comparar únicamente la viabilidad en las células del exterior al momento de la cosecha con las demás condiciones de cultivo (**Figura 13**). Los resultados obtenidos a través de las diferentes líneas celulares sugieren que todos los fármacos empleados comprometen la viabilidad de las células leucemias en condiciones libre de estroma (LE) a excepción del tratamiento con dexametasona y prednisolona (**Figura 13A-C**). La combinación de fármacos (MIX) sugiere tener un efecto aditivo ya que disminuye la viabilidad celular de forma estadísticamente significativa (**Figura 13**).

Mientras que la daunorrubicina impacta significativamente en la viabilidad de las células REH y RS4:11, los co-cultivos en 2D reducen su efecto, sobre todo en los escenarios 3D (**Figura 13B y C**). Observaciones similares fueron encontradas para el tratamiento con vincristina y citarabina para las células NALM6 (**Figura 13A y C**). Interesantemente, esta línea celular resulto estar mejor protegida por el microambiente tanto en los sistemas 2D y 3D (**Figura 13A**).

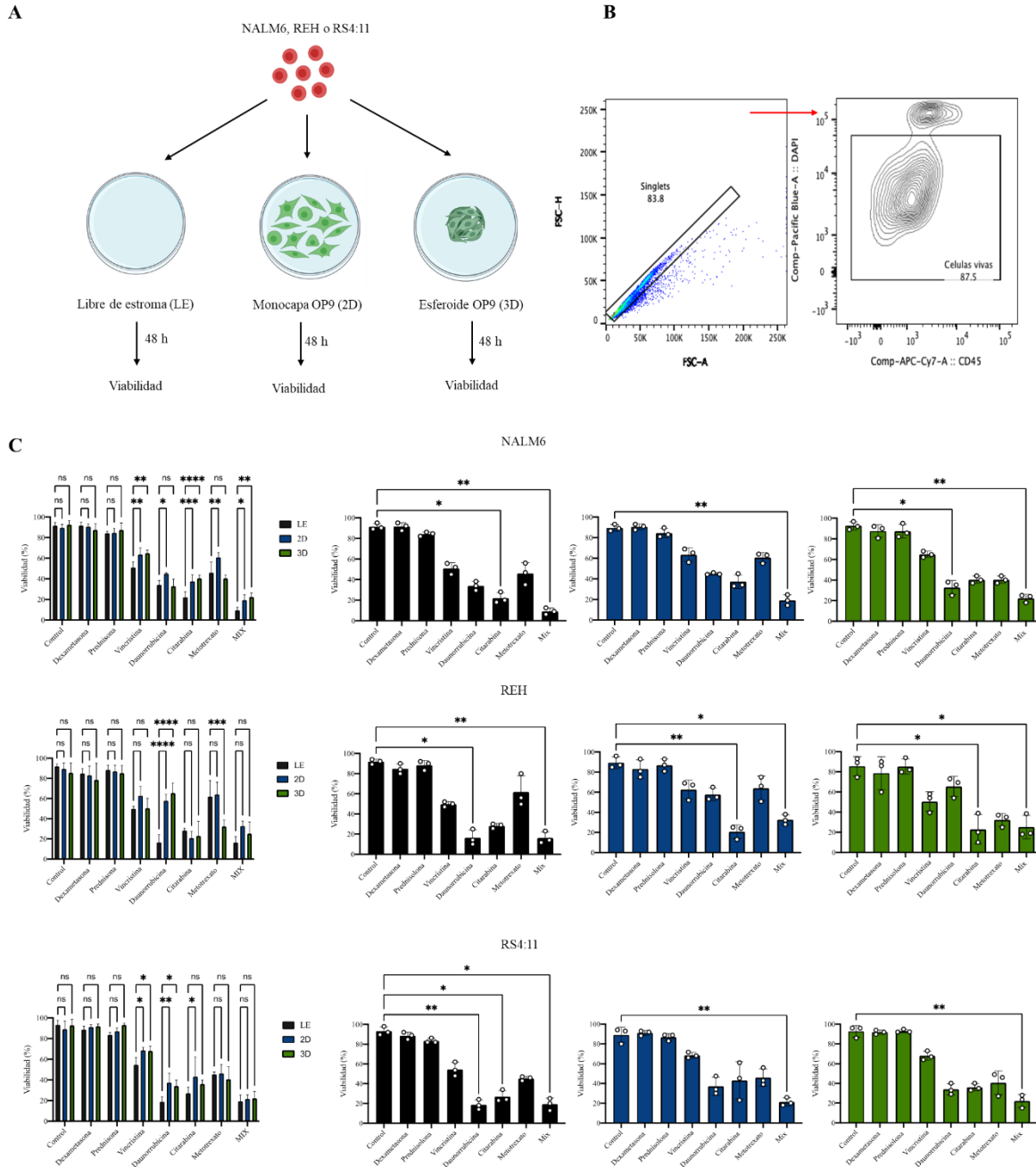


Figura 13. Sensibilidad de líneas celulares leucémicas tratadas durante 48 horas con fármacos quimioterapéuticos en cultivos libre de estroma, 2D y 3D. (A) 50,000 células de la línea NALM6 REH o RS4:11 fueron sometidas a diferentes tratamientos con fármacos de la quimioterapia estándar por 48 horas en escenarios libre de estroma (negro) o co-cultivadas en monocapas 2D (azul) o esferoides 3D (verde) del estroma OP9. **(B)** Estrategia de análisis por citometría de flujo luego de marcaje con DAPI de las células viables. **(C)** Las gráficas muestran el porcentaje de viabilidad para cada línea celular comparando por condición y por tratamiento $p < 0.05$.

Gracias a la implementación de líneas celulares se logró estandarizar la plataforma de producción de respuestas terapéuticas únicas y combinadas. A pesar de que las células NALM6, REH y RS4:11 fueron derivadas de la misma enfermedad, nuestros resultados demuestran que tienen sensibilidad variable a los fármacos, sin embargo, la sensibilidad queda críticamente reducida cuando las células leucemias se encuentran bajo la protección de células estromales del nicho. Aunque las líneas celulares presentan resistencia a dexametasona y prednisona, la Daunorrubicina y la Citarabina tienen efectos de eliminación sustanciales en las células REH a través de cultivos libre de estroma, pero su efecto se reduce sustancialmente en cultivos 2D y 3D como puede apreciarse en el quimiograma (**Figura 14**).

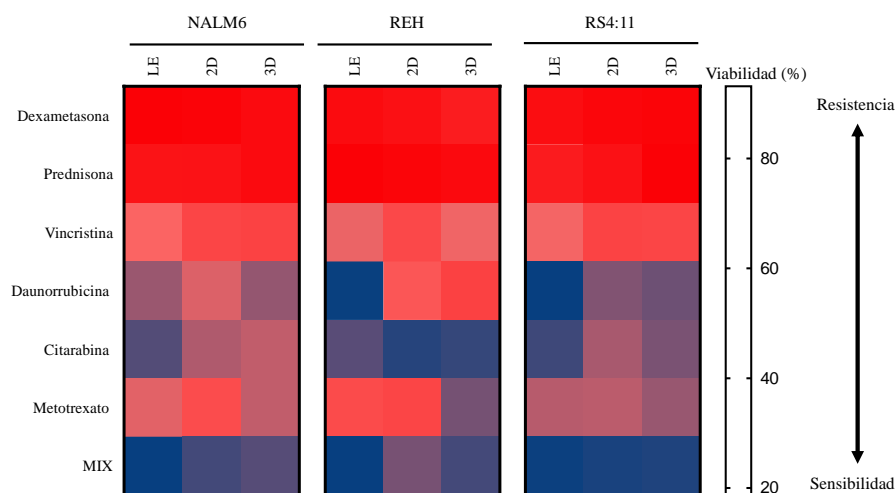


Figura 14. Mapa de calor del quimiograma de tratamiento de leucemia aguda en líneas celulares de LLA-B. Se muestra la sensibilidad (azul) o resistencia (rojo) a fármacos de la terapia estándar para las líneas celulares NALM6, REH y RS4:11 leucemia aguda tratadas en sistemas libre de estroma (LE) o en co-cultivo en monocapa (2D) o esferoides (3D) estromales OP9.

9.4 Sensibilidad de células mononucleares de pacientes con LLA al diagnóstico a los fármacos terapéuticos.

Se evaluó la sensibilidad de células mononucleares (CMN) aisladas de aspirados de médula ósea de 3 pacientes diagnosticados con LLA. Las CMN se cultivaron en escenarios libres de estroma (LE) o en co-cultivo con monocapas (2D) y en

esferoides estromales (3D) en presencia de las diferentes drogas terapéuticas durante 48 horas. Para esta serie de experimentos se realizó cuenta por exclusión de azul de tripán para conocer la densidad celular en los cultivos y la viabilidad fue evaluada por marcaje de DAPI por citometría de flujo. Los resultados obtenidos mostraron una gran heterogeneidad entre las respuestas a fármacos, así como al crecimiento en las condiciones experimentales de cultivo. De especial interés, la viabilidad de las CMN de uno de los pacientes sugiere resistencia a daunorrubicina en sistemas LE, sin embargo, el número de células totales confirma su parcial eliminación al compararse con el control. No obstante, los cultivos 3D incrementan la viabilidad para casi todos los fármacos y de forma alarmante que el número de células del tratamiento combinado (MIX) es comparable con el control (**Figura 15A**). Sorprendentemente, la viabilidad de otro paciente no varió a pesar de los diferentes tratamientos, aunque el número total de células se logra reducirse en cultivos LE, los sistemas 2D y 3D logran mantener un mayor número de células viables luego del tratamiento mixto (**Figura 15B**). Para otro caso, la resistencia a dexametasona y vincristina parece ser aparente en sistemas LE (**Figura 15C**). Contrastantemente, los sistemas 2D y 3D sugieren lo contrario cuando se analiza el número absoluto celular. Llama la atención que la aparente sensibilidad a citarabina se pierde cuando se combinan la terapia (**Figura 15C**). Una observación similar puede apreciarse para el tratamiento con metrotexato (**Figura 15B**).

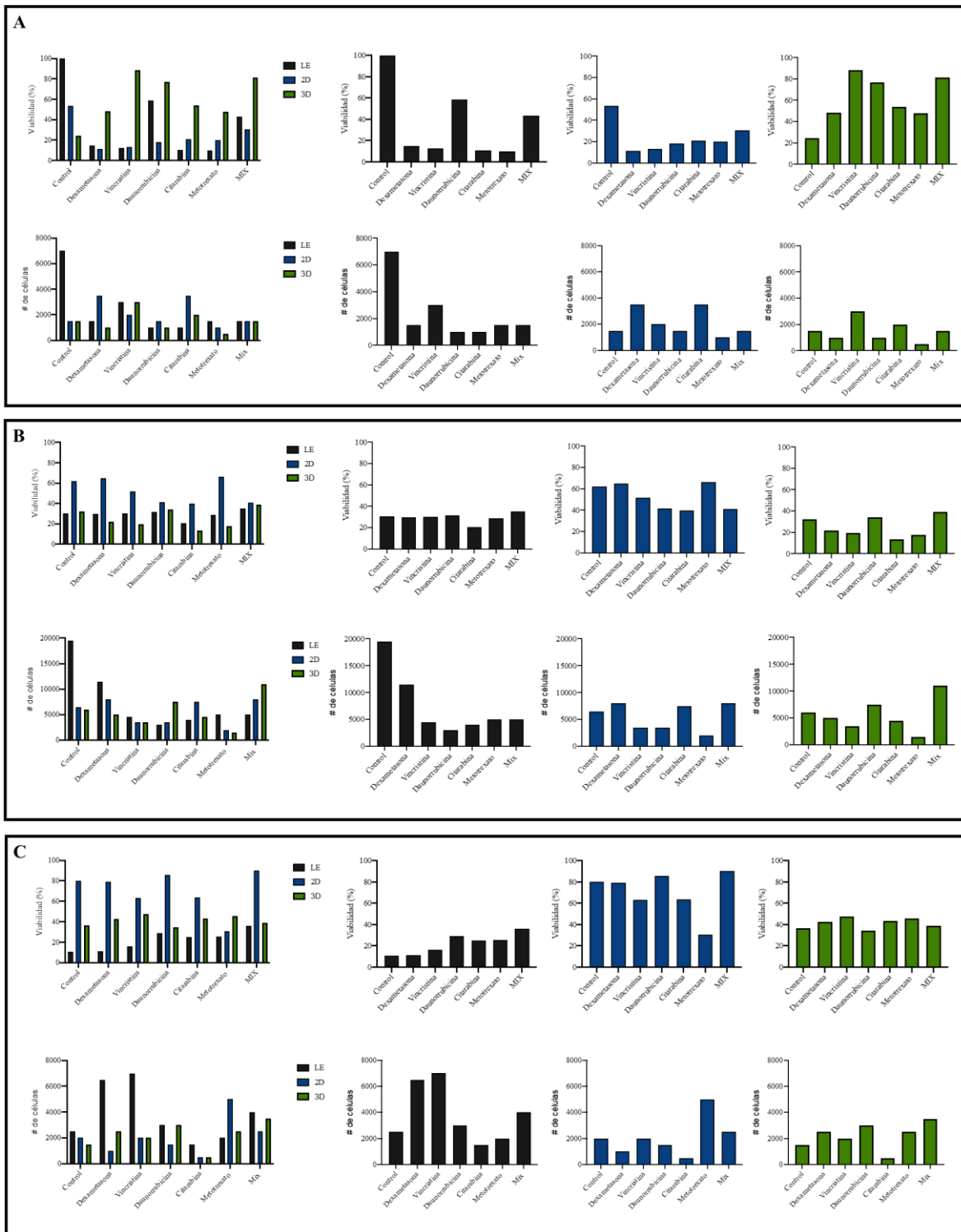


Figura 15. Sensibilidad de células mononucleares de pacientes con LLA-B a fármacos de la quimioterapia. 50,000 células mononucleares de tres pacientes (A-C) fueron sometidas a diferentes tratamientos con fármacos de la quimioterapia estándar por 48 horas en escenarios libre de estroma (negro) o co-cultivadas en monocapas 2D (azul) o esferoides 3D (verde) del estroma OP9. Las

gráficas muestran las diferencias en el porcentaje de viabilidad (panel superior) y cuenta celular absoluta (panel inferior) por condición y por tratamiento.

Los resultados previos sugieren que los sistemas 3D pueden ser de utilidad para predecir la respuesta clínica de los pacientes frente a cada fármaco de la terapia o su combinación. Aparentemente, las células de uno de los pacientes (P1) sugiere una mayor resistencia al tratamiento destacando que vincristina y daunorrubicina son los principales componentes en el perfil de resistencia. En contraste, según los datos obtenidos se espera que el paciente P2 responda mejor al mismo esquema terapéutico (**Figura 16**). Desafortunadamente el desenlace clínico del paciente P1 no se conoce, sin embargo, el P2 presentó recaída 8 meses después de haber iniciado el tratamiento y el P3 falleció. Aunque los resultados del quimiograma sugieren buena respuesta al tratamiento en el P2 existen algunas clonas resistentes que posiblemente pudieran estar asociadas con la recaída (**Figura 15B y 16**), mientras que el desenlace fatal del P3 puede estar ligado a la quimiorresistencia observada en las plataformas.

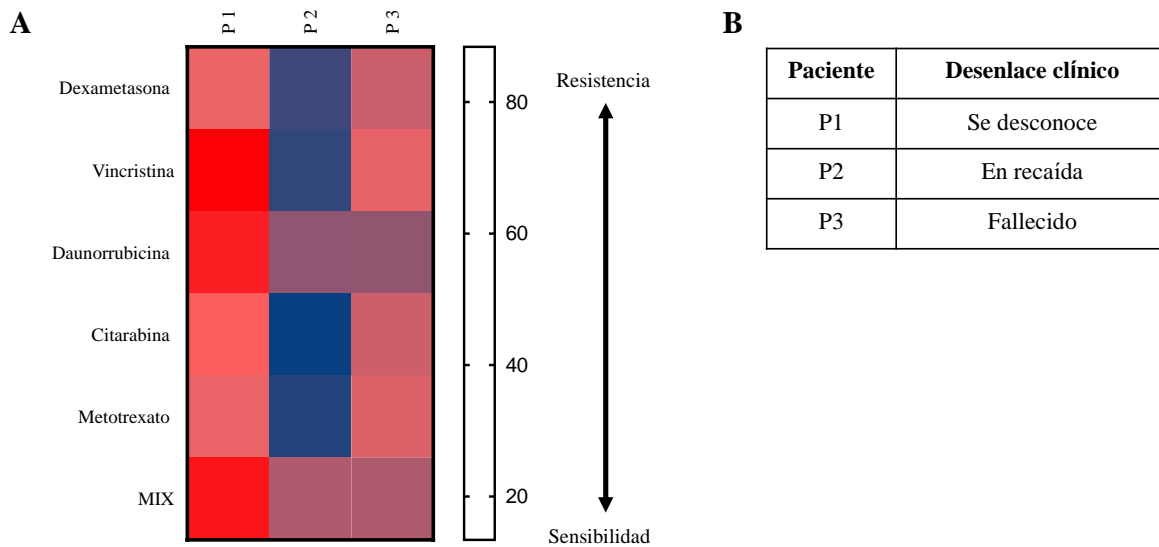


Figura 16. Quimiograma para el tratamiento de leucemia linfoblástica aguda. (A) Se muestra la sensibilidad (azul) o resistencia (rojo) a fármacos de la terapia estándar para células mononucleares obtenidas de tres pacientes (P1-3) diagnosticados con leucemia aguda tratadas en sistemas tridimensionales con esferoides estromales. (B) Desenlace clínico de los pacientes.

9.5 La sensibilidad blastos leucémicos primarios a fármacos terapéuticos puede determinarse a través de las plataformas tridimensionales.

Dado que el porcentaje de blastos leucémicos dentro de la población de células mononucleares es variable a través de los pacientes, se evaluó la sensibilidad a los agentes quimioterapéuticos en poblaciones de blastos preB (CD45^{low}CD19⁺CD10⁺CD34⁻) altamente purificados a través de *cell sorting* (Figura 17).

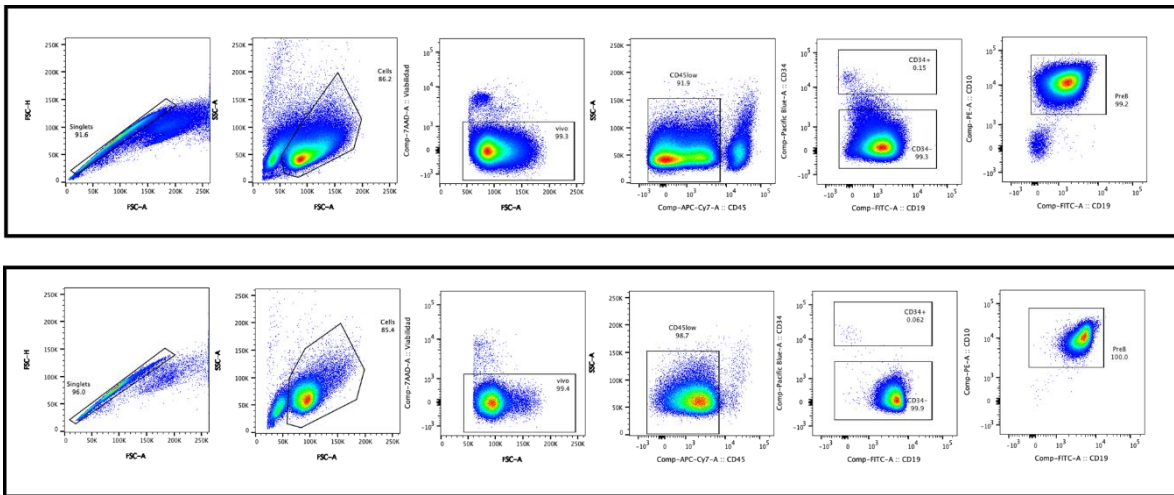


Figura 17. Estrategia de *gating* para la purificación de blastos leucémicos primarios a través de citometría de flujo. Las células mononucleares (CMN) provenientes de aspirados de médula ósea de dos pacientes con LLA-B fueron incubadas con anti-CD45, anti-CD19, anti-CD10 y anti-CD34 en presencia de 7-AAD. Las CMN fueron sometidas a *cell sorting* a través de la citometría FACS Aria II. La estrategia de selección (*gating*) de poblaciones de blastos con fenotipo preB (CD45^{low}CD19⁺CD10⁺CD34⁻) se indica para ambas muestras.

Para tal objetivo se prepararon las mismas condiciones de cultivo: escenarios libres de estroma (LE) o en co-cultivo con monocapas (2D) y en esferoides estromales (3D) en presencia de las diferentes drogas terapéuticas durante 48 horas. El número de células recuperadas al final de los cultivos se determinó por cuenta de exclusión de azul de tripán y la viabilidad a través del marcaje con DAPI por citometría de flujo. Sorprendentemente obtenidos en los blastos para ambos pacientes sugieren resistencia a la mayoría de los agentes terapéuticos a excepción de la

Daunorrubicina, donde aparentemente su presencia es suficiente durante el tratamiento combinado para eliminar a la población tumoral *in vitro* (Figura 18). Sin embargo, el co-cultivo 2D de los blastos purificados incrementa la viabilidad de las células leucémicas y en mayor medida a través de co-cultivos 3D (Figura 18). Contrastantemente, el número total de blastos residuales fue mucho menor en los sistemas 3D en el paciente 4 (P4) (Figura 18A) mientras que en el P5 la enfermedad residual resultó ser más alta que el control (Figura 18B).

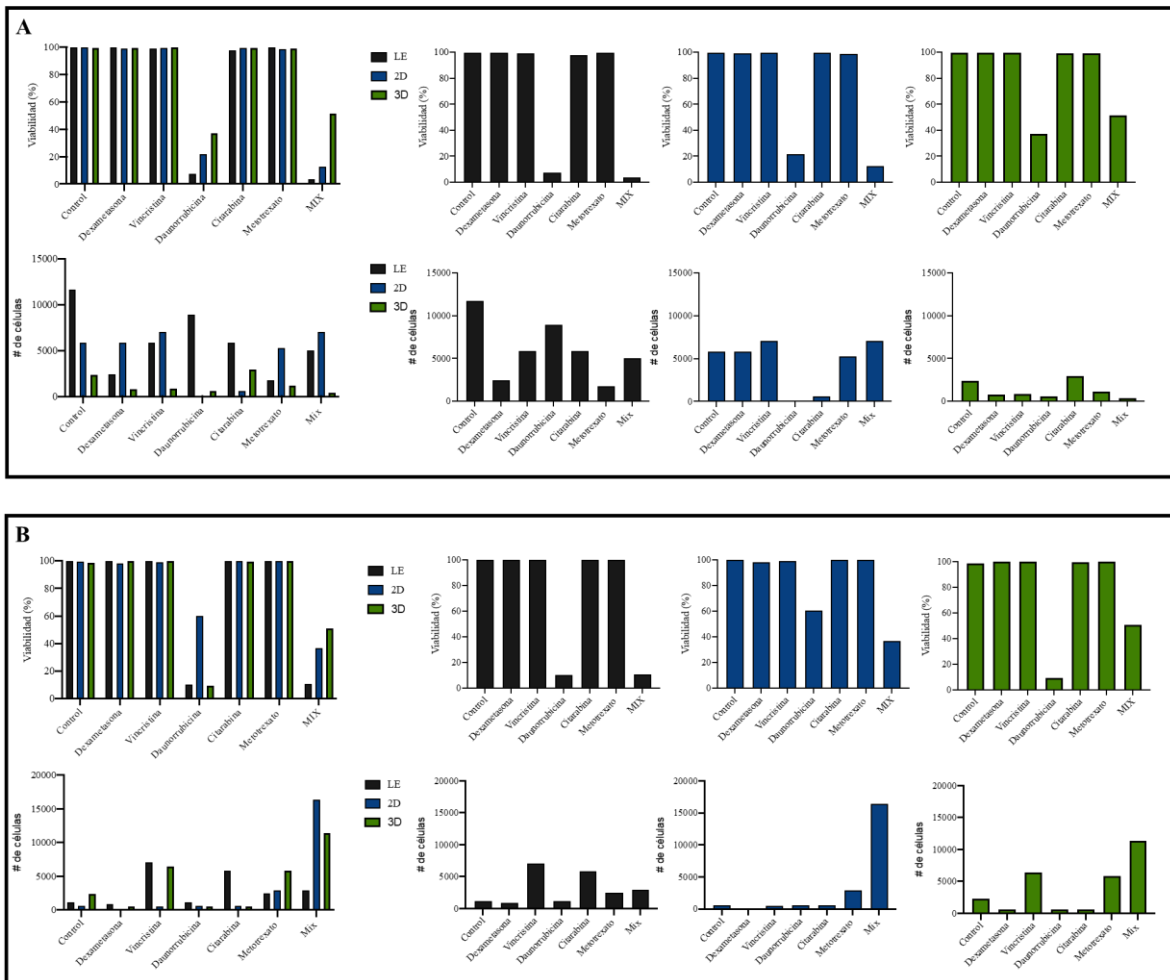


Figura 18. Sensibilidad de blastos leucémicos primarios a fármacos quimioterapéuticos en el contexto del nicho. 50,000 blastos altamente purificados de dos pacientes (A-B) fueron sometidos a diferentes tratamientos con fármacos de la quimioterapia estándar por 48 horas en escenarios libre de estroma (negro) o co-cultivados en monocapas 2D (azul) o esferoides 3D (verde) del estroma OP9. Las gráficas muestran las diferencias en el porcentaje de viabilidad (panel superior) y cuenta celular absoluta (panel inferior) por condición y por tratamiento.

El análisis de la viabilidad de los blastos purificados del P5 sugiere resistencia al tratamiento con dexametasona, vincristina, citarabina y metotrexato, mientras que el tratamiento con daunorrubicina parece sensibilizarlos (**Figura 19A**). Los resultados de la clínica del paciente 5 confirmaron la resistencia pronosticada por los datos experimentales obtenidos a través del quimiograma (**Figura 19B**).

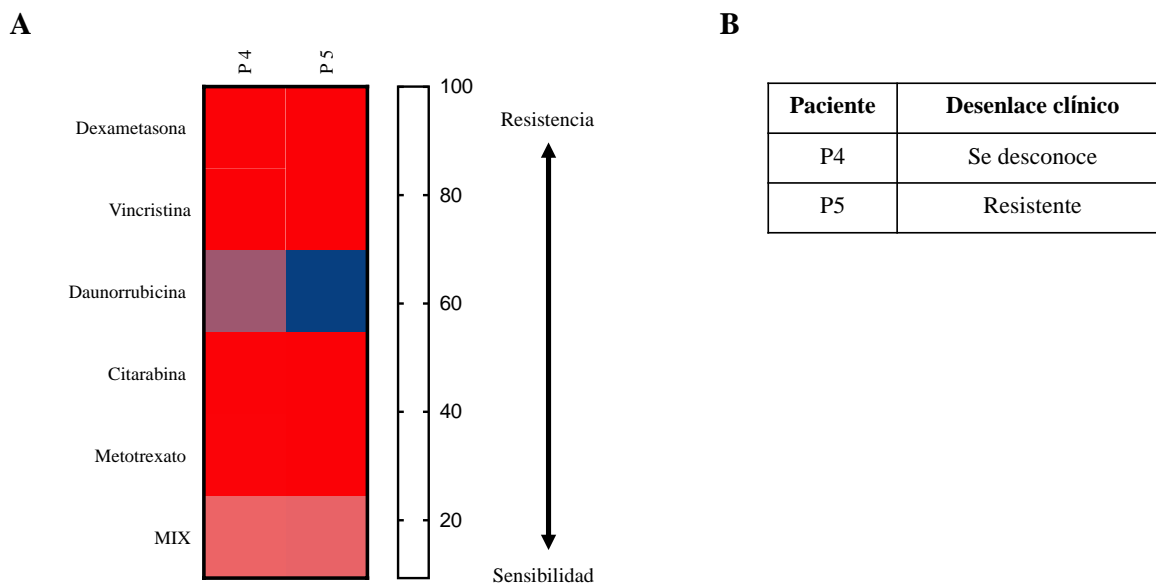


Figura 19. Quimiograma para los blastos leucémicos. (A) El mapa de calor muestra la sensibilidad (azul) o resistencia (rojo) a fármacos de la terapia estándar para blastos altamente purificados por citometría de flujo de dos pacientes (P4-5) diagnosticados con leucemia aguda tratados en sistemas tridimensionales con esferoides estromales. (B) Desenlace clínico de los pacientes.

10. DISCUSIÓN

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es la principal causa de muerte por enfermedad en la edad pediátrica en todo el mundo, particularmente en países en desarrollo donde además la población infantil se concentra. Estudios epidemiológicos han señalado a Latinoamérica como una de las regiones de mayor riesgo, y varios estudios han puesto a México como una de las naciones con mayor tasa de morbilidad y mortalidad. A pesar de los avances en el diagnóstico y el tratamiento, la resistencia a la terapia y las recaídas continúan siendo los principales retos para la clínica.

La LLA es una enfermedad compleja y heterogénea donde más de doscientas mutaciones y rearrreglos cromosómicos están asociados lo que dificulta mucho la posibilidad de hallar marcadores que puedan ser de utilidad para la clínica. Algunas aberraciones han servido para categorizar a los subtipos moleculares en aquellos de riesgo estándar o de alto riesgo, sin embargo, la respuesta terapéutica en ocasiones opuesta a la reportada internacionalmente. Diversas hipótesis han surgido por varios grupos de investigación para explicar este fenómeno, incluyendo el papel del microambiente hematopoyético en la generación de fenotipos resistentes a la terapia.

Existen aproximaciones experimentales para investigar la resistencia o sensibilidad a drogas terapéuticas, pero la mayoría de ellas no incluye al microambiente o están hechas a través de cultivos en monocapa que no logran simular la gran conectividad celular y los nichos hipóxicos que existen *in vivo*.

En la última década, la oncología moderna ha trasladado sus sistemas de experimentación a modelos tridimensionales basados en organoides debido a la gran similitud de las respuestas biológicas que se observan *in vivo*, disminuyendo así el uso de animales y los elevados costos de su mantenimiento, además una gran ventaja de los organoides es que permite tener un modelo de estudio a microescala donde sus componentes son completamente de origen humano. El microambiente juega un papel clave en la regulación de la hematopoyesis normal,

donde la alta conectividad celular es indispensable para el establecimiento de nichos funcionales. Durante la leucemia estos nichos son remodelados y utilizados por las células leucémicas para generar santuarios donde se protegen de la quimioterapia. Aunque los organoides tumorales han sido explorados para otros tipos de cáncer, en nuestro laboratorio hemos sido pioneros en la aplicación de organoides para el estudio del nicho leucémico. Datos directos sugieren que células iniciadoras de la leucemia (CIL) son reclutadas de forma preferente al interior de los esferoides estromales para formar organoides leucémicos que se comportan como unidades formadoras leucémicas. Lo anterior fue demostrado a través de sistemas de xenotrasplante donde el mayor injerto leucémico se obtuvo cuando se trasplantaron las células recuperadas del interior de los organoides. Las CIL son refringentes a los agentes quimioterapéuticos debido a sus propiedades de troncalidad, por lo tanto, si los organoides promueven su mantenimiento, las CIL deberán sobrevivir al tratamiento estándar.

En este trabajo confirmamos que las células leucémicas que habitan los nichos más internos pueden ser penetrados por moléculas con actividad farmacológica como la doxorubicina. Debido a su naturaleza química, la doxorubicina es fluorescente cuando es excitada por una longitud de onda específica (43). De este modo, fuimos capaces de determinar su permeabilidad en los organoides a través del tiempo cuantificando la fluorescencia roja en las células estromales y leucémicas que conforman los organoides por citometría de flujo y microscopia de fluorescencia.

El clorhidrato de doxorubicina (DOX) fue el primer quimioterapéutico usado contra el cáncer que recibió aprobación clínica contra neoplasias malignas que incluyen tumores sólidos, leucemias, trasplantables y linfomas. DOX es una molécula pequeña de aproximadamente 543.52 g/Mol y se encuentra encapsulado en liposomas (44). Además, es un glicósido con carácter anfótero ya que por un lado posee grupos fenólicos del anillo que le aportan carácter ácido y por otro lado presenta una función básica en el anillo de amino-azúcar. Finalmente, el anillo de antraciclina le aporta a la molécula carácter lipofílico que le permite difundir las membranas celulares (45).

Se ha descrito que las células leucémicas pueden colonizar los organoides debido a la acción del eje CXCR4/CXCL12 (Balandrán JC et al, en revisión). Además, el interior de los esferoides es altamente hipóxico y promotor de la quiescencia. Posiblemente, las CIL son más dependientes de este nicho para escapar de la quimioterapia. Interesantemente, la viabilidad de las células leucémicas del interior de los organoides tratados con agentes farmacológicos fue significativamente mayor comparada con las células de nichos externos. El análisis de ciclo celular de las células leucémicas de los escenarios externos e internos dan soporte a este hallazgo ya que la población interna se encuentra en quiescencia mientras que las del exterior se encuentran en proliferación. Además, células con alta actividad en bombas ABC expulsoras de fármacos también se enriquecen al interior de los organoides (Balandrán JC et al, en revisión). En conjunto, los datos presentados sugieren que las células tumorales se protegen de la quimioterapia gracias al microambiente que habitan, y son altamente dependientes de estas señales dado que, en ausencia del estroma, las células malignas son más sensibles a la terapia.

La construcción de plataformas altamente personalizadas debe tomar en cuenta la implementación de nichos del propio individuo, sin embargo, la derivación de las células estromales mesenquimales (CEM) humanas de la médula ósea toma alrededor de 3 semanas. No obstante, la línea celular OP9 derivada de fibroblastos de la médula ósea de ratón ha sido ampliamente utilizada debido a su gran soporte hematopoyético *in vitro* (46) promoviendo importantemente los programas de diferenciación linfóide. Por este motivo, pensamos que un estroma genérico proporcionado por esta línea celular sería de utilidad para evaluar el papel del nicho en la protección de células leucémicas. La línea celular de fibroblastos humanos de médula ósea HS-5 fue considerada para este estudio, sin embargo, debido a la gran cantidad de citocinas que favorecen la mielopoyesis su implementación quedó descartado ya que el mantenimiento de células linfoides quedaría en desventaja en este nicho.

Para el establecimiento del sistema se utilizaron las líneas celulares Reh, RS4;11 y NALM6, todas son de progenitores de células B derivadas de pacientes con LLA de

primera recaída, a pesar de que las líneas celulares crecen en ausencia de estroma otros trabajos de nuestro laboratorio han demostrado que responden a señales microambientales. Cuando las líneas celulares fueron tratadas con los agentes farmacológicos se observa que la viabilidad con dexametasona y prednisolona es equiparable al grupo control, presumiblemente todas ellas pudieron haber generado algún tipo de resistencia a medicamento del tipo esteroideo (47,48).

Al trasladar la plataforma de líneas celulares a células primarias detectamos variabilidad en la viabilidad de las células mononucleares en los escenarios de cultivo, lo anterior no es sorprendente debido a los requerimientos microambientales para su crecimiento. Aunque se esperaba que los cultivos 3D incrementaran la viabilidad de las células primarias, esto no ocurrió para las CMN derivadas de pacientes presumiblemente por la falta de algunas citocinas como IL-7 o SCF, aunado a la heterogeneidad poblacional de las CMN ya que no todas ellas eran células tumorales. Sin embargo, al analizar la respuesta a los diferentes tratamientos pudimos detectar diferencias sustanciales en términos de sensibilidad y en contexto microambiental. Cabe destacar que en algunos casos encontramos un mayor número de células viables recuperadas al final del cultivo a pesar de su baja viabilidad, por lo que este factor se deberá considerar para pruebas futuras.

La variabilidad de las respuestas de los quimioterapéuticos puede estar dada por varias respuestas propias de los blastos que les proporciona resistencia o ventaja sobre el mecanismo de acción de los fármacos. Existe evidencia de que entre el 15 y el 30% de las muestras de leucemia linfoblástica aguda (LLA) son resistentes a los glucocorticoides (36). Se ha reportado que las células de leucemia linfoblástica aguda de T (LLA-T) adquieren resistencia a la muerte a dexametasona a través de la activación anormal del gen Akt, lo que da como resultado la inhibición de la vía FoxO3a/Bim. Akt es una vía de transducción de señales que promueve la supervivencia y el crecimiento en respuesta a señales extracelulares. A su vez, su estado de resistencia está asociado con un aumento de la glucólisis, mutaciones activadoras de NOTCH1 y la vía de las cinasas PI3K / GS séricas activadas (49). En concordancia, se ha demostrado que varios factores de transcripción de la

familia de FoxO están regulados positivamente por glucocorticoides en células de LLA pre-B (50).

Los mecanismos de resistencia a los agentes antimitóticos como la vincristina son complejos y en gran parte desconocidos (51). Está bien establecido que la tubulina es el blanco de fármacos antimitóticos como taxanos, epotilonas y alcaloides derivados de la vinca. Estos agentes se unen a la β -tubulina y actúan interrumpiendo la dinámica de los microtúbulos, que causa detención mitótica y muerte celular. Sin embargo, alteraciones de los microtúbulos como los mutantes de γ -actina y β -tubulina o sus isotipos como BII, β III y β V y la pérdida concomitante de γ -actina *wild type* y la expresión alterada de las proteínas de los microtúbulos a menudo se asocian con la resistencia celular a estos fármacos. Importantly, la resistencia puede ser innata o adquirida durante o después del tratamiento farmacológico donde el microambiente puede ser clave en la adquisición de los fenotipos de resistencia farmacológica adquirida (51,52).

A pesar de que los regímenes de quimioterapia de primera línea que contienen citarabina (ara-C) inducen una respuesta completa en 65-80% de los pacientes diagnosticados con LMA, la mayoría de los pacientes recaen con enfermedad resistente y respuesta deficiente a las terapias posteriores (53). El mecanismo principal que subyace a la resistencia a ara-C y sus derivados está relacionado a las concentraciones que el fármaco presenta intracelularmente en cada paciente administrado. La variación genética en genes de la vía metabólica ara-C parece ser la respuesta donde la desoxicitidina cinasa 5'-nucleotidasa, citidina desaminasa y desoxicitidilato desaminasa (enzimas inactivadoras), así como la ribonucleótido reductasa (RRM1 y RRM2, enzimas que regulan los grupos intracelulares de desoxicitidina trifosfato) forman la base molecular de la variabilidad en respuestas a ara-C. Otros mecanismo que no permiten la concentración intracelular efectiva es la actividad del transportador hENT1 (53).

La resistencia a múltiples fármacos (RMF) es mediado por transportadores ABC (*ATP-binding cassette*), donde la glicoproteína P-1 (P-gp) codificada por gen de resistencia a múltiples fármacos 1 (MRP1) expulsa una gran cantidad de

xenotóxicos al exterior de la célula. Interesantemente, las bombas ABC se sobreexpresan en líneas celulares seleccionadas en este trabajo por lo que los cuadros de resistencia observados pueden deberse a este mecanismo ya que varios agentes quimioterapéuticos utilizados de manera frecuente como la doxorubicina, vincristina y el metotrexato, son sustratos de la P-gp o son susceptibles a la salida a través de otras proteínas RMF (54).

La línea celular REH son células inmortalizadas de sangre periférica de LLA-B de paciente de primera recaída. Su examen citogenético reveló la presencia de células aneuploides con un cariotipo 45, XX (55). Se ha descrito como una línea celular resistente a dexametasona debido a la baja expresión de tres proteínas relacionadas a la resistencia a los fármacos y la regulación de la apoptosis (VDAC1), el tráfico de proteínas (SNX3) y el plegamiento de proteínas (PFDN6) después del tratamiento con DEX. Este fenómeno se puede reflejar en algunas muestras de médula ósea de pacientes pediátricos con diagnóstico de LLA (56). Por lo que este hecho podría estar ocurriendo con nuestros experimentos en los pacientes que mostraron resistencia a esteroides. Por otro lado, la quimiorresistencia relacionada a la evasión de la muerte celular programada, esta descrita por la sobreexpresión de proteínas mitocondriales y al microambiente leucémico. En la línea celular REH resistente a Ara-C se ha reportado una sobreexpresión de CISD1 (mitoNEET), una proteína de la membrana externa mitocondrial que juega un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis mitocondrial asociada con una capacidad migratoria alterada hacia las células estromales de médula ósea y osteoblastos humanos primarios (57). Posiblemente la evasión a la quimioterapia ocurre a través de mecanismos migratorios hacia nichos protectores, lo que sucede en nuestro modelo tridimensional.

La línea celular RS4;11 se describió como la primera línea de LLA en presentar una translocación cromosómica. Presenta un cariotipo: 46, XX i (7q) t (4;11 (q21, q23)). La translocación de la mayor parte del brazo largo del n. 4 al brazo largo distal de uno n. 11. Estas mismas anomalías se encontraron en la médula ósea del paciente, que se obtuvo en el momento de la recaída (48). La t (4;11) produce la proteína

quimérica KMT2A - AFF1 que se cree que da pauta a la iniciación de la leucemia por reordenamientos de KMT2A a través de una expresión y regulación inadecuadas de los genes Hox ya que funciona como un activador transcripcional y regulador de estos genes durante la embriogénesis y la hematopoyesis. AFF1 es una proteína nuclear que actúa como regulador transcripcional involucrado en el desarrollo hematopoyético de precursores linfoides. Las fusiones KMT2A-AFF1 son capaces de iniciar y mantener un programa de transcripción erróneo con consecuencias oncogénicas (58). El uso de nuevos fármacos como Ribavirina como blanco a KMT2A-AFF1 conduce a una disminución en el crecimiento celular regulado por EIF4E oncogénico y a proteínas de supervivencia. Las células RS4;11 y en células de LLA de pacientes pediátricos tratadas con ribavirina exhiben una alteración de la exportación y/o traducción nuclear a citoplasmática dependiente de EIF4E de los ARNm correspondientes, esto conduce a una detención del ciclo celular en fase S en las células RS4;11 correspondiente a una proliferación disminuida (59). Por lo que su proliferación con quimioterapia convencional en la línea celular no está siendo contrarrestada en posible concordancia las muestras de los pacientes quimiorresistentes.

Se ha estudiado el papel de los microARN en la quimioterapia. Uno de ellos es el miR-652-3p (un miARN circulante) que es regulado a la baja en pacientes al diagnóstico en comparación con controles sanos. Los niveles de miR652-3p se estabilizan en la remisión completa, pero se regulan a la baja nuevamente en la recaída. Además, se ha encontrado que las líneas celulares de leucemia linfoblástica REH y RS4;11 tienen niveles más bajos de miR-625-3p que las células B normales y su sobreexpresión aumenta la sensibilidad a vincristina y citarabina. En conclusión, un nivel bajo de miR-652-3p podría estar involucrado en la resistencia de la LLA pediátrica (60), por lo que la sobreexpresión de miR-652-3p u otros miRNAs podría suprimir el desarrollo de las células de leucemia linfoblástica aumentando la sensibilidad a los fármacos quimioterapéuticos y promoviendo los programas apoptóticos. Por otra parte, miRNAs como MIR17HG y genes miembros de la familia Bcl-2 tienen regulación a la baja por estímulo de dexametasona, que

induce apoptosis en las líneas celulares de LLA (61,62). Por lo que estaría ligado a la respuesta temprana y efectiva de dexametasona.

Las células NALM6 surgieron de una de las ocho líneas celulares de leucemia cultivadas a partir de la sangre de un niño de 19 años con leucemia linfoblástica aguda (LLA) en recaída. Tiene cromosomas diploides (46, XU), con un cariotipo en bandas anormal que incluye una delección del brazo largo de un cromosoma 5 y del cromosoma Y. Se ha extendido el uso de varias líneas de LLA cultivadas con bajas dosis de quimioterapéuticos de manera prolongada para la obtención de células quimiorresistentes, por lo que es un indicador de resistencia adquirida que condiciona de manera *ex vivo* al paciente mostrando que puede existir células sobrevivientes y resistentes a los esquemas tradicionales de tratamiento. Los glucocorticoides como dexametasona inducen específicamente la apoptosis en los linfoblastos malignos y, por tanto, son fundamentales en el tratamiento de los tumores linfoides, especialmente la LLA. Sin embargo, su resistencia un problema terapéutico que explica la mayoría de los fracasos del tratamiento y su mecanismo molecular exacto sigue siendo poco conocido. Se sabe que el microambiente hipóxico de la médula ósea promueve la supervivencia de las células de LLA y confiere resistencia a la quimioterapia (63), nuestro modelo tridimensional podría estar brindando esta misma protección tanto en nuestras líneas celulares como en las muestra de pacientes. La frecuente desregulación de la vía de PI3K (una vía de señalización que participa en la regulación de una amplia gama de funciones fisiológicas que incluyen la transcripción, traducción, progresión del ciclo celular y apoptosis) se ha reportado dentro de la adquisición del fenotipo quimiorresistente, especialmente a doxorubicina, ya que el efecto supresor del crecimiento está mediado, al menos parcialmente, por la detención en la fase G1 del ciclo celular (64). Existen diferentes mecanismos de acción que promueven la resistencia a VCR, sin embargo, ninguna de ellas describe algún mecanismo que involucre vías oncogénicas; en NALM6 y REH la resistencia a VCR ha sido muy baja. En cuanto a Ara-C el bajo nivel de expresión de p53, un gen supresor de tumores, la disminución de la expresión y función de hENT-1, la activación de NF-kappaB, la actividad de la telomerasa y la expresión de Fas, hacen menos susceptible a la

quimioterapia a NALM6, y otras líneas celulares de LLA de B y de T, como Jurkat (65–68). Interesantemente, nuestros ensayos farmacológicos con VCR presentaron una mayor sensibilidad en líneas celulares y en las células derivadas pacientes.

Tomando en cuenta las observaciones clínicas de la respuesta terapéutica en los pacientes que fueron incluidos en este estudio piloto encontramos gran correlación en la mayoría de ellos. Lamentablemente en algunos pacientes no se tuvo seguimiento clínico y de manera interesante, aquel que aparentemente mostro ser sensible a la mayoría del esquema terapéutico recayó 8 meses de haber sido diagnosticado. Un análisis a profundidad en las células residuales en nuestras plataformas posiblemente pueda cooperar en el pronóstico de los pacientes con potencial riesgo de recaída por lo que futuros experimentos de RNA-seq a nivel de célula única serán sustanciales para definir los perfiles de las clonas de recaída.

Con el avance de las investigaciones del microambiente hematopoyético y su papel en la normalidad se han podido identificar algunas características del nicho leucémico (28,69). Durante la LLA, las células leucémicas remodelan el nicho mesenquimal linfoide creando un microambiente inflamatorio donde la baja expresión de CXCL12 es un común denominador. Sin embargo, los nichos remanentes CXCL12⁺ parecen ser determinantes en el reclutamiento y mantenimiento de las CIL (70). A través de modelos experimentales de cultivo se ha demostrado el mantenimiento de blastos leucémicos primarios al contacto con poblaciones de MSC retrasando su programa de apoptosis (71). Mas interesante, cuando se adicionan agentes quimioterapéuticos su viabilidad parece estar menos comprometida debido a la protección que brinda el nicho estromal (72). Uno de los mecanismos es la entrada directa a la fase G0 del ciclo celular (quiescencia) tras el contacto con las CTM, sin embargo, esta inducción *in vitro* bajo este sistema de cultivo es de corta duración ya que los blastos pueden proliferar abundantemente (72). Otros estudios en leucemia mieloide aguda han demostrado que las CTM promueven la expresión de bombas ABC a través del contacto directo vía integrinas donde el uso de fármacos como verapamil (un bloqueador los transportadores ABC) resulta bastante atractivo (73).

Nuestro modelo de organoide permite la permanencia de poblaciones blásticas quiescentes al interior de los nichos proporcionando una herramienta para investigar nuevos blancos terapéuticos dirigidos para promover el abandono de los nichos o bien, para eliminar a las CIL *in situ*. Datos de nuestro laboratorio indican que CXCL10 y CXCL11 son producidos de manera abundante por el nicho leucémico, y otros trabajos han demostrado que CXCL10 disminuye la apoptosis inducida por quimioterapia (74), sugiriendo algunos posibles mecanismos a investigar.

La leucemia es una enfermedad compleja que requiere aproximaciones complejas para su comprensión, el estudio del microambiente hematopoyético ha sido limitado por la falta de modelos que permitan imitar las propiedades de los nichos humanos *in vitro* por lo que nuestra herramienta será de utilidad para el descubrimiento de nuevos ejes regulatorios. El futuro de la oncología se está moviendo rápidamente hacia la implementación de organoides en un chip que permitan conjuntar a la mayor parte de los componentes del microambiente tumoral en pequeños dispositivos para su uso preclínico, primordialmente para probar los regímenes terapéuticos farmacológicos y la nueva inmunoterapia en el contexto del nicho (75).

11. CONCLUSIONES

A partir de organoides reconstruidos con células estromales de medula ósea y células leucémicas desarrollamos una plataforma de laboratorio que brinda información personalizada sobre la sensibilidad y resistencia a fármacos en pacientes con leucemia linfoblástica aguda, la cual en un futuro podrá formar parte de las herramientas pronósticas que permita contribuir a la optimización personalizada de su tratamiento.

12 BIBLIOGRAFÍA

1. Mayani, H., Flores-Figueroa E, Pelayo R. Hematopoyesis. Lab Hematop y Células Troncales, Unidad Investig Médica en Enfermedades Oncológicas Cent Médico Nac Siglo XXI, IMSS. 2009;2:95–107.
2. Pavón Romero, L. JMMC& GÁM. Inmunología celular, molecular y traslacional. 1 Edición. España: Wolters Kluwer; 2016. 710 p.
3. Balandrán JC, Pelayo R. Ontogenia de los linfocitos B. B Lymph Ontog [Internet]. 2016;63(1):71–9. Available from: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=114780109&lang=es&site=ehost-live>
4. Flores-Figueroa E, Montesinos JJ, Mayani H. Células troncales mesenquimales : historia , biología y aplicación clínica. Rev Invest Clin. 2006;58 (5)(October):498–511.
5. R. VE& P. El sistema hematopoyético a partir de células troncales. In: Pelayo, Rosana; Santa-Olalla, Jesús; Velasco I, editor. Células troncales y Medicina regenerativa. 1 edición. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2011. p. 143–71.
6. Pelayo R, Balandrán JC. Ontogenia de la Inmunidad. Acad Nac Med. 2018;1–29.
7. Maeurer MJ. Interleukin-7 (IL-7) Knockout Mice . Implications for Lymphopoiesis and Organ-Specific Immunity. Intern Rev Immunol. 1998;16(0):309–22.
8. Nagasawa T et al. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF-SDF-1.pdf. Nature. 1996;635–638.
9. Ding L, Morrison SJ. Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. Nature. 2013;495(7440):1–6.
10. Mukherjee S, Guo S, Kobayashi T, Schoonmaker JA, Ebert BL, Al- F, et al. Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukemia. Nature. 2012;464(7290):852–7.

11. Kode A, Manavalan JS, Mosialou I, Bhagat G, Chozha V, Luo N, et al. Leukemogenesis Induced by an Activating β -catenin mutation in Osteoblasts. *Nature*. 2014;506(7487):240–4.
12. Asada N, Takeishi S, Frenette PS. Complexity of bone marrow hematopoietic stem cell niche. Vol. 106, *International Journal of Hematology*. 2017. p. 45–54.
13. Fernández O.G. Hematología. In: *Manual CTO de medicina y cirugía*. 6a Edición. España; 2006.
14. World Health Organization. GLOBOCAN. 2019.
15. Juárez-Avendaño G, Luna-Silva NC, Chargoy-Vivaldo E, Juárez-Martínez LA, Martínez-Rangel MN, Zárate-Ortiz N, et al. Poor Prognosis Biomolecular Factors Are Highly Frequent in Childhood Acute Leukemias From Oaxaca, Mexico. *Technol Cancer Res Treat* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2020 Jul 2];19:153303382092843. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1533033820928436>
16. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*. 1994;367(6464):645–8.
17. le Viseur C, Hotfilder M, Bomken S, Wilson K, R??ttgers S, Schrauder A, et al. In Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia, Blasts at Different Stages of Immunophenotypic Maturation Have Stem Cell Properties. *Cancer Cell*. 2008;14:47–58.
18. Ebinger S, O EZ, Ziegenhain C, Enard W, Gires O. Resistant Cells in Acute Lymphoblastic Leukemia Characterization of Rare , Dormant , and Therapy-Resistant Cells in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell*. 2016;1–14.
19. Chávez G.MA., Chimal M.J., Flores F.E. LM. Células Troncales: Biología y sus aplicaciones en Biomedicina. 1 Edición. Chávez-Gonzalez, M. A., Chimal-Monroy, J., Flores-Figueroa, E. & Lamas-Gregori M, editor. Células Troncales: Biología y sus aplicaciones en Biomedicina. México: Purrúa; 2017. 634 p.
20. J.C. Balandrán. Bone marrow mesenchymal stromal niche functions in the

biology of leukemia initiating cells of childhood acute lymphoblastic leukemia. CINVESTAV; 2018.

21. Ruiz-Argüelles G.J. S-MJF. Actualización en leucemias. 1 Edición. México: Medica Panamericana; 1996. 169 p.
22. Entrena A, Varas A, Vázquez M, Melen GJ, Fernández-sevilla LM, García-castro J, et al. Mesenchymal stem cells derived from low risk acute lymphoblastic leukemia patients promote NK cell antitumor activity. *Cancer Lett.* 2015;
23. Duarte D, Hawkins ED, Lo Celso C. The interplay of leukemia cells and the bone marrow microenvironment. *Blood.* 2018.
24. Duan C-W, Shi J, Chen J, Wang B, Yu Y-H, Qin X, et al. Leukemia propagating cells rebuild an evolving niche in response to therapy. *Cancer Cell [Internet].* 2014 Jun 16 [cited 2016 May 3];25(6):778–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24937459>
25. Jensen P, Mortensen BT, Hodgkiss RJ, Iversen PO. Increased cellular hypoxia and reduced proliferation of both normal and leukaemic cells during progression of acute myeloid leukaemia in rats. *Cell Prolif.* 2000;381–95.
26. Balandrán, JC; Joshi SS, Pelayo R. Pro-inflammatory-related loss of cXcl12 niche Promotes acute lymphoblastic leukemic Progression at the expense of normal lymphopoiesis. *Front Immunol.* 2017;7(January):1–14.
27. Balandrán JC, Vadillo E, Dozal D, Reyes-I A, Sandoval-cabrera A, Laffont-ortiz MD, et al. Analysis of Normal Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Contents in Childhood Acute Leukemia Bone Marrow. *Arch Med Res.* 2016;47.
28. Colmone A, Amorim M, Pontier A, Wang S, Jablonski E, Sipkins DA. Leukemic cells create bone marrow niches that disrupt the behavior of normal hematopoietic progenitor cells. *Science (80-) [Internet].* 2008 [cited 2014 May 20];322(December):1861–5. Available from: <http://www.sciencemag.org/content/322/5909/1861.short>
29. Lim M, Pang Y, Hao S, Shi H, Zheng Y, Hua C, et al. Altered Mesenchymal Niche Cells Impede Generation of Normal Hematopoietic Progenitor Cells in

- Leukemic Bone Marrow. *Leukemia*. 2015;(March).
30. Zambetti NA, Ping Z, Chen S, Loosdrecht AA Van De, Vogl T, Raaijmakers MHGP, et al. Mesenchymal Inflammation Drives Genotoxic Stress in Hematopoietic Stem Cells and Predicts Disease Article Mesenchymal Inflammation Drives Genotoxic Stress in Hematopoietic Stem Cells and Predicts Disease Evolution in Human Pre-leukemia. *Stem Cell*. 2016;1–15.
 31. Mayani H. Sangre Blanca. Doscientos años de estudio y tratamiento de la leucemia. Paralelo, editor. México: Paralelo; 2016.
 32. Galmarini, C M, Mackey, John R J, Dumontet C. Nucleoside analogues and nucleobases in cancer treatment. *Lancet Oncol*. 2002;3(July):415–24.
 33. Galmarini, M, C. et al. Expression of high Km 5'-nucleotidase in leukemic blasts is an independent prognostic factor in adults with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2001;98(6):1922–6.
 34. Pfizer. Daunorrubicina. Folleto de información al profesional. 2009;2011:1–24.
 35. Castro-Nuñez, I. et al. Medicamentos citostáticos. *Psikologi Perkembangan*. 2019. 1–224 p.
 36. Inaba, H., & Ching-Hon P. Glucocorticoid use in acute lymphoblastic leukemia: comparison of prednisone and dexamethasone. *Lancet Oncol*. 2012;11(11):1096–106.
 37. Ramos-Peñafiel, C. et al. Respuesta favorable a esteroides en pacientes con leucemia aguda linfoblástica : Frecuencia e impacto pronóstico mia : Frequency and prognostic significance. *Rev Med Hosp Gen Mex*. 2010;73(4):231–6.
 38. Wang, Z. et al. Microarray Analysis Uncovers the Induction of the Proapoptotic BH3-only Protein Bim in Multiple Models of. *J Biol Chem*. 2003;278(26):23861–7.
 39. Brown, J. & Ferrando A. Glucocorticoid Resistance in Acute Lymphoblastic Leukemia : BIM Finally. *Cancer Cell*. 2018;34(6):869–71.
 40. Gorlick, R. et al. Intrinsic and acquired resistance to methotrexate in acute leukemia. *Mol Pharmacol*. 1996;1041–8.

41. Gidding, C, E, M. et al. Vincristine revisited. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1999;29:267–87.
42. Verrills NM, Liem NL, Liaw TYE, Hood BD, Lock RB, Kavallaris M. Proteomic analysis reveals a novel role for the actin cytoskeleton in vincristine resistant childhood leukemia - An in vivo study. *Proteomics*. 2006;6(5):1681–94.
43. Husseini GA, Kanan S, Al-Sayah M. Investigating the fluorescence quenching of doxorubicin in folic acid solutions and its relation to ligand-targeted nanocarriers. *J Nanosci Nanotechnol*. 2016;16(2):1410–4.
44. Rivankar S. An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. *J Cancer Res Ther*. 2014;10(4).
45. Kubeček O, Bláha M, Diaz-Garcia D, Filip S. Extracorporeal elimination of circulating pegylated liposomal doxorubicin (pld) to enhance the benefit of cytostatic therapy in platinum-resistant ovarian cancer patients. *Acta Medica Cordoba*. 2015;58(1):3–8.
46. Gao J, Yan XL, Li R, Liu Y, He W, Sun S, et al. Characterization of OP9 as authentic mesenchymal stem cell line. *J Genet Genomics*. 2010;37(7):475–82.
47. Hurwitz R, Hozier J, Lebien T, Gajl-peczalska K, Kersey J. Characterization of a leukemic cell line of the pre-b phenotype. 1979;180:174–80.
48. Parkin L. Human Acute Leukemia Cell Line With the t(4;11) Chromosomal Rearrangement Exhibits B Lineage and Monocytic Characteristics. 1985;65(1):21–31.
49. Xie M, Yang A, Ma J, Wu M, Xu H, Wu K, et al. Akt2 mediates glucocorticoid resistance in lymphoid malignancies through FoxO3a / Bim axis and serves as a direct target for resistance reversal. *Cell Death Dis*. 2018;
50. Planey SL, Abrams MT, Robertson NM, Litwack G. Role of Apical Caspases and Glucocorticoid-regulated Genes in Glucocorticoid- induced Apoptosis of Pre-B Leukemic Cells 1. 2003;172–8.
51. Kanakkanthara A, Teesdale-spittle PH, Miller JH. Cytoskeletal Alterations that Confer Resistance to Anti-tubulin Chemotherapeutics. *Anticancer Agents Med Chem*. 2013;147–58.

52. Verrills NM et al. Alterations in γ -Actin and Tubulin-Targeted Drug Resistance in Childhood Leukemia. *J Natl Cancer Inst.* 2006;98(19).
53. Lamba KJ. Genetic factors influencing cytarabine therapy Jatinder. *Pharmacogenomics.* 2010;10(10):1657–74.
54. Xia, C, Q. & Smith PG. Drug efflux transporters and multidrug resistance in acute leukemia : Authors : *Mol Pharmacol Fast Forw.* 2012;
55. Rosenfeld C, Goutner A, Venuat AM, Choquet C, Pico JL, Dore JF, et al. An effective human leukaemic cell line: Reh. *Eur J Cancer.* 1977;13(4–5):377–9.
56. Dehghan-nayeri N, Rezaei-tavirani M, Omrani MD. Identification of potential predictive markers of dexamethasone resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cell Commun.* 2017;11:137–145.
57. Geldenhuys WJ, Nair RR, Piktel D, Martin KH, Gibson LF. The MitoNEET Ligand NL-1 Mediates Antileukemic Activity in Drug-Resistant B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia s. *J Pharmacol Exp Ther.* 2019;(July):25–34.
58. Ragusa D, Britten O, Moralli D, Green CM, Tosi S. The RS4 ; 11 cell line as a model for leukaemia with t (4 ; 11)(q21 ; q23): Revised characterisation of cytogenetic features. *Cancer Rep.* 2019;(April):1–11.
59. Porazzi P, Vincent TL, Teachey DT, Tasian SK, Moore JS, Seif AE, et al. HHS Public Access. *Oncogene.* 2019;38(13):2241–62.
60. Jiang Q, Lu X, Huang P, Gao C, Zhao X, Xing T, et al. Expression of miR-652-3p and Effect on Apoptosis and Drug Sensitivity in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Biomed Res Int.* 2018;2018.
61. Harada M, Tamm KP-, Stefan S, Heyman M, Grander D, Corcoran M. Involvement of miR17 pathway in glucocorticoid-induced cell death in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2012;53(November 2011):2041–50.
62. Laane E, Panaretakis T, Pokrovskaja K, Buentke E, Corcoran M, Söderhäll S, et al. leukemia involves differential regulation of Bcl-2 family members Fe ta St ti Fo u Fe ta ti Fo u. *Hematol J.* 2007;
63. Gu L, Zhang G, Zhang Y. A novel method to establish glucocorticoid resistant acute lymphoblastic leukemia cell lines. *J Exp Clin Cancer Res.*

- 2019;2:1–12.
64. Safaroghli-azar A, Bashash D, Sadreazami P, Momeny M, Ghaffari SH. PI3K- δ inhibition using CAL-101 exerts apoptotic effects and increases doxorubicin-induced cell death in pre-B-acute lymphoblastic leukemia cells. *Anticancer Drugs*. 2017;436–45.
 65. Zeineddini NS, Safaroghli-azar A, Salari S, Bashash D. C-Myc inhibition sensitizes pre-B ALL cells to the anti-tumor effect of vincristine by altering apoptosis and autophagy: Proposing a probable mechanism of action for 10058-F4. *Eur J Pharmacol*. 2019;172821.
 66. Kanno S, Higurashi A, Watanabe Y, Shouji A, Asou K, Ishikawa M. Susceptibility to cytosine arabinoside (Ara-C) -induced cytotoxicity in human leukemia cell lines. *Toxicol Lett*. 2004;152:149–58.
 67. Kanno S, Hiura T, Ohtake T, Koiwai K, Suzuki H, Ujibe M, et al. Characterization of resistance to cytosine arabinoside (Ara-C) in NALM-6 human B leukemia cells. *Clin Chim Acta*. 2007;377:144–9.
 68. Anno SK, Iura TH, Houji AS, Sanai YO, Jibe MU, Shikawa MI. Resistance to Ara-C Up-Regulates the Activation of NF- κ B , Telomerase Activity and Fas Expression in NALM-6 Cells. *Biol Pharm Bull*. 2007;30(November):2069–74.
 69. Balandrán JC, Purizaca J, Enciso J, Dozal D, Sandoval A, Jiménez-Hernández E, et al. Pro-inflammatory-related loss of CXCL12 niche promotes acute lymphoblastic leukemic progression at the expense of normal lymphopoiesis. *Front Immunol [Internet]*. 2017 Jan 5 [cited 2017 Mar 6];7(JAN):666. Available from:
<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2016.00666/full>
 70. Agarwal P, Isringhausen S, Li H, Paterson AJ, He J, Gomariz Á, et al. Mesenchymal Niche-Specific Expression of Cxcl12 Controls Quiescence of Treatment-Resistant Leukemia Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 2019;
 71. Manabe A, Coustan-Smith E, Behm FG, Raimondi SC, Campana D. Bone marrow-derived stromal cells prevent apoptotic cell death in B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood [Internet]*. 1992 May 1 [cited 2016 Apr 27];79(9):2370–7. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1373973>

72. Pal D, Blair HJ, Elder A, Dormon K, Rennie KJ, Coleman DJLL, et al. Long-term in vitro maintenance of clonal abundance and leukaemia-initiating potential in acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia* [Internet]. 2016 Apr 25 [cited 2016 Apr 27];30(8):1691–700. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27109511>
73. Boutin L, Arnautou P, Trignol A, Ségot A, Farge T, Desterke C, et al. Mesenchymal stromal cells confer chemoresistance to myeloid leukemia blasts through Side Population functionality and ABC transporter activation. *Haematologica*. 2020;
74. Gómez AM, Martínez C, González M, Luque A, Melen GJ, Martínez J, et al. Chemokines and relapses in childhood acute lymphoblastic leukemia: A role in migration and in resistance to antileukemic drugs. *Blood Cells, Mol Dis*. 2015;
75. Ma C, Witkowski MT, Harris J, Dolgalev I, Sreeram S, Qian W, et al. Leukemia-on-a-chip: Dissecting the chemoresistance mechanisms in B cell acute lymphoblastic leukemia bone marrow niche. *Sci Adv*. 2020;

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
2D	<i>Dos dimensiones</i>
3D	<i>Tridimensional</i>
AMO	<i>Aspirado de Médula Ósea</i>
ara-C	<i>Citarabina</i>
CEM	<i>Células estromales mesenquimales</i>
CIL	<i>Células iniciadoras de la leucemia</i>
CMN	<i>Células mononucleares</i>
CTH	<i>Células troncales hematopoyéticas</i>
CTM	<i>Células troncales mesenquimales</i>
DEX	<i>Dexametasona</i>
DNR	<i>Daunorrubicina</i>
DOX	<i>Doxorrubicina</i>
EMR	<i>Enfermedad Mínima/Medible Residual</i>
LLA	<i>Leucemia Linfoblástica Aguda</i>
LE	<i>Libre de Estroma</i>
LMA	<i>Leucemia Mieloide Aguda</i>
MO	<i>Médula ósea</i>
MTX	<i>Metrotexato</i>
PEM	<i>Progenitor Eritroide/Megacariocito</i>
PLC	<i>Progenitor Linfoide Común</i>
PGM	<i>Progenitor Granulocito/Monocito</i>
PMC	<i>Progenitor Mieloide Común</i>
PMD	<i>Progenitor Monocito Dendrítico</i>
PMP	<i>Progenitor Multipotente</i>
SCF	<i>Stem Cell Factor</i>
SNC	<i>Sistema Nervioso Central</i>
VCR	<i>Vincristina</i>