Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Medicina

Licenciatura en Biomedicina

Instituto de Fisiología

Laboratorio de Oncoinmunología

CIBIOR, IMSS

“Papel Inmunomodulador de las Células Estromales Mesenquimales en la Leucemia Linfoblástica Aguda”

Tesis para obtener el grado de:

Licenciada en Biomedicina

Presenta:

Gabriela Rocío Zamora Herrera

Director: **D.C. Rosana Pelayo Camacho**

Co-Director: **D.C. Juan Carlos Balandrán**

Asesores

D.C. Elena Hernández Caballero

D.C. Fabián Galindo Ramírez

Puebla, Noviembre de 2020

Agradecimientos

“Debemos encontrar tiempo para detenernos y agradecer a las personas que hacen la diferencia en nuestras vidas” -John F. Kennedy

La vida es una aventura, con maravillas por descubrir y sendas por tomar; me siento muy afortunada de haber elegido el camino de la ciencia.

Me gustaría agradecer a mi alma mater, la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, a la facultad de medicina, al instituto de fisiología y sobre todo a mis maestros de los que aprendí tanto a lo largo de estos cinco años; con una mención especial a la Dra. Elena Hernández C., el Dr. Fabián Galindo, quienes se tomaron el tiempo para revisar mi tesis y brindarme sus valiosos comentarios; y la Dra. Amira Flores quien me brindó su acompañamiento en todo el proceso.

Las pequeñas coincidencias, muchas veces generan grandes cambios y no puedo estar más agradecida de que estas hayan impactado de una manera increíble en mi vida y el camino que elegí recorrer. El laboratorio de Oncoinmunología ha marcado un antes y un después en mi formación científica y sobre todo en mi persona; no solamente encontré un increíble equipo de trabajo, sino también una nueva familia, mi nicho. Doctora Ros, le agradezco de todo corazón por haber respondido ese correo, que mandé con mucha ilusión y que me ha regresado con creces todo lo que hubiera imaginado, por ser un gran ejemplo a seguir, por no solamente tener una mente brillante, sino también un corazón gigante. Juan Carlos, lo que he aprendido de ti es demasiado, no solamente has sido un gran maestro, también eres un gran amigo, muchas gracias por tu apoyo y por mostrarme lo que se puede lograr con disciplina y pasión por la ciencia. A mis amigos y miembros del laboratorio: Dal, siempre dispuesta a enseñar y otro gran ejemplo a seguir; Rubí, que siempre me saca una sonrisa y nunca se rinde; Armando, Aurora, Blanquita y Ana Clara. Jio e Iñaki, mis amigos y compañeros de viajes, ha sido increíble compartir esas aventuras con ustedes. Al CIBIOR y al IMSS.

A mi hermosa familia, gracias infinitas por ser mi motor y fuerza, por estar siempre conmigo en las buenas y en las malas. Mamá y papá, gracias por ser un gran ejemplo de fortaleza, unión y amor por la vida; ustedes son mi gran ejemplo a seguir, mis maestros de vida, gracias por darme fuertes cimientos y alas para volar, los amo. Marian, mi mejor amiga, eres mi motivación, gracias por siempre estar ahí cuando tengo un mal día, tu simple presencia me hace sentir mejor. Meli y abuelita, espero que la vida me permita regresarles un poco de todo lo que me han dado, gracias por estar conmigo desde el inicio de esta aventura y apoyarme siempre, nada hubiera sido posible sin su ayuda. Mosis y Valito, que hacen cada día una nueva aventura, gracias por todas las sonrisas y su cariño. A mis abuelitos, por su amor incondicional y fortaleza. A mis tíos, primos y sobrinitos, todos tienen un lugar especial en mi corazón.

Una gran experiencia que me fortaleció y me abrió los ojos de maneras inesperadas, fue la estancia en el laboratorio de la Dra. Mónica Guzmán en el Weill Cornell Medicine College. Doctora muchas gracias por brindarme la oportunidad de pasar un tiempo en su laboratorio y con su maravilloso equipo, especialmente a Jeanne, Antonio y Vicenta. A mi familia de Nueva York, sin ustedes ese viaje no hubiera sido posible, gracias por brindarme su cariño, alegría y hogar; por permitirme vivir esa experiencia de la mejor manera, espero que nos volvamos a reunir pronto.

La amistad ha sido una pieza fundamental en mi vida, gracias a mis amigas de la universidad Yes, Midory y Dianita G. las quiero mucho niñas, soy muy feliz de haberlas conocido y por supuesto a Dianita E., espero que desde donde esté sepa el gran ejemplo que fue para nosotras; gracias a ustedes la universidad fue una gran experiencia, llena de momentos felices que me acompañarán toda la vida. A mis amigas Dani V, Samy, Sinaí, Vale, Lupita, Kari y Dani C., porque a pesar de los años y la distancia tengo el privilegio de contar con su amistad.

Por supuesto no puedo dejar de agradecer a todos los que hicieron posible esta investigación, a los médicos, donadores y sobre todo a los pacientes, muchas gracias.

Y por último pero no por eso menos importante a Dios, que me ha permitido vivir todo esto y lograr concluir esta etapa de mi formación académica.

“Elogia el puente que te llevó a la cima” –George Colman

Índice

1. Resumen 7
2. Introducción 8
3. Antecedentes 9
3.1. Antecedentes generales 9
3.1.1. Hematopoyesis 9
3.1.2. La médula ósea, nichos y microambiente 12
3.1.2.1. Células Estromales Mesenquimales 14
3.1.3. Sistema inmune y vigilancia tumoral 16
3.1.4. Cáncer 19
3.1.4.1. Leucemia 20
3.2. Antecedentes específicos 21
3.2.1. Leucemia Linfoblástica Aguda 21
3.2.1.1. Citometría de flujo y el inmunofenotipo en la leucemia linfoblástica aguda. 23
3.2.2. Microambiente tumoral 26
4. Planteamiento del problema 30
5. Hipótesis científica 30
6. Objetivos 30
6.1. Objetivo General 30
6.2. Objetivos Particulares 30
7. Material y métodos 31
7.1. Diseño del estudio 31
7.2. Ubicación espacio-temporal 31
7.3. Estrategia de trabajo 31

7.4. Muestreo 32
7.4.1. Definición de la unidad de población 32
7.4.2. Selección de la muestra 33
7.4.3. Criterios de selección de las unidades de muestreo 33
7.4.3.1. Criterios de inclusión 33
7.4.3.2. Criterios de exclusión 33
7.4.3.3. Criterios de eliminación 34
7.4.4. Diseño y tipo de muestreo 34
7.4.5. Tamaño de la muestra 34
7.5. Definición de las variables y escalas de medición 34
7.6. Método de recolección de datos 35
7.7. Técnicas y procedimientos 35
7.8. Análisis de datos 42
7.9. Diseño estadístico 42
7.9.1. Hipótesis estadística 42
7.9.2. Pruebas estadísticas 42
8. Resultados 43
9. Discusión 55
10. Conclusiones 63
11. Bibliografía 65
12. Anexos 74
12.1. Definiciones operacionales 74
12.2. Definiciones conceptuales 74
12.3. Descripción de las técnicas de medición de las variables relevantes 74
12.4. Formatos de captura de datos 75

12.5. Formatos de consentimiento informado 75

12.6. Tabla de clasificación de las MSC provenientes de pacientes..... 79

1. Resumen

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es el tipo de cáncer caracterizado por la proliferación descontrolada de células linfoides inmaduras (linfoblastos), que invaden la médula ósea bloqueando la hematopoyesis normal. Las células cancerígenas de la LLA emergen y progresan dentro de nichos específicos, los mismos que necesitan las células troncales hematopoyéticas para llevar a cabo la hematopoyesis. Estos nichos trasformados por las células tumorales conforman el microambiente tumoral.

Las células estromales mesenquimales (MSCs) son pieza clave en la organización y funciones del microambiente hematopoyético normal y del tumoral leucémico, tanto en el mantenimiento de las células tumorales, como en la regulación de las células de la respuesta inmune innata y adaptativa. El sistema inmune, además de protegernos contra patógenos y agresores externos, juega un importante papel antitumoral (inmunovigilancia). Sin embargo, los tumores desarrollan mecanismos que permiten su escape a la respuesta inmune, como es la edición de los nichos, entre otros. Por su relevancia en estos mecanismos pato-biológicos, las MSCs se han vuelto de gran interés como posibles blancos terapéuticos.

El presente estudio se llevó a cabo con la finalidad de evaluar el papel inmunomodulador de las células estromales mesenquimales en la médula ósea durante la leucemia linfoblástica aguda sobre células de la respuesta inmune.

A través del establecimiento de un modelo in vitro de microambiente mesenquimal leucémico, se estudió el efecto en la proliferación e inmunofenotipo de las poblaciones celulares de la respuesta inmune, así como la evaluación de marcadores de activación y moléculas de punto de control inmunológico en las MSCs de pacientes con leucemia linfoblástica aguda, y su correlación con el inmunofenotipo de inducción celular.

Entre los resultados obtenidos se encuentra la generación de perfiles de intercomunicación entre las MSC y las células inmunológicas cultivadas en este modelo. A largo plazo se espera que dichos perfiles contribuyan a determinar el curso de la enfermedad.

2. Introducción

La hematopoyesis es el proceso a través del cual se lleva a cabo la generación de las células del sistema inmune y circulatorio. Este proceso complejo y altamente regulado, se lleva a cabo en la médula ósea que consta de un alto número de componentes celulares, factores solubles, moléculas de intercomunicación, así como de nichos hematopoyéticos, al menos tres de los cuales mantienen el proceso de diferenciación. Las células troncales hematopoyéticas, que dan origen a todos los linajes hematopoyéticos se encuentran en estos nichos, asociadas fuertemente a otros tipos celulares que regulan su fisiología y las protegen de señales inductoras de maduración o proliferación. Al conjunto de nichos hematopoyéticos se le denomina microambiente y consta de una estructura tridimensional altamente organizada. La interacción de las células troncales/progenitoras hematopoyéticas con su microambiente es central para la regulación de la hematopoyesis.

Las células estromales mesenquimales (MSC) son pieza fundamental de estos nichos, tanto en la normalidad como en la patogenia, además de que actúan en la inmunidad innata y adaptativa suprimiendo las células de la respuesta inmune. Las células de la inflamación y sus productos son importantes reguladores del microambiente tumoral.

Trabajos previos del laboratorio de Oncoinmunología soportan la noción de que las células malignas contribuyen directamente en la patogénesis de la LLA al crear un microambiente inflamatorio, que provoca el agotamiento de las células troncales y progenitoras en la médula ósea leucémica. Se ha observado que las funciones inmunomoduladoras de las MSCs son modificadas en un proceso tumoral, por lo que determinar estos cambios en su fenotipo y los efectos que tiene en la respuesta inmune es de importancia para la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos.

3. Antecedentes

3.1. Antecedentes generales

3.1.1. Hematopoyesis

Las células forman a todos los seres vivos, pero su morfología y función dependen del tejido al que pertenecen. El sistema inmunológico y el sanguíneo comparten las células que los conforman: las células sanguíneas. El proceso a través del cual se generan las células de la sangre se denomina hematopoyesis (1).

Tanto el sistema sanguíneo como el inmunológico inician su desarrollo durante la embriogénesis temprana fuera del embrión, en el saco vitelino. A las 3 o 4 semanas después de la concepción se generan los progenitores intra-embrionarios en la aorta-gónada-mesonefros. Los progenitores de ambos tejidos migran y colonizan el feto en sitios como el hígado (principal órgano hematopoyético hasta la mitad del segundo trimestre). La médula ósea (MO) es colonizada a las 11 semanas, y se convierte en el principal sitio para la hematopoyesis después de la semana 20 (2). Se estima que un adulto humano genera aproximadamente de 4-5 x 10^{11} células hematopoyéticas por día (3).

De acuerdo al grado de madurez de las células que lo conforman y a los distintos linajes que se generan, el sistema hematopoyético se puede estratificar en cuatro compartimientos con estructura jerárquica:

a) Células troncales hematopoyéticas (HSC, del inglés *Hematopoietic Stem Cells)*. Son las más primitivas y se caracterizan por la autorrenovación y la multipotencialidad. La primera característica se refiere a la capacidad de división de las células para perpetuarse a sí mismas y cuya progenie mantiene su potencialidad y estado inicial indiferenciado; mientras que la segunda hace referencia al potencial de diferenciación a distintos tipos celulares (2). Las HSC representan el 0.01% del total de células nucleadas en la médula ósea (MO). Expresan marcadores de superficie como CD34, CD90, CD117 y CD133; carecen de marcadores de linaje maduro (Lin^-) (1).

b) Células progenitoras hematopoyéticas. Conforman <0.5% del total de células dentro de la MO. Provienen de las HSC y al igual que éstas expresan CD34, pero los demás marcadores dependerán del linaje al que están comprometidas.
c) Células precursoras reconocibles por su morfología (identificadas en frotis de MO). Forman más del 90% de las células dentro de la MO. Cuando maduran dan paso al cuarto compartimiento.
d) Células sanguíneas maduras que pueden encontrarse en circulación.

Las células progenitoras hematopoyéticas, como ya se mencionó con anterioridad, se comprometen hacía linajes específicos. A partir de ello, todas las células sanguíneas se generan por dos procesos intrínsecos de la hematopoyesis al interior de la médula ósea: la mielopoyesis y la linfopoyesis. A los grupos de células provenientes de estos se denominarán mieloide y linfoide (respectivamente).

La mielopoyesis surge a partir de los progenitores mieloides comunes (CMP), que tienen una alta capacidad proliferativa y utilizan un determinado número de citocinas. Los CMP a su vez se pueden diferenciar a progenitores granulo-monocíticos (GMP) y progenitores eritroides-megacariocíticos (MEP). La maduración consecuente a estos precursores se llevará a cabo gracias a la pérdida definitiva de la autorrenovación y la adquisición de funciones especializadas que culminarán en una identidad celular específica. Entre las células maduras resultantes de la mielopoyesis encontramos a los eritrocitos, plaquetas, granulocitos (eosinófilos, neutrófilos, basófilos), monocitos (que darán paso a los macrófagos) y algunas células dendríticas (**Figura 1**).

Por otro lado, la linfopoyesis dará origen a todo el linaje linfoide. En la MO y el cordón umbilical del ser humano residen los progenitores multipotentes que expresan la molécula CD34. La aparición de CD10 y la enzima desoxinucleotidil-transferasa terminal (TdT), es uno de los eventos que caracterizan a los progenitores linfoides. Los progenitores linfoides comunes expresan además el receptor de interleucina 7 (IL-7), CD38 y CD45RA, diferenciándose principalmente a linfocitos B. Cuando no expresan CD10 y el receptor de IL-7 suelen generar preferentemente linfocitos T y NK, aunque

los precursores de linfocitos T tienen que emprender un viaje hacia el timo para completar su desarrollo.

La generación de linfocitos B consta de varias etapas de diferenciación río abajo de las CLP, iniciando con las células B tempranas ($CD34^{+}CD19^{-}CD10^{+}$), que continúan a pro-B ($CD34^{+}CD19^{+}CD10^{+}$), pre-BI grandes ($CD34^{+}CD19^{+}CD10^{+}$), pre-BII grandes ($CD34^{-}CD19^{+}CD10^{+}$), pre-BII pequeñas ($CD34^{-}CD19^{+}CD10^{+}$), B inmaduras ($CD34^{-}CD19^{+}CD10^{+}sIgM^{+}$) y finalmente células B maduras ($CD34^{-}CD19^{+}CD10^{-}sIgM^{+}sIgD^{+}$). Al llegar al final de la maduración, los linfocitos B son exportados a los tejidos linfoides periféricos para cumplir su función de reconocimiento de antígeno, activación y producción de anticuerpos específicos (1).

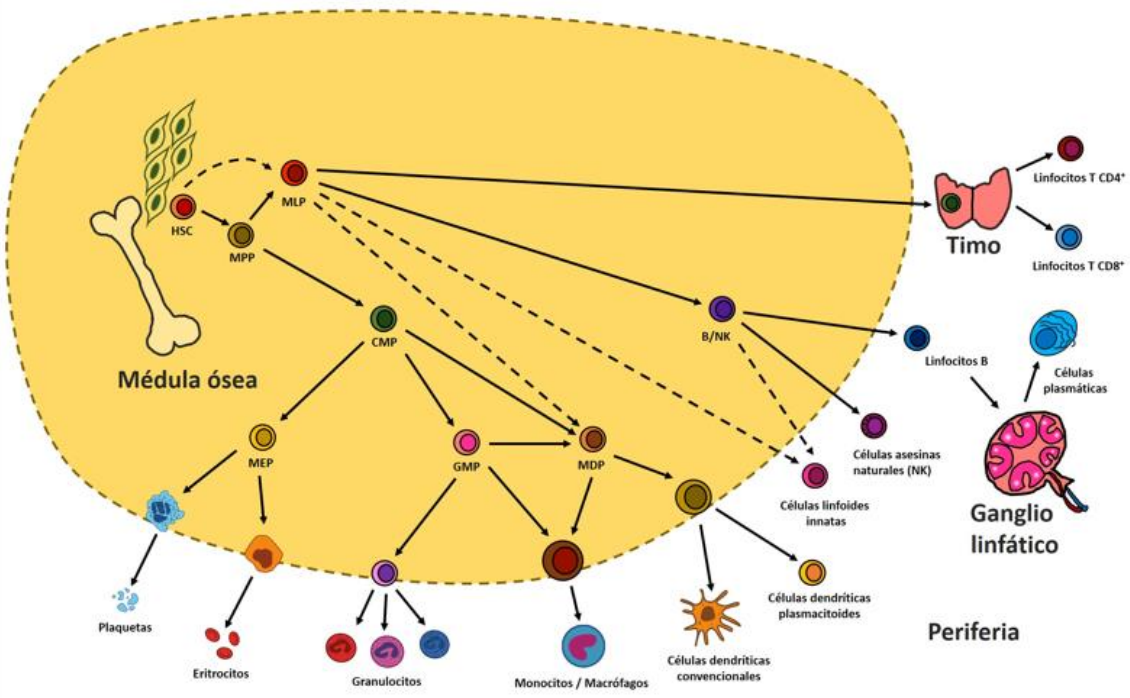

Figura 1. *Representación esquemática del proceso de hematopoyesis.* Todas las células de la sangre y del sistema inmunológico se producen durante la hematopoyesis a través de una población única de células troncales hematopoyéticas (HSC), que dan lugar a los progenitores multipotentes (MPP) y a los progenitores multilinfoides (MLP) que inician la linfopoyesis de células B, NK células linfoides innatas y algunas categorías de células dendríticas. Algunos progenitores linfoides viajan al timo para la producción de células T. El linaje mieloide proviene del progenitor mieloide común (CMP) que a su vez produce progenitores de megacariocitos y eritrocitos (MEP), progenitores de monocitos y granulocitos (GMP) y progenitores dendrítico-monocítico (MDP). Tomado de Pelayo et al., 2018 (3)

Para mantener la homeostasis hematopoyética a lo largo de nuestra vida, debe haber un balance entre la diferenciación y la auto-renovación, ya que un desbalance en este cociente puede dar paso a enfermedades hematológicas hiperproliferativas como la leucemia (4).

3.1.2. La médula ósea, nichos y microambiente

La médula ósea (MO) es el sitio principal (después del nacimiento) de producción de células sanguíneas. Se localiza al interior de los huesos (en la epífisis de los huesos largos y en los huesos planos). Dentro de ella vamos a encontrar tres zonas: la endosteal o trabecular, la vascular y el parénquima. La primer zona se conforma de osteocitos y osteoblastos, la zona vascular corresponde al sitio de los sinusoides y arteriolas (vasos sanguíneos) y la última (parénquima) hace referencia a todos los elementos hematopoyéticos (2).

La hematopoyesis medular se lleva a cabo por la interacción del componente hematopoyético, que incluye a los progenitores, precursores y células maduras; y del componente estromal, involucrando a las células troncales/estromales mesenquimales, así como sus productos de diferenciación, vasculatura, nervios y otras células accesorias (2).

El concepto de nicho fue adoptado al campo de las células troncales por Ray Schofield, postulando que las HSC deben permanecer en la MO en un lugar específico (nicho), asociadas fuertemente a otros tipos celulares, que regulan su fisiología y las protegen de señales inductoras de maduración o proliferación (2).

En los nichos endosteal y vascular se ha observado la presencia de las HSC, distribuyéndose preferentemente en el vascular y especialmente las encontradas asociadas al nicho vascular de las arterias se encuentran en quiescencia (2,5).

En la MO existen dos tipos de células troncales: las HSC y las células troncales mesenquimales (MSC “Mesenchymal Stem/Stromal Cells”). Las HSC y sus progenitores se encuentran rodeados por las células estromales, mientras que las células hematopoyéticas crecen y se expanden en la cavidad del hueso y ahí

permanecen hasta completar su maduración (6), conformando la mayor fracción celular en la MO (5).

El nicho de las HSC se define como un sitio anatómico, dinámico, que las protege de insultos xenotóxicos, inhibiendo programas de proliferación exacerbada y proporcionando las señales necesarias para una correcta diferenciación celular. Constituye una unidad básica y funcional del tejido donde se integran señales que median el balance entre los requerimientos del organismo y las respuestas de las células troncales en procesos de generación de tejidos, homeostasis y reparación (2). En este nicho, la actividad de las HSC es regulada por la participación concertada de factores intrínsecos a la célula, como factores transcripcionales, reguladores epigenéticos y rutas metabólicas; obedeciendo a las señales extrínsecas provenientes de microambiente (4). De igual manera, provee un ambiente inmunosupresor que protege a las propias HSC de un ataque inmunológico, donde también intervienen poblaciones de células T reguladoras (Tregs) y otras poblaciones supresoras (5).

Una característica del nicho de las células troncales y progenitoras hematopoyéticas es su perfil hipóxico (7). Las especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxigen Species*) pueden dañar moléculas biológicas como el DNA, ocasionando mutaciones. Las HSC cuentan con varios mecanismos intrínsecos para evitar este tipo de daños en su código genético, y para reducir el estrés oxidativo es necesaria su permanencia en sitios de bajos niveles de oxígeno. La MO es un tejido relativamente hipóxico debido a su alta densidad celular y por el alto consumo de oxígeno. El receptor c-Kit en las HSC y su ligando, KITL mejor conocido como *stem cell factor* (SCF), constituyen una interacción esencial dentro de la dupla nicho-HSC para mantener bajos los niveles de ROS (5).

Al conjunto de nichos hematopoyéticos también se le denomina microambiente, ya que es el ecosistema específico en el que se desarrollan las células hematopoyéticas, y que consta de una estructura tridimensional, altamente organizada, de células del estroma y sus productos (matriz extracelular, citosinas, quimiocinas, etc), que regulan la localización y fisiología de las células hematopoyéticas (1). Además de los factores

biológicos, se encuentran las interacciones célula-célula, señales bioquímicas y metabólicas (8).

Algunos factores que han demostrado tener un papel en el mantenimiento de las HSC son CXCL12 y SCF. CXCL12 es el ligando del nicho para CXCR4 expresado en las HSC y en su progenie, dirige la migración de las HSC a la médula ósea y promueve su quiescencia, mientras que SCF es requerido para la quiescencia de estas células. La carencia de CXCL12 y SCF es letal, ya que compromete al sistema hematopoyético. De todas las poblaciones estromales, las MSC que expresan el receptor de leptina ($LepR^{+}$) son altamente productoras de CXCL12 y SCF (5). De hecho, esta misma población sobrelapa con aquellas que expresan el filamento intermedio nestina que se han denominado células CAR (del inglés *CXCL12-abundant reticular cell).* Datos recientes sugieren que los nichos perisinusoidales con células mesenquimales $LepR^{+}$/Nestin-GFP^{low} parecen estar involucrados en la regulación de los programas de proliferación de las HSC.

La interacción de las células troncales/progenitoras hematopoyéticas con su microambiente es central para la regulación de la hematopoyesis, tanto en el estado estable como en la enfermedad (8). Las células troncales no pueden sobrevivir ya sea fuera de su microambiente o en la ausencia de factores de crecimiento y/o citocinas específicas (9).

3.1.2.1. Células Estromales Mesenquimales

Como ya se mencionó anteriormente, la regulación de la actividad de las HSC depende de varios tipos de células, entre las que se incluyen las MSC, adipocitos, vasculares y células gliales (4). Las MSC son capaces de inducir la proliferación y la autorenovación de las HSC, esto observado *in vitro* a través de co-cultivos tipo “Dexter”. Gracias a los estudios realizados por los grupos de Paul Frenette y Takashi Nagasawa se demostró la localización de las MSC y su participación dentro del nicho de las HSC en un modelo in vivo (2). A partir de ello, otros grupos de investigación han confirmado la participación de las células del nicho en la supervivencia de las HSC y en la promoción de los linajes linfoides o mieloides en modelos *in vivo* con ratones transgénicos (6).

Las MSC fueron descritas por primera vez como una subpoblación de las células en la MO con potencial osteogénico, con propiedades de adhesión al plástico de las cajas de cultivo, y con capacidad de formar agrupaciones celulares o colonias a partir de una sola célula. Posteriormente se propuso el término de célula troncal estromal y más tarde Caplan la llamó célula troncal mesenquimal. La Sociedad para Terapia Celular Internacional (ISCT) acordó que era más acorde nombrarlas células estromales mesenquimales, dado que no todas ellas son troncales. Además, la ISCT propone tres criterios para su identificación: a) las células deben ser adherentes al plástico en condiciones de cultivo; b) contar con la expresión de los antígenos CD105, CD73 y CD90, y negativas para la expresión de antígenos hematopoyéticos CD45, CD34, etc; c) deben tener capacidad de diferenciarse hacia adipocitos, osteoblastos, y condroblastos (2,10–12).

Este tipo de células puede encontrarse en tejidos fetales, y tejidos adultos como MO, sangre de cordón umbilical, células perivasculares de cordón umbilical, leche materna. Algunos otros tejidos donde se encontraron células que exhibían características de las MSC son, tejido adiposo, líquido amniótico, membrana amniótica, tejido dental, endometrio, sangre menstrual, sangre periférica, glándulas salivales, piel y gelatina de Wharton (10). Pese a la gran cantidad de fuentes dónde se pueden encontrar este tipo de células, la MO y el tejido adiposo se consideran las principales (13).

Las MSC pueden ser atraídas a los tejidos dañados por citocinas inflamatorias y quimiocinas que soportan la regeneración y reparación del tejido. En este proceso las MSC están en contacto con múltiples tipos celulares para llevar a cabo sus efectos terapéuticos, ya sea a través de la liberación de factores solubles o en vesículas extracelulares (EVs) con moléculas bioactivas como cargo, tales como proteínas, lípidos y RNA, que pueden jugar papeles anti-inflamatorios o anti-tumorales; o por la interacción directa célula con célula a través de integrinas y uniones tipo gap (11,14).

Las MSC actúan en la inmunidad innata y adaptativa, suprimiendo los linfocitos T y la maduración de las células dendríticas; reduciendo la activación y proliferación de los linfocitos B; inhibiendo la proliferación y citotoxicidad de las células NK; además de promover la regeneración de linfocitos T reguladores a través de la producción de IL-

10 (10). La supresión de la respuesta de los linfocitos T podría ser a través de la vía purinérgica (11). La supresión directa de las respuestas del sistema inmune es dada por la producción de moléculas inmunomoduladoras como IDO, PGE2, TGFβ, óxido nítrico, e indirectamente por la regeneración y expansión de potentes inmunosupresores tales como linfocitos T $CD4^{+}FOXP3^{+}$ y células reguladoras derivadas mieloides incluyendo células dendríticas, monocitos/macrófagos y granulocitos. Las MSC son originalmente silentes, y se vuelven inmunosupresoras por la activación de citocinas inflamatorias como IFNγ, TNFα e IL1β, y por ligandos de TLR (15).

Las MSC no sólo son importantes en el mantenimiento de la hematopoyesis, sino que están implicadas en procesos patológicos. Los componentes del microambiente en la MO han mostrado ser muy relevantes en el desarrollo y mantenimiento de enfermedades malignas hematológicas como facilitadores para el desarrollo del tumor y uno de los componentes claves de este microambiente son las MSC (16). Se hipotetiza que sus propiedades inmunosupresoras y la habilidad para atraer las células del sistema inmune son importantes acompañantes en la promoción de la progresión tumoral (9). Debido a sus propiedades migratorias, son capaces de instalarse dentro de los tejidos tumorales en respuesta a moléculas inflamatorias incluyendo señales de quimiocinas como CCL5 y CXCL16 (12,15). De igual manera las señales de CXCL12-CXCR4 se han reportado como parte de la migración de células cancerígenas a sitios de metástasis y de esta manera incrementar la supervivencia y/o crecimiento de varios cánceres como el de mama, pulmón, leucemia y linfoma (17).

3.1.3. Sistema inmune y vigilancia tumoral

El sistema inmune tiene su origen en la hematopoyesis, generando los linajes mieloide y linfoide. Todas las células del sistema inmune (exceptuando los linfocitos T) se diferenciarán en la MO y algunas madurarán funcionalmente en la periferia u órganos linfoides secundarios.

El inicio de la diferenciación linfoide se da con la transcripción del locus de la recombinasa RAG1, que es importante en la recombinación de los genes V(D)J, los cuales codifican las regiones variables de las inmunoglobulinas para la formación del

receptor de linfocitos B (BCR) y el receptor de linfocitos T (TCR) importantes para la inmunidad adaptativa. La timopoyesis, o producción de linfocitos T, ocurre en el timo a partir de los progenitores tempranos que migran desde la MO hacia este órgano, una vez instalados en el timo tendrán una diferenciación progresiva vista a través de diferentes poblaciones: Células doble negativas ($CD8^{-}CD4^{-}$), células doble positivas ($CD8^{+}CD4^{+}$) y las que adquieren compromiso a CD8 ($CD8^{+}CD4^{-}$) o CD4 ($CD4^{+}CD8^{-}$). Luego de una extensa ronda de selección positiva y negativa, las células $CD4^{+}$ y $CD8^{+}$ abandonan el timo como linfocitos inmaduros hasta que se encuentran con su antígeno, continuando con sus funciones en el tejido linfático periférico.

La linfopoyesis de los linfocitos B se lleva a cabo en la MO. La expresión de CD19 marca irreversiblemente el compromiso a linaje B, mientras que la diferenciación a NK se da por la expresión de CD56. Las células B vírgenes viajan por la circulación a los ganglios linfáticos y posterior a su encuentro con el antígeno y la señalización correspondiente de su BCR, maduran y forman los centros germinales en favor de la amplificación clonal para la liberación de anticuerpos (3).

El sistema inmunológico no solamente es nuestra defensa contra agentes infecciosos, como bacterias y virus, sino que juega un papel importante en diferentes mecanismos tales como la inmunovigilancia.

En 1909 Paul Ehrlich fue el primero en proponer que el sistema inmune reprimía el crecimiento de los carcinomas. Pero fue hasta la década de los 50´s cuando MacFarlane Burnet y Lewis Thomas propusieron que la respuesta inmune celular debía ser capaz de reconocer objetivos específicos expresados en las células malignas y eliminar los cánceres nacientes antes de su manifestación clínica, a esta hipótesis la nombraron “inmunovigilancia tumoral”. Esta hipótesis fue confirmada a inicios del siglo XXI, cuando por un lado se mostró en ratones inmunodeficientes más carcinogénesis inducida en comparación con ratones inmunocompetentes; y por otro se observó que los ratones que carecían de perforina (una proteína clave para la citotoxicidad celular mediada por células NK) exhibían un fenotipo similar de propensión al desarrollo de tumores (18).

Un par de años más tarde se describió un mecanismo complejo entre el cáncer y el sistema inmune, ya que el sistema inmune también puede promover la emergencia de tumores primarios con inmunogenicidad reducida que son capaces de escapar del reconocimiento inmunológico y su destrucción. Este mecanismo se denominó inmunoedición, el cuál consta de tres fases: eliminación, equilibrio y escape (**Figura 2**).

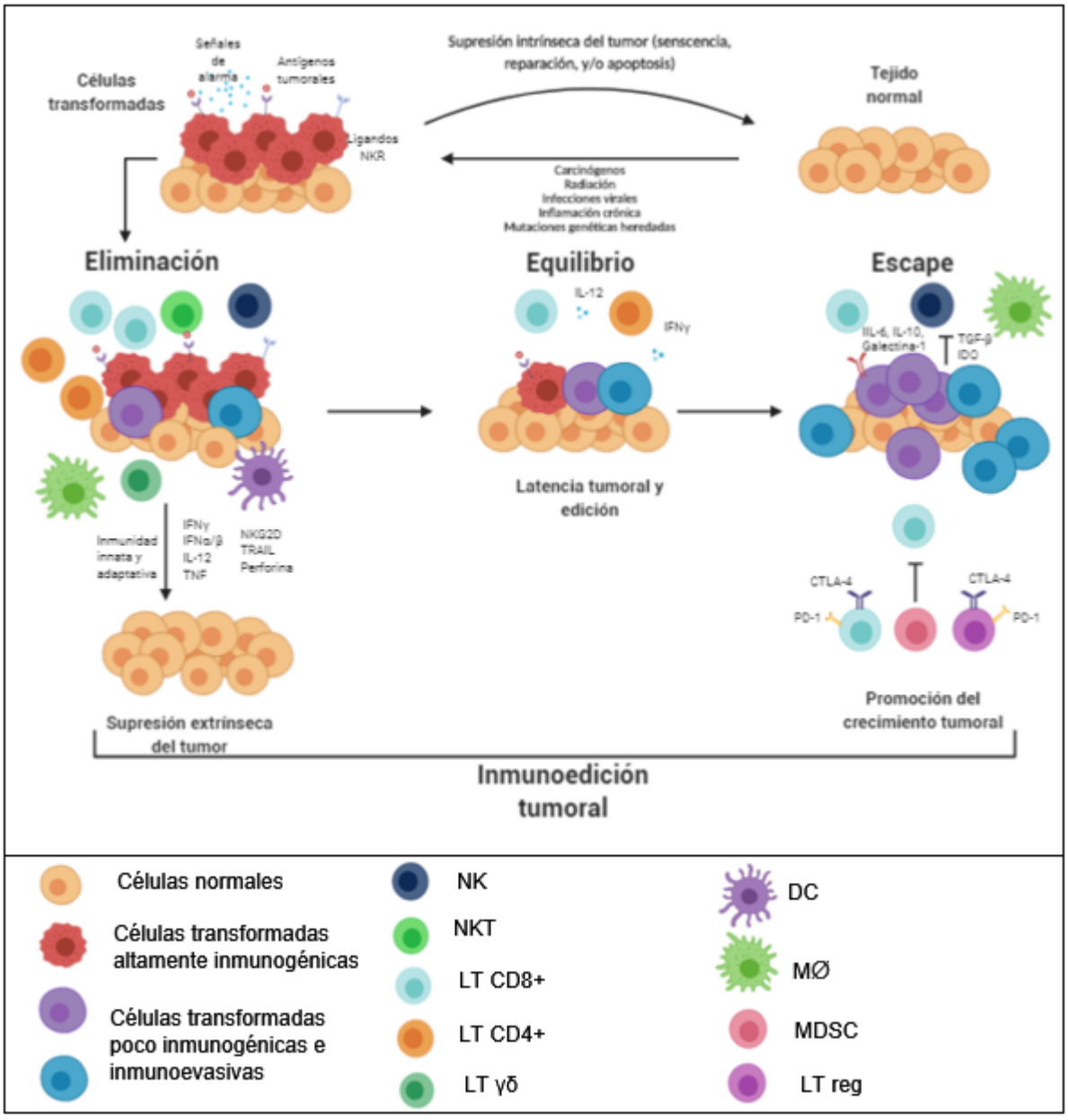

Figura 2. *Inmunoedición tumoral.* La inmunoedición tumoral consta de 3 fases: eliminación, equilibrio y escape. La fase de eliminación contempla el concepto de inmunovigilancia tumoral,

donde los principales protagonistas son IFNα/β, IFNγ, IL-12 y TNF; células de la inmunidad innata como NK, NKT, LT γδ, células dendríticas y macrófagos; células de la inmunidad adaptativa (LT $CD4^+$ y $CD8^+$); y moléculas efectoras inmunes como TRAIL y perforina. En el equilibrio, el sistema inmune deja de ser capaz de eliminar las células tumorales residuales manteniéndolos en un estado de latencia tumoral inmunomediada; la inmunidad adaptativa es esencial para esta fase. Para la fase de escape, los tumores empiezan a crecer progresivamente, desapercibidos por el sistema inmune. Algunos de los mecanismos usados en esta fase como respuesta del tumor a la presión inmunológica son la reducción del reconocimiento inmune y/o el incremento de la inmunosupresión. Modificado de (19).

3.1.4. Cáncer

Según la OMS, el cáncer es un proceso de crecimiento y diseminación incontrolados de células, que puede aparecer en cualquier parte del cuerpo. En 2008 se diagnosticaron 12,7 millones de casos nuevos, mientras que en el 2015 ocasionó 8,8 millones de defunciones, siendo la segunda causa de muertes en el mundo y casi 70% de las muertes por cáncer se registran en países de ingresos medios y bajos (20). Desde 1838, se sabe que los tejidos cancerosos están conformados por células con morfología alterada y que son causadas por lesiones celulares. Estas células además tienen la capacidad de migrar e invadir tejidos lejanos, generando metástasis. El proceso por el cual las células se transforman en cancerosas es denominado carcinogénesis, que está dado por mutaciones en los genes de las células. Se hipotetiza que las mutaciones se van acumulando e incrementando en la progenie de células troncales promoviendo la aparición de célula troncales cancerosas (CSC, por sus siglas en inglés *Cancer Stem Cells*). A través del proceso de inmunovigilancia tumoral, las células del sistema inmune son capaces de eliminar estas células malignas, pero algunos clones desarrollan mecanismos que les permiten evadir esta respuesta inmune (21). Las CSC forman parte del tumor y como su nombre lo indica, son las células iniciadoras del cáncer, caracterizándose por propiedades tumorigénicas y de troncalidad que incluye la autorenovación y mantenimiento, además de resistencia a la quimioterapia y radioterapia (22). Fueron descritas por primera vez en 1994 por J. Dick en un estudio sobre leucemia mieloide aguda (23).

Las características que comparten las células tumorales son: independencia de señales de crecimiento, insensibilidad a estímulos que inhiben el crecimiento,

invasividad y metástasis, evasión de apoptosis, potencial ilimitado de replicación, angiogénesis sostenida, reprogramación del metabolismo energético y evasión de la destrucción inmune. La inestabilidad genómica e inflamación favorecen su desarrollo (21). Dependiendo del tipo de cáncer, será su crecimiento y propagación además del tratamiento empleado para tratarlo. Los tratamientos más comunes son cirugía, quimioterapia y radioterapia (24).

El cáncer es una de las principales causas de morbimortalidad en niños y adolescentes. Cada año se diagnostican 200,000 casos de cáncer en este grupo etario. En países de medios y bajos ingresos la sobrevida en de un 20%, lo cual se relaciona con incapacidad de diagnóstico preciso y oportuno, poco o nulo acceso a los tratamientos, abandono del tratamiento, defunciones por toxicidad y exceso de recidivas. En México, la tasa de incidencia (por millón) para niños y adolescentes hasta el 2017 fue de 89.6, y los principales cánceres fueron: leucemias (48%), linfomas (12%) y tumores del sistema nervioso central (9%). La sobrevida nacional en niños y adolescentes registrados en el Registro de Cáncer en Niños y Adolescentes (RCNA) es de 57%, mientras que en países de altos ingresos esta es de 90% (25).

El cáncer pediátrico es la segunda causa de muerte en personas menores de 20 años. En el estado de Puebla, las tres principales neoplasias en menores de 18 años son: leucemia (52%), linfomas y neoplasias reticuloendoteliales (12%) y neoplasias de células germinales (9%); siendo la LLA la condición más encontrada en esta población (26).

3.1.4.1. Leucemia

La primera vez que fue descrito un caso de leucemia fue en 1845, por John Bennett, quien describió la hipertrofia del bazo e hígado, además de la presencia de células sanguíneas anormales en el paciente, pero fue Rudolph Virchow quien acuñó el término de “leucemia”. En 1850 Henry Fuller describió por primera vez la leucemia en la infancia. Neumann (1872) reconoció a la leucemia como una enfermedad de la médula ósea. La palabra leucemia significa “sangre blanca”, esto debido a que en los

primeros casos reportados se describía que los vasos sanguíneos de los pacientes estaban llenos de una sustancia semejante a la pus (27).

La leucemia es la proliferación maligna de las células hematopoyéticas, cuya acumulación progresiva se acompañada de una disminución en la producción de los elementos sanguíneos normales. Se clasifica en dos grupos principales según la agresividad de la enfermedad, estos son leucemia aguda y crónica, que a su vez se subdividen en linfoide y mieloide de acuerdo con el linaje afectado: Leucemia Mieloide Aguda (LMA), Leucemia Mielocítica Crónica (LMC), Leucemia Linfocítica Crónica (LLC) y Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA). Subtipos adicionales pueden identificarse con base en criterios morfológicos, citoquímicos, inmunológicos y citogenéticos de las células malignas (28).

LMA, LMC y LLC son las menos comunes en latinos en comparación con personas blancas y de color no latinas. Sin embargo, en el caso de la LLA la población latina tiene la mayor incidencia de este padecimiento además de presentar peores pronósticos (29,30).

En el 2015 la prevalencia de leucemia en México dentro de la población infantil con cáncer fue de 59.4%, mientras que la incidencia de LLA fue de 79.8/1,000,000 (31).

3.2. Antecedentes específicos

3.2.1. Leucemia Linfoblástica Aguda

La leucemia aguda se caracteriza por la proliferación neoplásica de cualquier célula del tejido hematopoyético, que sin el tratamiento adecuado puede causar la muerte en un lapso corto de tiempo (27). La leucemia linfoblástica aguda (LLA) se debe a la acumulación de linfoblastos, que en otras palabras es la proliferación descontrolada de células linfoides inmaduras, que invaden la médula ósea y bloquean la hematopoyesis normal (32). Siendo la enfermedad maligna más frecuente en la infancia, la LLA representa en menores de 15 años el 76% de todas las leucemias y estas a su vez representan el 30% de todos los cánceres en esta población. La etiología de las leucemias agudas no es conocida con precisión por ser multifactorial

(27). Clínicamente, su inicio es abrupto y continúa progresivamente, teniendo como consecuencias:

- Falla de la médula ósea con anemia, trombocitopenia y neutropenia.
- Infiltración de otros órganos con dolores óseos, linfadenopatías, esplenomegalia moderada, hepatomegalia y síndrome meníngeo, en pocas ocasiones infiltración a testículo o comprensión mediastinal.

La mayor incidencia de casos con evolución desfavorable es documentada en población hispana. A pesar de que las tasas de supervivencia han aumentado en los últimos años por el desarrollo de tratamientos eficientes, el diagnóstico tardío, la resistencia a la quimioterapia, la infiltración extramedular, la enfermedad residual y la recaída empeoran significativamente el desenlace de la enfermedad. Debido a esto la búsqueda e implementación de nuevas estrategias de tratamiento se han convertido en una prioridad de salud (32,33).

La LLA presenta por lo menos tres variantes morfológicas definidas: L-1, L-2 y L-3; la diferencia entre un grupo y otro se basa en el tamaño, el grado de maduración del núcleo, la presencia de nucléolos y vacuolas (27,28). Debido a que el diagnóstico basado solamente en la morfología es poco objetivo y presenta muchas variantes en la interpretación, en la hematología moderna la clasificación de las leucemias linfoblásticas se basa no sólo en criterios morfológicos, sino también en su origen inmunológico (inmunofenotipo) y las características genéticas.

Según la Organización Mundial de la Salud, las neoplasias linfoides se clasifican en:

-Neoplasias derivadas de precursores linfoides de linaje B y T.

-Neoplasias derivadas de células maduras B, T o NK.

La LLA corresponde al primer grupo y se subdivide en tres categorías principales: LLA-B sin otras especificaciones, LLA-B con alteraciones citogenéticas recurrentes y leucemia linfoblástica de T. Morfológicamente no es posible distinguir entre la LLA de linaje B y T, por lo que para determinar el inmunofenotipo de la leucemia se usa la citometría de flujo, que es el estándar de oro para el diagnóstico de esta patología (34).

El inmunofenotipo establece con certeza el origen de la leucemia. Según la OMS, el 70% de los pacientes presentan LLA-B, 25% LLA-T y 5% son de células B maduras (32).

Aunque la etiopatología de las leucemias agudas es incierta, la teoría de los múltiples hits sugiere que una primera mutación originará una célula pre-leucémica el cual se sugiere que surge durante el desarrollo temprano, tras el nacimiento y dependiendo del micro y macroambiente un segundo hit desencadenará la evolución de la primera célula leucémica para establecer el inicio de la enfermedad (35). Tampoco se conoce con certeza si la célula de origen son células troncales o células diferenciadas que adquieren propiedades de troncalidad tras la transformación maligna. Como se mencionó en secciones previas, las leucemias de origen mieloide permitieron establecer el modelo jerárquico del cáncer donde las células troncales leucémicas (LSC, del ingés *leukemia stem cell*) son la población encargada del mantenimiento del tumor y pueden ser enriquecidas en el mismo compartimento inmunofenotípico de HSC normales, se conocen ciertos marcadores diferenciales entre las LSC y las HSC en humanos como el CD123 pero su expresión es heterogénea a través de los pacientes (36). Para la LLA-B, el modelo jerárquico basado en inmunofenotipo no es aplicable ya que varios experimentos realizados por el Dr. Vormoor sugieren que los blastos en cualquier estadio de diferenciación proB ($CD34^{+}CD19^{+}$) o preB ($CD34^{-}CD19^{+}$) es capaz de recapitular la leucemia con la misma heterogeneidad que en el tumor primario (37). Sin embargo, se ha demostrado la existencia funcional de las células iniciadoras de la leucemia (LIC, del inglés *leukemia-initiating cells*) las cuales tienen una frecuencia baja pero variable, son resistentes a la quimioterapia convencional, son quiescentes, recapitulan la leucemia en trasplantes seriados y son altamente dependientes de su nicho en la MO (38,39).

3.2.1.1. Citometría de flujo y el inmunofenotipo en la leucemia linfoblástica aguda.

La citometría de flujo es un sistema que sirve para detectar y después analizar las señales de luz generadas por partículas mientras pasan por una corriente líquida

atravesada por un haz de luz (40). Analiza múltiples características físicas de cada célula individualmente, tales como tamaño y granularidad; además de brindar información de aspectos bioquímicos, biofísicos y moleculares de las mismas.

La dispersión de la luz está directamente relacionada a propiedades estructurales y morfológicas de las células, mientras que la emisión de fluorescencia derivada de una prueba de fluorescencia es proporcional a la cantidad de la sonda fluorescente unida a la célula o componente celular.

Los componentes principales de los citómetros de flujo son: de fluidos, ópticos (excitación y colección), red electrónica (detectores) y computadora. El componente de fluidos es responsable de dirigir las partículas contenidas en el líquido hacía la fuente de luz. El sistema óptico a través de la excitación enfoca la fuente de luz en la célula o partícula, mientras que su otra parte (colección) transmite la dispersión de luz o la emisión de fluorescencia de la partícula a la red electrónica, la cual detecta la señal y la convierte en información digital que es proporcional a la intensidad de la luz. La computadora será el destino final para analizar la información recolectada (**Figura 3**).

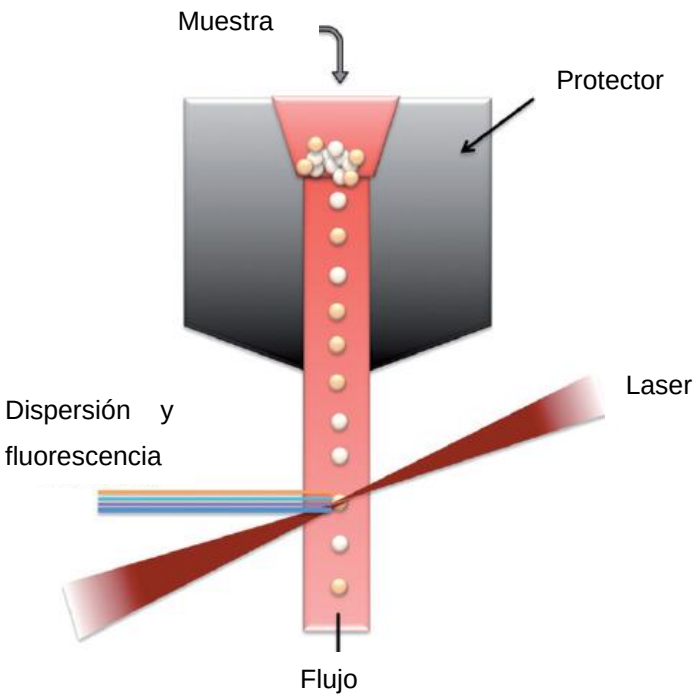

Figura 3. *Principales componentes de la citometría de flujo. Modificado de Adan et al., 2017 (37)*

Un compuesto fluorescente tiene un rango específico de longitud de onda en la cual absorbe la energía de la luz. La absorción de la luz estimula el electrón a un nivel más alto de energía, en lo que se conoce como estado excitado. Este electrón al volver a su estado base libera el exceso de energía en forma de fotones de luz en una longitud de onda específica, lo cual es conocido como fluorescencia. Los compuestos fluorescentes son usados para la identificación de poblaciones celulares, antígenos de superficie celular e intracelulares, determinación de ácidos nucleicos, medición de actividad enzimática y estudios de apoptosis, entre otras (41). Para que esto sea posible el compuesto fluorescente debe encontrarse unido covalentemente a un anticuerpo. El anticuerpo será específico para el antígeno de interés (por ejemplo, proteínas de membrana celular), lo que permitirá identificar los blancos de interés a partir del color de la fluorescencia del fluorocromo asociado (42).

El inmunofenotipo realizado por citometría de flujo de multicanal se ha convertido en el procedimiento estándar para el diagnóstico y subclasificación de la LLA, además de ser una herramienta de gran utilidad para la detección y monitoreo de la enfermedad mínima residual (mejor llamada “enfermedad medible residual”, por la limitante en la sensibilidad del sistema analítico para cuantificar blastos (33)), gracias a su rapidez, eficacia y sensibilidad (34). Para poder llevar a cabo el análisis multiparamétrico de la célula, se debe contar con un panel de citometría de flujo, el cuál debe ser previamente diseñado según los marcadores que se desea buscar y las fluorescencias que pueden ser detectadas por el citómetro. El incremento en el número de canales de detección y la variabilidad de marcadores y anticuerpos conjugados a fluorocromos disponibles, permiten crear paneles multicolor que evalúan gran cantidad de parámetros de manera simultánea (43,44).

En el inmunofenotipo (según el Grupo Europeo para la Caracterización Inmunológica de Leucemias, “EGIL” por sus siglas en inglés) para LLA de linaje B se suelen utilizar los marcadores CD19, CD20, CD22, CD24 y CD79a. Si hay una reacción positiva para CD19, CD22 y CD79 (en dos o tres de estos), sin otro marcador de diferenciación se clasifica como LLA-B. El marcador CD10 positivo la clasifica como LLA común (subtipo

B-II), mientras que los casos con la identificación adicional de la cadena mu pesada citoplasmática constituyen el grupo pre-B (subtipo B-III) y la presencia de las cadenas ligeras de inmunoglobulina en su superficie definen la LLA-B madura (subtipo B-IV) (34,45).

En nuestro laboratorio, de manera rutinaria se utiliza un panel basado en los antígenos de superficie de maduración (CD45, CD34), marcadores linfoides B (CD10, CD19), células NK y T (CD56, CD7 y CD3) y marcadores mieloides (CD13 y/o CD14). De esta forma, las leucemias agudas se clasifican en tres grupos de acuerdo con el linaje afectado: LLA-B, LLA-T y LMA. En el grupo de las LLA-B se identifican otros tres grupos que dependen del estado de diferenciación de los blastos leucémicos, estos son: ProB ($CD34^{+}CD10^{+}CD19^{+}$), PreB ($CD34^{-}CD10^{+}CD19^{+}$) o la combinación de ambos precursores ProB y PreB (46).

3.2.2. Microambiente tumoral

Así como ocurre en la hematopoyesis normal, las células cancerígenas emergen y progresan dentro nichos específicos, el cual es denominado microambiente tumoral en el que participan diferentes tipos celulares y moléculas de señalización. El microambiente tumoral además de estar implicado en el crecimiento tumoral, invasión y metástasis (47), está asociado con adquisición de resistencia a quimioterapia (48).

El microambiente de la MO mantiene la supervivencia y diferenciación de las HSC, pero también puede ser permisivo para el inicio y mantenimiento del desarrollo, progresión y expansión de la leucemia (48,49). Un ejemplo de esto son las células estromales, que proveen de señales cruciales a las células leucémicas que afectan para la resistencia a quimioterapia (50).

En la LLA, el papel inmunológico del nicho de la MO no ha sido completamente estudiado, a pesar del incremento de evidencia que sugiere que el sistema inmune contribuye al desarrollo y en el resultado de la leucemia. Se ha observado un incremento de marcadores asociados a la regulación inmunitaria como PD1 en la MO de los pacientes con LLA en comparación con controles sanos (51), o la aparición de

poblaciones reguladoras como Treg, resaltando el importante rol que juega el estado de inmunosupresión en el microambiente tumoral (52).

Aparentemente las células leucémicas secuestran y destruyen los nichos que soportan las HSC cambiando potencialmente el equilibrio de un mantenimiento estable de la hematopoyesis a la generación de un microambiente que acelera la expansión de células leucémicas, la propia leucemogénesis y la adquisición de quimioresistencia (**Figura 4**)(53,54).

Los blastos de la LLA-B editan el nicho mesenquimal de la médula ósea para convertirlo en un nicho de soporte para la leucemia y quimio-protector. Esto contribuye a la falla del tratamiento y a la recaída en la enfermedad (55).

Otro de los mecanismos a través de los cuáles las células leucémicas modifican el microambiente es por un cambio en su metabolismo, como se observa en el efecto Warburg, donde por medio de glicolisis anaeróbica consumen altos niveles de glucosa, brindándoles una cantidad similar de ATP a la que se obtendría por la vía de oxidación aeróbica, pero con una cinética mucho más rápida, lo que les confiere a estas células una ventaja selectiva en el microambiente hipóxico de la MO. Interesantemente, los linfocitos Treg, que son considerados como importantes contribuyentes en la inmunoevasión inducida por el tumor, muestran una mayor resistencia a la vía del ácido láctico, mientras se basan principalmente en la fosforilación oxidativa mitocondrial (OXPHOS) (56).

En una investigación se observó que la MO de ratones neonatos estaba significativamente enriquecida con un subconjunto primitivo de MSC, las cuales expresaban niveles más altos de moléculas de intercomunicación de nicho que mostraban regular directamente la autorenovación de las HSC, consistente con un microambiente de mayor soporte para las HSC, en comparación con la MO en adultos. Sin embargo, una mayor capacidad de mantenimiento de CSC ocurre en la MO de los adultos en contraste con el soporte en MO neonatal. Las diferencias en los nichos dependiendo de la edad, pueden influir de manera importante en el comportamiento de las CSC y el curso de la enfermedad, pero al mismo tiempo pone en evidencia las propiedades innatas anti-tumorales del nicho (57).

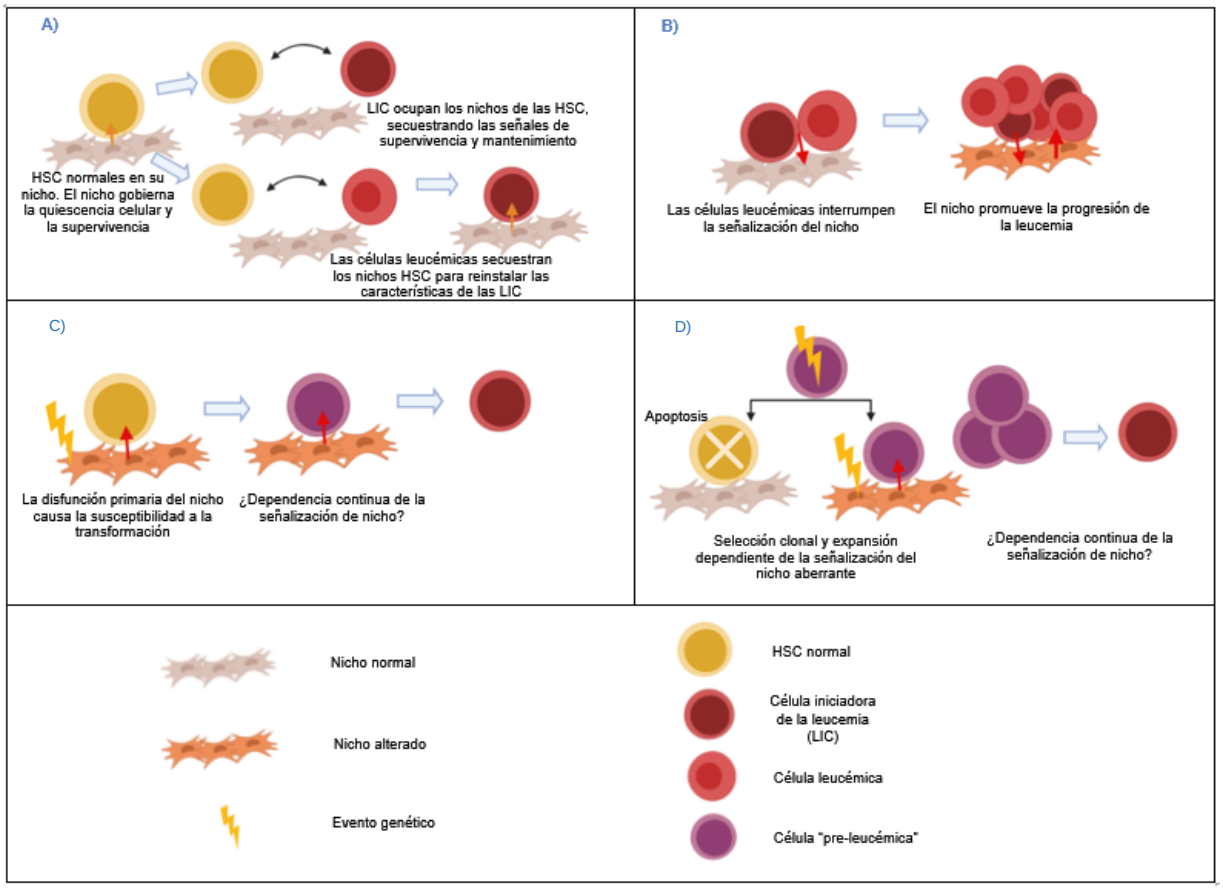

Figura 4. *Contribución del nicho en la leucemogénesis*. A) Competencia por los nichos innatos y su señalización para el mantenimiento y supervivencia entre HSC y LIC. Alternativamente las células leucémicas ocupan los nichos de las HSC para reinstalar las características de las LIC. Consecuencias clínicas: Persistencia de EMR, recaída y supresión de la hematopoyesis normal. B) Disrupción del nicho para facilitar la progresión de la leucemia, alterando el microambiente. C) Oncogénesis impulsada por el nicho. La disrupción primaria del nicho es requerida para la oncogénesis, lo que promueve la transformación maligna. D) El nicho aberrante puede requerir de la expansión clonal en una "cooperación interclonal oncogénica". Modificado de Raaijmakers, 2011 (45)

Las células de la inflamación y sus productos son importantes reguladores del microambiente tumoral. Hay información relevante que marca la conexión entre la inflamación crónica y la carcinogénesis; se estima que cerca del 25% de los tumores están asociados con procesos inflamatorios crónicos, incluyendo la LLA. Esto podría ser a través de dos vías: la extrínseca, resultante de factores externos latentes en la respuesta inflamatoria, y la intrínseca, conducida por oncogenes o genes supresores

de tumores que activan la expresión de programas relacionados a la inflamación. Trabajos previos del laboratorio de Oncoinmunología soportan la noción de que las células malignas contribuyen directamente en la patogénesis de la LLA al crear un microambiente inflamatorio (58), que provoca el agotamiento de las células troncales y progenitoras en la médula ósea leucémica (46), acompañado de la secreción anormal de citocinas pro-inflamatorias (59), lo que provoca la perturbacón del nicho tras la pérdida de ejes reguladores de la hematopoyesis normal como CXCR4-CXCL12. (60).

Como se enfatizó previamente, las MSC forman parte importante del microambiente hematopoyético estableciendo quizá el nicho más importante para la linfopoyesis de células B debido a que en las células CAR, un subtipo de MSC, se co-expresan CXCL12,SCF e IL-7 esenciales para este proceso (61). Además, las MSC mantienen un nicho inmunoprovilegiado a través de la producción de moléculas supresoras en coordinación con linfocitos Treg $CD150^{+}$ para proteger a sus residentes de auto-ataques inmunológicos y mantener estados de quiescencia (62). Durante la leucemia, las MSC son receptivas de productos celulares como citocinas inflamatorias, exosomas y otras moléculas que editan su comportamiento normal en favor de la progresión tumoral (63). En un estudio realizado por la Dra. Den Boer se demostró que las MSC producen citocinas inflamatorias como CXCL8 por la estimulación generada tras el contacto con células de LLA (tanto de pacientes como de líneas celulares) en co-cultivo (64). Interesantemente, las MSC aisladas de pacientes con LLA asó como MSC de sujetos normales que son co-cultivadas con células leucémicas pierden sus propiedades inmunosupresoras (16). Recientemente, nuestro laboratorio demostró la existencia de una población de células NK con fenotipo supresor que es promovido por MSC derivados de pacientes de mal pronóstico (65). En conjunto, estos hallazgos sugieren que las MSC además de proveer el sitio de retención para las HSC, durante la LLA sus propiedades inmunomoduladoras se modifican de forma orquestada por el tumor a través de factores solubles y contacto.

4. Planteamiento del problema

En la leucemia linfoblástica aguda, el nicho mesenquimal de la médula ósea es modificado para dar soporte a la enfermedad (55). De esta manera, las células mesenquimales estromales (MSC) proveen de señales a las células leucémicas necesarias para su supervivencia y expansión a costa de la hematopoyesis normal. Las MSC además de ser necesarias para las señales de supervivencia a las células tumorales, ayudan a la evasión de la respuesta inmune local (51). Por esta razón, se deben dilucidar los posibles mecanismos a través de los cuáles las MSC inducen "tolerancia tumoral" en el sistema inmunológico dentro de la médula ósea.

5. Hipótesis científica

Las propiedades inmunomoduladoras del nicho estromal mesenquimal de la médula ósea son modificadas durante la leucemia linfoblástica aguda.

6. Objetivos

6.1. Objetivo General

Evaluación del papel inmunomodulador de las células estromales mesenquimales en la médula ósea durante la leucemia linfoblástica aguda sobre células de la respuesta inmune.

6.2. Objetivos Particulares

- Establecer un modelo *in vitro* de microambiente mesenquimal leucémico.
- Estudiar el efecto en la proliferación e inmunofenotipo de poblaciones celulares inmunológicas bajo en un microambiente tumoral mesenquimal.
- Evaluar los marcadores de activación y moléculas de punto de control inmunológico en las células estromales mesenquimales de pacientes con leucemia linfoblástica aguda y su correlación con el inmunofenotipo de las células de la respuesta inmune inducidas en ese contexto.

7. Material y métodos

7.1. Diseño del estudio

El presente estudio se cataloga como longitudinal, analítico, experimental y abierto, con temporalidad prospectiva, y recolección de datos prolectiva.

7.2. Ubicación espacio-temporal

Para realizar la investigación se emplearon muestras de aspirados de médula ósea de pacientes, obtenidas del Hospital Infantil de México Federico Gómez, Hospital de Traumatología y Ortopedia Lomas Verdes y la Unidad Médica de Alta Especialidad del Hospital San José (IMSS). De igual manera se utilizaron muestras de sangre periférica de individuos voluntarios sanos y líneas celulares estromales y leucémicas, que se obtuvieron del laboratorio de Oncoinmunología, en el Hospital General de Zona 05 IMSS, Metepec en el estado de Puebla, donde también se llevó a cabo la parte experimental de este proyecto, comprendida entre los años 2018 y 2020.

7.3. Estrategia de trabajo

El proyecto se divide en dos fases, en la primera se evaluó el efecto de los sobrenadantes de líneas celulares leucémicas en líneas de células estromales, para simular el acondicionamiento que ejercen las células leucémicas en los nichos a través de factores solubles y conocer el impacto en la proliferación e inmunofenotipo en células mononucleares de sangre periférica (PBMN) de donadores sanos en co-cultivo tipo Dexter, las cuales fueron cosechadas posterior a 48h y evaluadas por citometría de flujo tras los marcajes con anticuerpos fluorocromados. Esta fase fue de utilidad para la implementación del modelo por la similitud de las líneas celulares estromales murinas con estroma humano, antes del uso de células MSC derivadas de pacientes y para la evaluación del efecto de los microambientes emulados en las células de la respuesta inmunitaria (PBMN).

Para la segunda parte, se emplearon cultivos primarios de células estromales mesenquimales derivados de aspirados de médula ósea de pacientes con leucemia (estroma leucémico) y de donadores hematológicamente sanos (médula ósea normal). Estas células fueron previamente aisladas y expandidas de acuerdo con los protocolos

rutinarios en el Laboratorio de Oncoinmunología. Parte de las células se utilizaron para analizar los marcadores CD73, CD90,CD105, PD-1, PD-L1, CXCL11 y FOXP3 por citometría de flujo, mientras que el resto fueron utilizadas para ulteriores co-cultivos con células mononucleares de sangre periférica (PBMN) de donadores sanos. Después de 48, 120 o 168 horas, las PBMN fueron colectadas para el análisis de inmunofenotipo (**Figura 5**).

Figura 4. *Estrategia experimental.*

7.4. Muestreo

7.4.1. Definición de la unidad de población

Para el propósito de este proyecto se cuenta con tres poblaciones diferentes:

- Pacientes con leucemia linfoblástica aguda en un rango etario de 5 a 25 años, de sexo masculino o femenino, ingresados en cualquiera de los hospitales mencionados con anterioridad, a los cuales se les haya realizado un aspirado

de médula ósea, para el posterior aislamiento y expansión de las células estromales mesenquimales.

- Pacientes provenientes de cualquiera de los hospitales, de sexo femenino o masculino, a los que por cirugía ortopédica se les realizó un aspirado de médula ósea o se obtuvo una fracción de hueso con médula ósea para la posterior generación del cultivo primario de células estromales de médula ósea normal.
- Donadores voluntarios de sangre periférica, mayores de 18 años, sin registro de enfermedades inmunológicas o crónico degenerativas, de sexo masculino y femenino.

7.4.2. Selección de la muestra

- Cultivos primarios de células estromales mesenquimales viables, con buena morfología y confluencia, provenientes de aspirados de médula ósea de pacientes con leucemia linfoblástica aguda y controles.
- Muestras de sangre periférica, obtenidas de donadores sanos, en tubo de recolección con EDTA con un volumen mayor a 2 ml.

7.4.3. Criterios de selección de las unidades de muestreo

7.4.3.1. Criterios de inclusión

- Pacientes con leucemia linfoblástica aguda, ingresados en los hospitales considerados en este estudio, de 5-25 años, de ambos sexos.
- Pacientes a los que se les realizó un aspirado de médula ósea o se les sustrajo una fracción de hueso con fines ortopédicos, de sexo masculino o femenino, sin leucemia linfoblástica aguda.
- Donadores voluntarios, mayores de 18 años, en buen estado de salud, de sexo femenino o masculino, sin estar inmunocomprometidos.

7.4.3.2. Criterios de exclusión

- Pacientes que no hayan firmado un consentimiento informado o no estén al tanto del procedimiento a realizar (en el caso de los donadores voluntarios de PBMN).

- Muestras de aspirado de médula ósea de bajo volumen, sin el número de células requerido para establecer un cultivo primario.
- Muestras con poca viabilidad celular.
- Donadores sanos voluntarios menores de 18 años.

7.4.3.3. Criterios de eliminación

- Muestras con un número celular insuficiente para el propósito de este estudio.
- Pacientes con enfermedades inmunológicas (en la médula ósea normal y PBMN).

7.4.4. Diseño y tipo de muestreo

El proyecto cuenta con un muestreo no probabilístico, intencional y causal. Esto debido a que la selección de los individuos será según los criterios previamente mencionados.

7.4.5. Tamaño de la muestra

Se tomaron en cuenta todas las muestras que contaran con los criterios de inclusión dentro del espacio-temporal establecido.

7.5. Definición de las variables y escalas de medición

Variable	Dimensiones	Indicadores	Índice
Inmunofenotipo de las células estromales mesenquimales en la LLA.	Estratificación de las células estromales mesenquimales.	Citometría de flujo Marcadores celulares	Número de células positivas a los marcadores. Intensidad media de fluorescencia (IMF)
	Poblaciones celulares inmunológicas diferenciadas bajo un microambiente tumoral		Porcentajes y números de células

7.6. Método de recolección de datos

La generación de cultivos primarios de células estromales mesenquimales se realizó a través de aspirados de médula ósea o fracciones de hueso. En ambos casos las muestras fueron tomadas por especialistas de los hospitales incluidos en este proyecto. Las PBMN se obtuvieron a través de venopunción, realizada por un experto.

Todas las muestras que cumplieron los requisitos fueron empleadas siguiendo los procedimientos establecidos en el proyecto.

7.7. Técnicas y procedimientos

- Líneas celulares

Las líneas de estroma empleadas para la primera parte del proyecto fueron células estromales de ratón OP9 y MS-5. El sobrenadante para el acondicionamiento de los estromas se obtuvo de las líneas celulares humanas de leucemia linfoblástica aguda NALM-6, REH y RS4;11.

- Muestras biológicas

Aspirados de médula ósea de pacientes con sospecha de leucemia linfoblástica aguda y sujetos hematológicamente sanos (procedimientos ortopédicos).

Sangre periférica de donadores sanos.

- Cultivos primarios de células estromales mesenquimales

De los aspirados de médula ósea se obtuvieron las células mononucleares que fueron suspendidas en 2mL de DMEM al 10% de SFB en placas Petri de 20 mm e incubadas a 37°C, 5% de CO2. Se observaron periódicamente al microscopio hasta detectar crecimiento de este tipo de células. El cambió de medio se realizó cada tercer día a partir del inicio del cultivo. Una vez que llegaron a confluencia se cosecharon utilizando tripsina 0.05% EDTA, fueron colectadas y re-sembradas para su expansión y posterior uso experimental.

- Obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMN).

Posterior a la obtención de sangre periférica de los donadores voluntarios, se separaron las células mononucleares por gradiente de densidad. La muestra fue diluida 1:1 con PBS 1X; en un tubo de 15 mL se colocó el volumen de Ficoll correspondiente al de muestra. La muestra diluida se colocó suavemente sobre el Ficoll sin romper la fase, y se centrifugó a 400g durante 20 minutos sin freno ni aceleración. Una vez centrifugada se recuperó el anillo de células mononucleares ubicado entre la interfase del plasma y el Ficoll. Las células recuperadas se lavaron con 5 mL de FACS buffer, para posteriormente ser resuspendidas en medio RPMI al 10% de SFB. La viabilidad se obtuvo a través de azul de tripán y conteo en cámara de Neubauer.

- Recolección de sobrenadantes

Los sobrenadantes de los cultivos de 48h de las líneas celulares de leucemia linfoblástica aguda fueron colectados y almacenados en congelación hasta su uso en microtubos de fondo cónico con capacidad de 1.5 mL.

- Siembra de monocapas estromales

Este proceso se realizó en ambas partes del proyecto, para la primera con las líneas celulares de ratón OP-9 y MS-5, mientras que en la segunda fueron empleadas células estromales mesenquimales primarias. En ambos casos las células se cosecharon de los cultivos en crecimiento. Para el estroma de líneas celulares se emplearon placas de 24 pozos con las células previamente resuspendidas en α-MEM 10% SFB colocadas a una concentración de 50,000 células en 300 µL por pozo. En el caso de los estromas de pacientes, se utilizaron placas de 96 pozos de fondo plano, y las células fueron resuspendidas en DMEM 10% SFB, colocando por duplicado 15,000 células en 100 µl de medio por pozo. Una vez las monocapas de estroma llegaron a confluencia (aproximadamente a los 2 días) se procedió a generar los co-cultivos con las PBMN.

- Ensayo de proliferación o dilución de CFSE

Para determinar si las células se dividían o simplemente se mantenían en los co-cultivos se llevó a cabo el ensayo de proliferación o dilución de CFSE.

Para un millón de células PBMN, se preparó CFSE en dilución 1:1000, en 1 ml de PBS 1x estéril. Se resuspendieron las células PBMN (1 x 10^6) en 900 µl de PBS 1X. Añadimos 100µl de CFSE diluido 1:1000 e incubamos por 10 minutos a temperatura ambiente o 37°C cubriéndolo de la luz. Se añadieron 2 ml de medio RPMI 10% SFB y se incubó por 5 minutos más. Centrifugamos a 1500 rpm x 5 minutos y decantamos pasado el tiempo. Las células se resuspendieron en el medio RPMI + αMEM (1:1) y se separaron unas cuantas células para leer en el citómetro. Posterior al tiempo de co-cultivo se llevaron las células PBMN al citómetro para su análisis.

- Acondicionamiento de las monocapas de estroma con sobrenadantes de línea celular de LLA.

Los sobrenadantes provenientes de las líneas celulares de LLA fueron descongelados a conveniencia del experimento, colocando en conjunto 150µl de sobrenadante (SN) con 150µl de medio α-MEM sobre las monocapas de las líneas celulares OP-9 y/o MS-5, acorde a los siguientes escenarios:

SN / L.C	NALM-6	RS4;11	REH
OP-9			
MS-5			

Se consideraron también los controles experimentales, los cuales corresponden a estroma sin acondicionamiento y pozos sin estroma.

- Co-cultivo de MSC con las células mononucleares (PBMN).

Tras la verificación de la confluencia de las monocapas estromales, se procedió a colocar las células mononucleares sobre éstas. En el caso de las monocapas de OP-9 y MS-5 previamente acondicionadas con los sobrenadantes se colocaron las PBMN a una concentración de 100,000 células/100µL de medio RPMI al 10% de SFB, colocando 100µL en cada pozo; el co-cultivo se dejará por 2, 5 o 7 días. Para las monocapas de MSC´s primarias se sembraron 100,000 células por pozo resuspendidas en 100µl de medio DMEM al 10% SFB, manteniendo el co-cultivo 48 h.

En adición, se consideraron los siguientes controles: co-cultivo de PBMN sobre el MSC sin acondicionamiento y cultivos libre de estroma (SF, del inglés *stromal-free*), además de co-cultivos con MSC derivados de donadores sanos.

SN / L.C	NALM-6	RS4;11	REH	Sin SN
OP-9				
MS-5				

Co-cultivos de PBMN sobre monocapas acondicionadas con sobrenadante de LLA

MSC de pacientes con LLA	MSC de donadores sanos	Libres de MSC (SF)

Co-cultivos con células estromales mesenquimales primarias

- Cosecha del co-cultivo

Pasado el tiempo establecido se procedió a recolectar las PBMN en tubos de citometría previamente etiquetados, resuspendiendo 3 veces el volumen del pozo y filtrando con el fin de eliminar agregados celulares.

- Conteo celular y viabilidad

Se mezclaron 10µl de azul de tripán con 10 µL de la suspensión celular. En la cámara de Neubauer se colocaron 10µL y con ayuda del microscopio óptico se contaron las células refringentes (viables) previo al cálculo correspondiente para conocer la densidad celular de la muestra.

- Inmunofenotipo de MSC primarias

Se prepararon 5 tubos de citometría con 100,000 MSC en 100 µL por tubo. A los cuales se les añadió la combinación de anticuerpos de acuerdo con el protocolo descrito a continuación:

Tubos	Marcadores
1 Marcaje superficial	CD73, CD90, CD105, PD-1, PD-L1
2 Marcaje intracelular	CXCL11, FOXP3
3 Combo	CD73,CD90, CD105, PD-1, PD-L1, CXCL11
4 AF (autofluorescencia)	
5 AF fijada + Ac. secundario	Anti-rabbit Alexa fluor 488 y Anti-rabbit Alexa fluor 647

Fluorocromos
CD73 - PerCP
CD90 - PE
CD105 -APC
PD1 – APC-Cy7
PD-L1 - PB
FOXP3 - PE

Tabla 1. *Marcadores y fluorocromos en MSCs.*

Procedimiento:

Tubos					Pasos	Tiempo
1	2	3	4	5		
+	+	+	+	+	Recolectar las MSC en tubos de citometría	
+	+	+	+	+	Lavar con 1ml de FACS	5 min
+	+	+	+	+	Agregar 50 ul de bloqueador	10 min
+		+			Agregar 50 ul de cocktail de superficie	10 min
+		+			Lavar con 1ml de FACS	5 min
	+	+		+	Agregar 100 ul de cytofix-cyperm	20 min
	+	+		+	Lavar con Permwash	5 min
	+	+		+	Agregar 100 ul de Buffer Plus	10 min
	+	+		+	Lavar con Permwash	5 min
	+	+		+	Agregar 100 ul de cytofix-cytoperm	5 min
	+	+		+	Lavar con Permwash	5 min
	+	+			Agregar anticuerpo primario CXCL11 y FOXP3 e incubar	1 hr
	+	+			Lavar con FACS	5 min
		+		+	Agregar anticuerpo secundario anti- rabbit FITC (Alexa fluor 488)	30 min
	+			+	Agregar anticuerpo secundario anti-rabbit APC (Alexa flour 647)	30 min (simultaneo con el paso anterior)
	+	+		+	Lavar con FACS	5 min

Tabla 2. *Procedimiento de tinción celular.*

- Análisis del inmunofenotipo de las poblaciones inducidas en los co-cultivos

Las PBMN recuperadas de los co-cultivos fueron lavadas con 1mL FACS buffer y posteriormente se bloquearon los receptores Fc con 50 μL de PBS al 3% de SFB durante 10 minutos a 4ºC. Posteriormente se añadieron 50 μL del cocktail de anticuerpos y fueron incubados por 15-30 minutos a 4ºC. Las células se lavaron con 1 mL de FACS buffer. Para la tinción intracelular, se añadieron 100 μL de cytofix-cytoperm (BD) y se incubaron durante 20 minutos a 4ºC, posterior a este tiempo se lavaron con permwash buffer 1X (BD), para incubar con 100 μL de buffer plus (BD) por

10 minutos, se repitió el lavado con permwash, y se incubó con 100µL de cytofix-cytoperm durante 5 minutos. Posteriormente se realizó el lavado con permwash buffer 1X, y el anticuerpo intracelular fue incubado por 30 minutos. Al finalizar el tiempo de incubación, se realizó un lavado de FACS buffer.

CD3	CD56	CD19	CD25	PD-1	PD-L1	FOXP3
PerCP	BV510	APC	FITC	APC-Cy7	PB	PE

CD3	CD8	HLA-DR	CD19	CD56	IL-10	IFNγ	FOXP3
PerCP	PECy7	PB	FITC	BV510	APC	APC-Cy7	PE
CD3	CD8	HLA-DR	CD19	CD56	IL-10	IFNγ	TGFβ
PerCP	PECy7	PB	FITC	BV510	APC	APC-Cy7	PE

Tabla 3. *Marcadores y fluorocromos.* IL-10, IFN-γ, TGF-β y FOXP3 son marcadores intacelulares.

- Citometría de flujo

Todas las células cosechadas de los experimentos fueron adquiridas con el citómetro FACSCanto II (BD Biosciences).

7.8. Análisis de datos

El análisis de datos de citometría se llevó a cabo con el software FlowJo 10.0.0 (LLC), donde se investigaron las poblaciones establecidas con los marcadores de interés de acuerdo con un algoritmo de análisis para despreciar dobletes, debris (restos celulares) y células no viables. El análisis estadístico se generó con el software GraphPad Prism 6 (Graph Pad).

7.9. Diseño estadístico

7.9.1. Hipótesis estadística

El inmunofenotipo celular será diferente en los co-cultivos con estroma leucémico.

7.9.2. Pruebas estadísticas

Las diferencias entre los grupos de este proyecto se consideraron a partir de pruebas no paramétricas, con valor significativo <0.05.

8. Resultados

El microambiente tumoral induce la proliferación y el mantenimiento de linfocitos B, NK y NKT.

Posterior al mantenimiento de los co-cultivos tipo Dexter durante el tiempo establecido, se llevó a cabo el análisis de las poblaciones celulares de linfocitos recolectados de estos, para determinar sus porcentajes a partir de linfocitos totales, dependiendo de las diferentes condiciones. Lo primero que se puede observar, es que sin importar el escenario en el que se encuentren los linfocitos T (**figura 6A**), estos van a mantener un porcentaje relativamente igualitario (90 – 60%), lo que representa la mayor población linfocitaria presente en los co-cultivos. Por otro lado, los linfocitos B (**figura 6B**) tienden a incrementar su porcentaje cuando las células están co-cultivadas con estroma, especialmente con células estromales mesenquimales derivadas de pacientes, y más aún en el caso PBMN-ALL-pMSC. Los linfocitos NK (**figura 6C**), por su parte, presentan un incremento de su población en el caso de los escenarios con MSC, en comparación con el cultivo libre de estroma (SF), pero al igual que los linfocitos B, este fenómeno se ve incrementado en el escenario de microambiente tumoral ejercido por las células estromales mesenquimales derivadas de pacientes con leucemia linfoblástica aguda de B, con $p=<0.0001$ en comparación con el sistema SF. Para las células NKT (**figura 6D**), no se encontró diferencia significativa entre los grupos en comparación con el escenario SF, salvo por el co-cultivo con pMSC de donadores sanos (control).

Con base en las observaciones realizadas, se dio paso a determinar si la presencia de estas poblaciones celulares, era por el mantenimiento de las células inicialmente cultivadas (gracias al soporte del estroma) o si se estaba generando proliferación celular. Por medio de un ensayo de proliferación celular con CFSE (**figura 6E**), se observa que la división celular está presente en todos los escenarios, aunque tal como se reporta en la literatura, el estroma reduce la proliferación, mientras que el estroma condicionado con el sobrenadante de las líneas celulares de leucemia linfoblástica aguda, induce la división celular y más aún el cultivo libre de estroma.

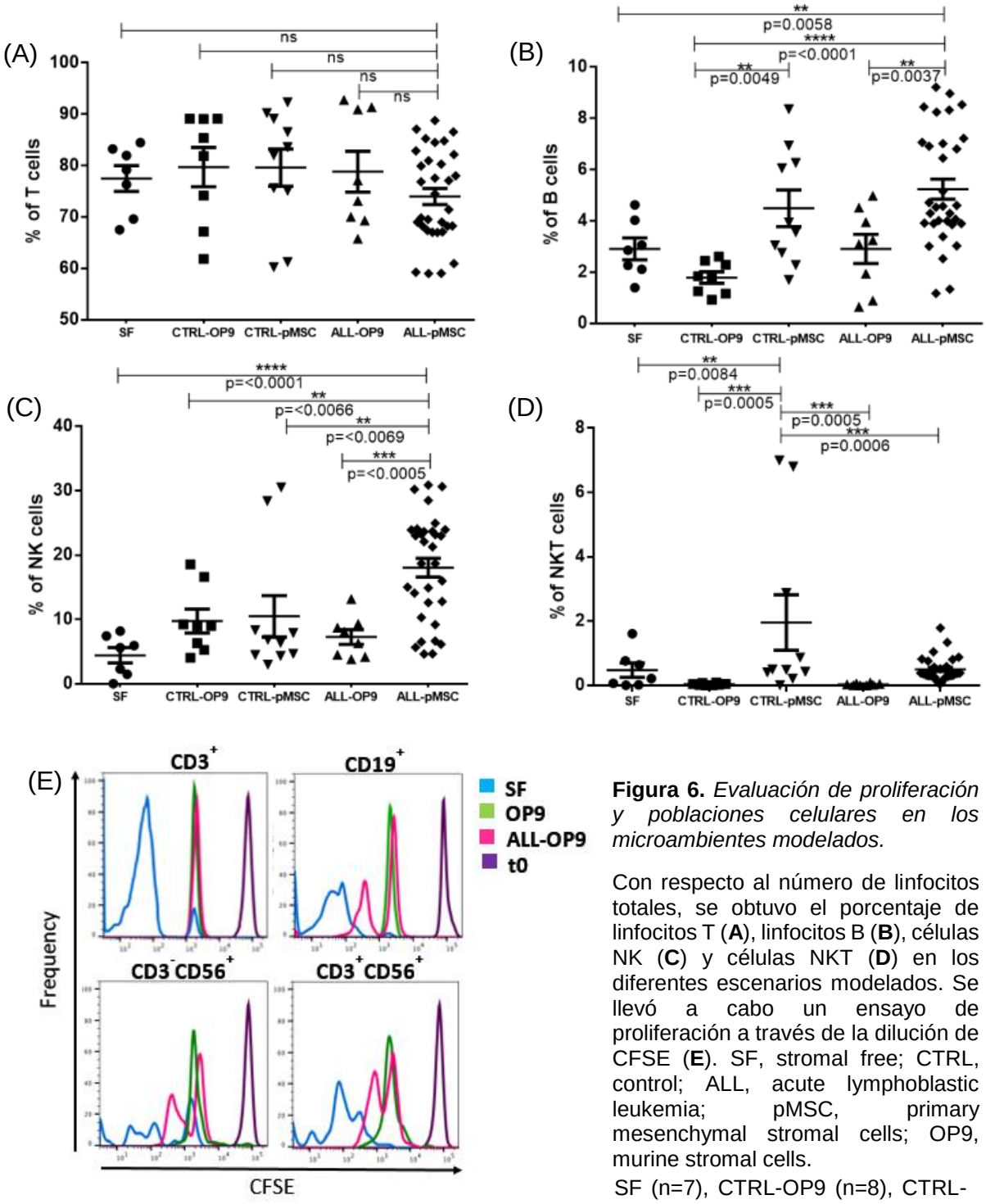

Figura 6. *Evaluación de proliferación y poblaciones celulares en los microambientes modelados.*

Con respecto al número de linfocitos totales, se obtuvo el porcentaje de linfocitos T (**A**), linfocitos B (**B**), células NK (**C**) y células NKT (**D**) en los diferentes escenarios modelados. Se llevó a cabo un ensayo de proliferación a través de la dilución de CFSE (**E**). SF, stromal free; CTRL, control; ALL, acute lymphoblastic leukemia; pMSC, primary mesenchymal stromal cells; OP9, murine stromal cells.

SF (n=7), CTRL-OP9 (n=8), CTRL-pMSC (n=10), ALL-OP9 (n=8), ALL-pMSC (n=32). *p<0.05

El microambiente leucémico induce un cambio de fenotipo en las células de la respuesta adaptativa.

En la búsqueda de marcadores (CD3, CD8, CD19 y CD56), para la identificación de poblaciones celulares por citometría de flujo y siguiendo el algoritmo de análisis, se observó que las células mononucleares en co-cultivo con el estroma proveniente de la línea celular OP9 previamente condicionado con el sobrenadante de las líneas celulares leucémicas (ALL-OP9), presentaban en las células $CD3^{+}CD8^{+}$ (linfocitos T citotóxicos) una desregulación en su fenotipo (**figura 7A**). Se observa que en esta población el marcador CD8 se ve expresado a la baja, teniendo con respecto a los otros dos escenarios, una población LT $CD8^{+high}$ (SF, CTRL-OP9) y otra LT $CD8^{+low}$ (ALL-OP9). Repitiendo el modelo, pero con la línea celular MS5, podemos observar el mismo fenómeno. En la evaluación de porcentajes de las células $CD3^{+}CD8^{+high/low}$ (**figura 7B**), se observa que mientras los escenarios libre de estroma y estroma control (ya sea OP9 o MS5) existe predominantemente la población $CD3^{+}CD8^{+high}$, en el caso del estroma leucémico esta población se ve significativamente disminuida y la población $CD3^{+}CD8^{+low}$ incrementa y tiene un porcentaje mayor en comparación con la primera. CD8 es co-receptor en la estabilización de la adhesión del receptor de linfocitos (TCR) a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad I (MHCI), por lo que la expresión a la baja de esta molécula en un microambiente tumoral estaría generando disminución en su capacidad de reconocimiento de antígenos.

Entretanto, la expresión de CD4 se mantiene estable, sin embargo el porcentaje de células $CD3^{+}CD4^{+}$ (**figura 7C**) se ve significativamente disminuido en el microambiente leucémico con p=0.0041 (SF vs ALL-MS5) y p=0.0143 (CTRL-MS5 vs ALL-MS5), lo que podría traducirse como una baja en la activación de células importantes en la respuesta inmunitaria como lo son los LT $CD8^{+}$.

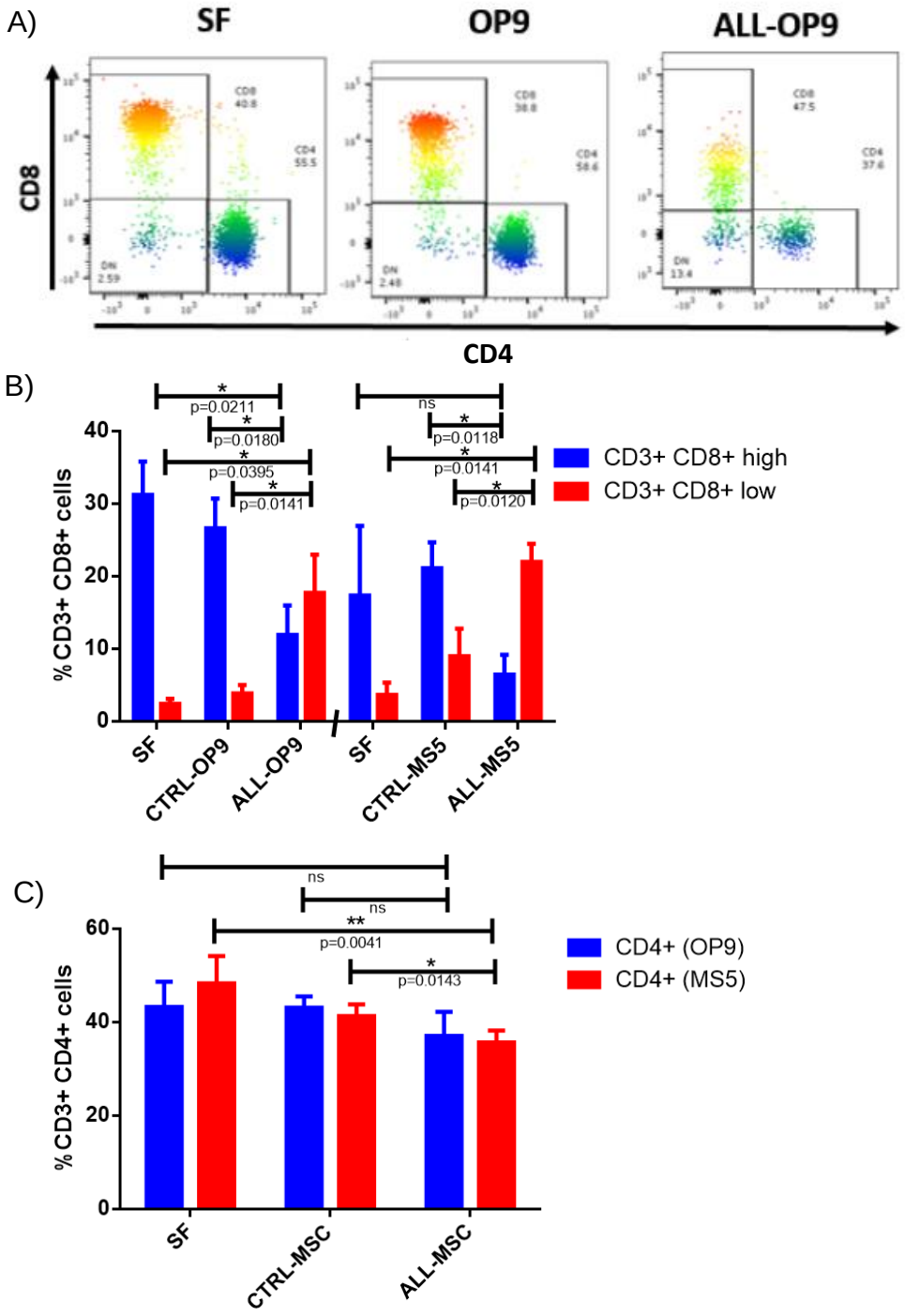

Figura 7. *Porcentaje de poblaciones CD3⁺CD8⁺ high / low y CD3+CD4⁺.*

Evaluación de la expresión de los marcadores CD8 y CD4 (porcentaje e intensidad). Plots correspondientes a las poblaciones de CD8 y CD4 positivas, provenientes de células CD3⁺ (**A**). Porcentaje de células CD3⁺CD8⁺ high/low en los co-cultivos sobre las monocapas de las líneas celulares OP9 y MS5 o libre de estroma (**B**). Porcentaje de células CD3⁺CD4+ en las diferentes condiciones (**C**). SF, stromal free; CTRL, control; ALL, acute lymphoblastic leukemia; OP9/MS5, murine stromal cells. SF (n=3), CTRL-OP9 (n=8), ALL-OP9 (n=8); SF (n=2), CTRL-MS5 (n=5), ALL-MS5 (n=14). *p <0.05

Expresión de HLA-DR estimulada por el microambiente leucémico

El complejo principal de histocompatibilidad (MHC) es fundamental en la presentación de antígenos, ya sean moléculas del MHC tipo I o del tipo II. El HLA-DR, MHC del tipo II, además se expresa en los linfocitos T humanos activados (66). A través de citometría de flujo se buscó la expresión de esta molécula, en los linfocitos expuestos a los diferentes microambientes (**figura 8A**). En primera instancia podemos observar un incremento porcentual de las células $CD3^{+}HLA\text{-}DR^{+}$ en el microambiente ALL-OP9. Al hacer el análisis estadístico entre los grupos (**figura 8B**), podemos ver que la diferencia de esta población en los diferentes co-cultivos, no es significativa, pero sí presenta una tendencia a incrementar en el microambiente leucémico. De igual manera la expresión de HLA-DR en los linfocitos NK (**figura 8C**) no fue significativa. Por otro lado, en la búsqueda de la población $CD3^{+}CD8^{+}HLA\text{-}DR^{+}$ (**figura 8D**) la población aparece acompañada de la expresión a la baja del marcador CD8 en el microambiente leucémico, siendo significativamente mayor la población $CD3^{+}CD8^{+low}HLA\text{-}DR^{+}$ en este co-cultivo en comparación con el estroma control y el libre de estroma, y de manera correspondiente, significativamente menor la población $CD3^{+}CD8^{+high}HLA\text{-}DR^{+}$. La expresión de HLA-DR en las poblaciones de los linfocitos citotóxicos se traduce como resultado de la activación de éstas células. Debido a la expresión a la baja de CD8 en las células mononucleares co-cultivadas en el microambiente tumoral, como ya se mencionó anteriormente, el cambio en su fenotipo puede traer como consecuencia una disminución en su capacidad de reconocimiento de antígenos por la unión a moléculas tipo I del complejo principal de histocompatibilidad, pero esto no estaría interviniendo en la activación de las mismas.

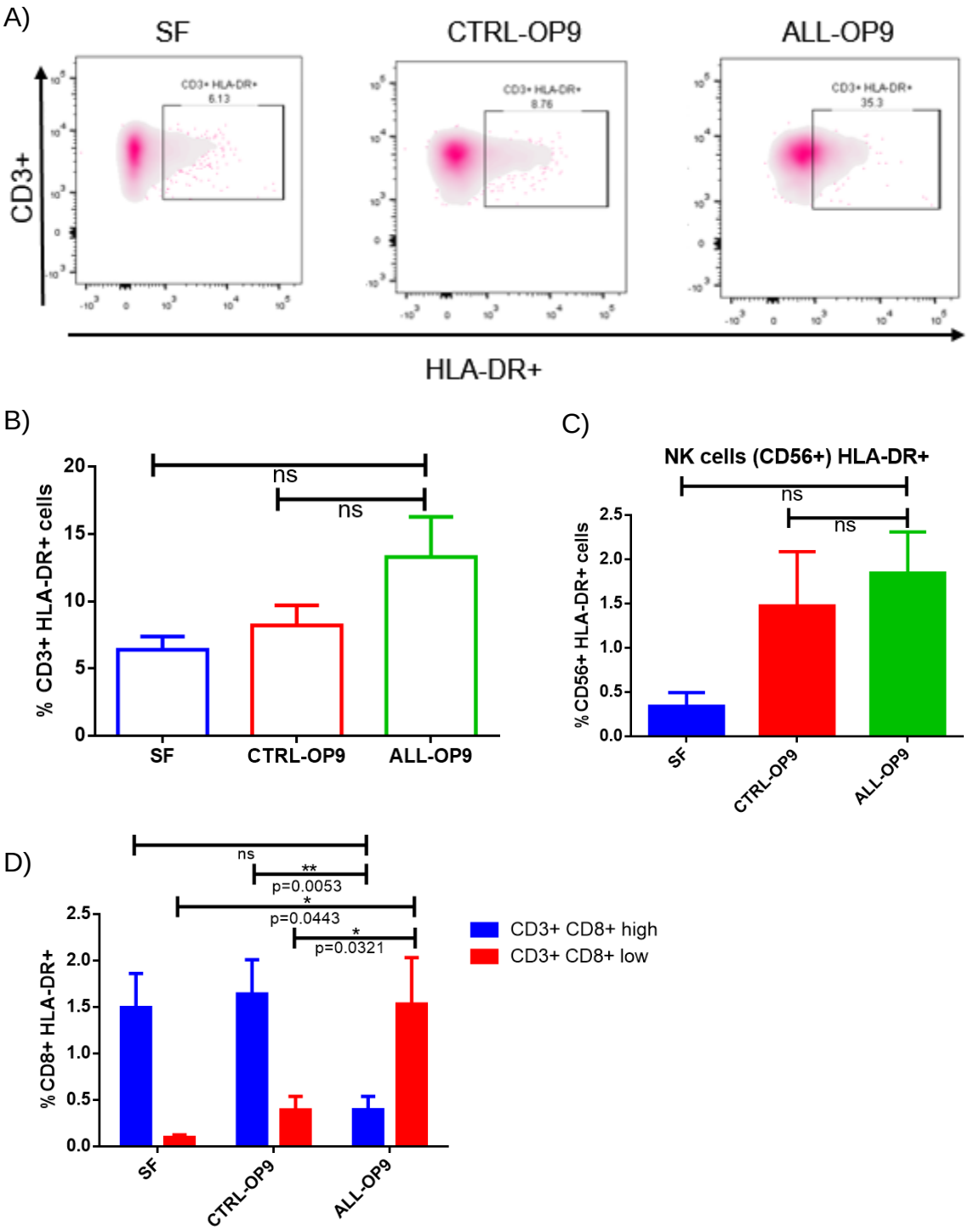

Figura 8. *Expresión de HLA-DR en linfocitos.*

Plots representativos de la expresión de HLA-DR en las células $CD3^{+}$, en los microambientes SF, CTRL y ALL (**A**). Porcentaje de células $CD3^{+}HLA\text{-}DR^{+}$ (**B**) y $CD3^{-}CD56^{+}HLA\text{-}DR^{+}$ (**C**). Expresión de HLA-DR en las poblaciones $CD3^{+}CD8^{+high\ /\ low}$ (**D**). SF, stromal free; CTRL, control; ALL, acute lymphoblastic leukemia; OP9/MS5, murine stromal cells. SF (n=3); CTRL-OP9 (n=8); ALL-OP9 (n=8). *p <0.05

El microambiente leucémico reduce la respuesta de las células de la inmunidad innata y la producción de factores importantes en la respuesta inmunitaria.

Para evaluar la respuesta inmunitaria en los diferentes microambientes, se buscó la expresión de citocinas importantes en la inmunoregulación como lo son IFN-γ y TGF-β, en diferentes poblaciones de células mononucleares, a través de citometría de flujo para su posterior análisis (**figura 9A**). Los linfocitos T no mostraron diferencias significativas entre los diferentes escenarios (**figura 9B**), caso contrario a los linfocitos NK (**figura 9C**), donde se observa diferencia significativa entre los diferentes grupos, especialmente el grupo ALL-MSC donde tenemos p=<0.0001 en comparación con los otros grupos. En los dos escenarios con estroma OP9 se observa un incremento en el porcentaje de células NK TGF-β^{+}, siendo ligeramente mayor en ALL-OP9. Esto es relevante ya que esta molécula es muy importante en la tumorigénesis, además de tener un papel inmunosupresor; se ha observado que TGF-β puede perjudicar las respuestas inmunes anticancerígenas de muchas maneras, incluyendo la inhibición inmunológica y la eliminación del complejo principal de histocompatibilidad de clase I y II (67). De forma paradójica en el escenario ALL-MSC la expresión de esta molécula es mínima en las NK, esto podría deberse a que el estroma de pacientes presenta un fenómeno más arraigado de acondicionamiento tumoral, lo que podría estar generando un fenómeno diferente, que será discutido más adelante. En el caso de IFN- γ expresado en las células de la respuesta adaptativa, tanto en los linfocitos CD8 (**figura 9D**), como en los linfocitos CD4 (**figura 9E**), la diferencia entre los grupos no es significativa, aunque se observa una tendencia a disminuir en el microambiente tumoral. Para el porcentaje de IFN- γ en células NK, se aprecia una diferencia estadísticamente significativa a la baja en el grupo ALL-MSC (**figura 9F**).

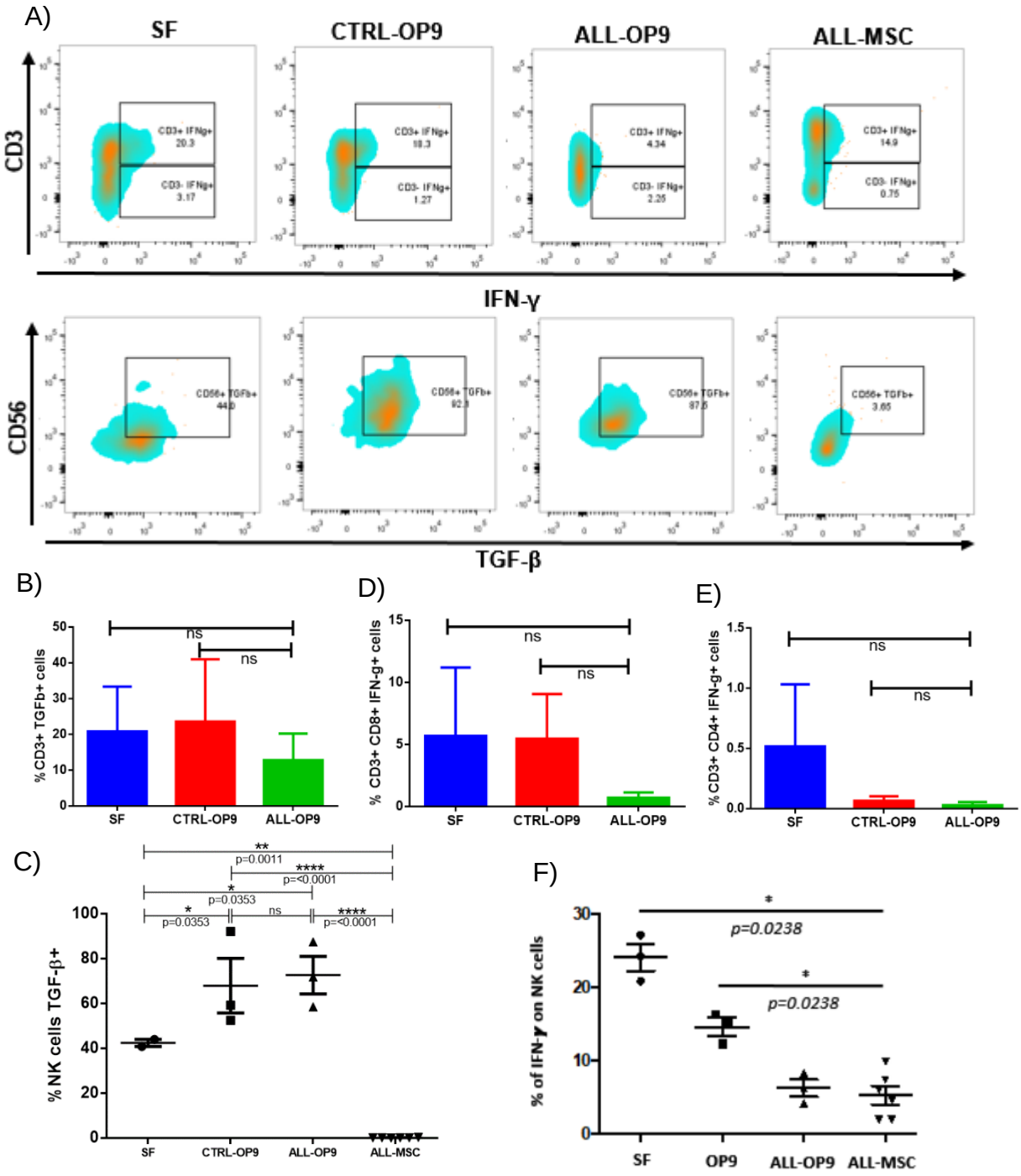

Figura 9. *Producción de TGF-β e IFN-g en las células de la respuesta inmune*

Plots representativos las células $CD3^{+}IFN\text{-}g^{+}$ y $CD3^{+}CD56^{+}TGF\text{-}\beta^{+}$ en los escenarios SF, CTRL-OP9, ALL-OP9 y ALL-MSC (**A**). Porcentaje de células $CD3^{+}TGF\text{-}\beta^{+}$ (**B**) y $CD3^{-}CD56^{+}TGF\text{-}\beta^{+}$ en los mismos escenarios (**C**). Porcentaje de células $IFN\text{-}g^{+}$, $CD3^{+}CD8^{+}$ (**D**), $CD3^{+}CD4^{+}$ (**E**) y $CD3^{-}CD56^{+}$ (**F**). SF, stromal free; CTRL, control; ALL, acute lymphoblastic leukemia; OP9, murine stromal cells; MSC, células estromales mesenquimales primarias. SF (n=2); CTRL-OP9 (n=3); ALL-OP9 (n=3); ALL-MSC (n=6). *p <0.05

La expresión de marcadores en las células estromales mesenquimales derivadas de pacientes es heterogénea, lo que podría dar paso a la generación de perfiles.

Para determinar los marcadores relacionados a través de los cuales las células estromales mesenquimales puedan estar generando los cambios observados en las células de la respuesta inmune, se hizo evaluación de la expresión de CD90, CD73, CD105, PD-1, PD-L1, FOXP3 y CXCL11 en los estromas provenientes de aspirados de MO de pacientes.

Los marcadores CD90, CD73 y CD105 son las moléculas que determinan la identificación de las MSCs según la ISCT (10). PD-1 y PD-L1 juegan un papel inmunosupresor al generar un estado de agotamiento en las células de la respuesta inmune contra el tumor. FOXP3 es un factor de transcripción característico de los linfocitos T reguladores (Tregs) necesarios para regular la homeostasis y autotolerancia, pero su expresión alterada también se ha encontrado en enfermedades autoinmunes, tumores benignos, carcinomas (68) y en la inmunidad tumoral, las Tregs están involucradas en el desarrollo tumoral y su progresión al inhibir la inmunidad antitumoral (69). En un artículo de Sundin et.al. demostraron por primera vez que las MSCs de donadores sanos expresaban FOXP3 y que era variable entre células y a través del tiempo (70). Estudios previos en nuestro laboratorio, a partir de un RNA-seq de MSCs de pacientes con LLA, determinaron que algunos de estos expresaban de manera importante CXCL11 y PD-L1 (Balandrán JC., et.al. en revisión). Todas estas moléculas han sido estudiadas en la normalidad, pero no en la LLA.

En el análisis de la Intensidad Media de Fluorescencia (MFI) de estos marcadores en las MSCs de los diferentes pacientes, se puede observar un comportamiento heterogéneo (**figura 10A**), lo que permite la creación de perfiles según la expresión de las moléculas y su correlación en las poblaciones inmunológicas de las células PBMN puestas en co-cultivo con estos estromas

A)

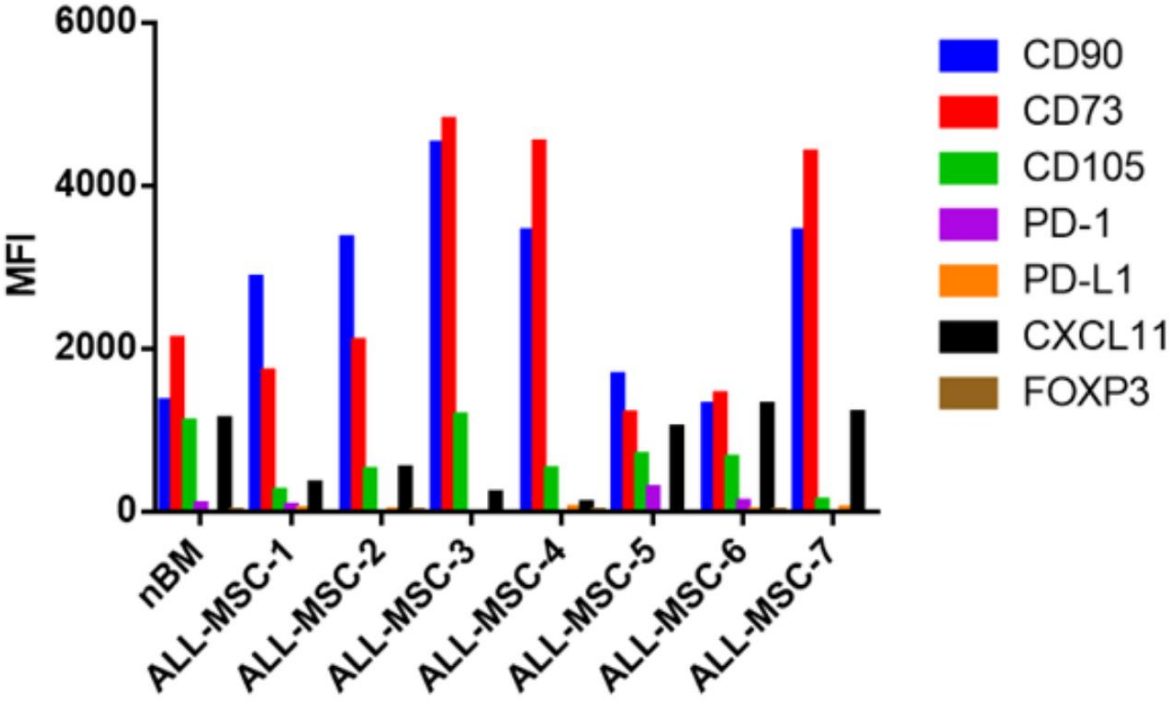

Figura 10. *Nichescore. Expresión de marcadores en las células estromales mesenquimales primarias.*

Intensidad media de fluorescencia (MFI) de 7 marcadores (CD90, CD73, CD105, PD-1, PD-L1, CXCL11 y FOXP3) expresados en células estromales mesenquimales primarias, obtenidas a partir de aspirados de médula ósea de 8 pacientes. nBM, médula ósea normal; ALL, acute lymphoblastic leukemia; MSC, células estromales mesenquimales primarias. nBM(n=1), ALL-MSC (n=7).

La expresión de marcadores en el estroma de los pacientes, está relacionado con la aparición de poblaciones inmunológicas.

Posterior a la obtención de células estromales mesenquimales a través de los aspirados de MO de los pacientes y el crecimiento del cultivo primario, se llevó cabo la siembra de co-cultivos según lo establecido en la estrategia de trabajo, con las células PBMN obtenidas de voluntarios sanos, realizando previamente, en los estromas ocupados en este estudio la evaluación de los marcadores mencionados. En el caso de CXCL11 se puede observar una clara la diferencia de expresión según el estadio de la enfermedad (**figura 11A**). Cabe aclarar que con excepción de Dx. Pro B (n=3), cada estadio corresponde a un paciente diferente. Al buscar las poblaciones inmunológicas presentes en estos estromas, pudimos observar una marcada correlación entre la aparición de LT reguladores ($CD3^+FOXP3^+CD25^-$ / $CD3^+CD25^+FOXP3^-$) y la expresión de CXCL11, pues justamente en los estadios donde se observaba un rendimiento por progenitor (*Yield per input)* menor, la expresión de CXCL11 era mayor y viceversa (**figura 11B**). Si observamos la MFI de este marcador por estroma de paciente, se distinguen dos grupos: $CXCL11^{high}$ (ALL_001-004) y $CXCL11^{low}$ (nBM, ALL_005-007) (**figura 11C**) y al clasificar las poblaciones $CD3^+FOXP3^+/CD25^+$ en estos grupos, según el estroma en el que se co-cultivaron, nuevamente se confirma que ante un estroma $CXCL11^{+high}$, la aparición de estas poblaciones reguladoras es menor en comparación al escenario $CXCL11^{+low}$, con una p=0.0163 entre las poblaciones $CD3^+CD25^+$ de ambos grupos (**figura 11D**).

La aparición de poblaciones reguladoras en los linfocitos T, no es única pues también se observó la aparición de poblaciones $PD\text{-}1^+$ en linfocitos B y células NK en ciertos estromas incluyendo la médula ósea normal (**figura 11E**), pero sin tener por el momento un marcador de las células estromales mesenquimales al cual co-relacionarlo. Sin embargo también se encontró la aparición de poblaciones $CD56^+PD\text{-}L1^+$ (**figura 11F**), teniendo un porcentaje significativamente mayor en las células puestas en co-cultivo con estromas que presentaban la mayor MFI de PD-L1 (**figura 11G**).

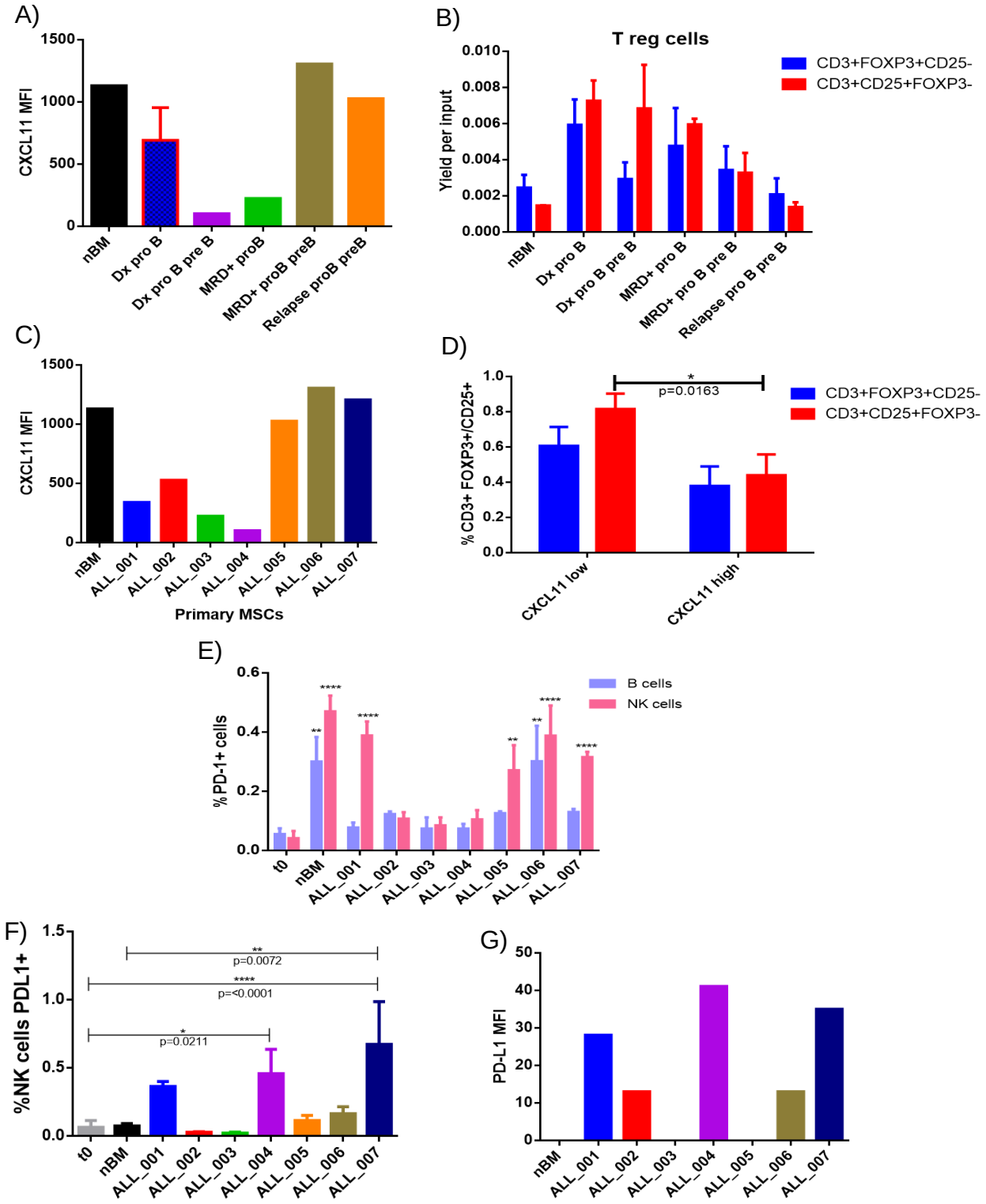

Figura 11. *Expresión de moléculas inmunomoduladoras en MSCs y PBMN*

MFI de CXCL11 en los diferentes estromas según el estadio de la enfermedad (**A**). *Yield per input* de las poblaciones $CD3^+FOXP3^+CD25^-$ y $CD3^+CD25^+FOXP3^-$ según el estadio de la enfermedad, obtenido a partir de dividir el número total de células obtenido del co-cultivo entre el número inicial sembrado (**B**). MFI de CXCL11 en los diferentes pacientes (**C**). Porcentaje de las células $CD3^+FOXP3^+CD25^-$ y $CD3^+CD25^+FOXP3^-$ de acuerdo la clasificación de los estromas $CXCL11^{high/low}$ (**D**).Porcentaje de células CD56+PD-1+, CD19+PD-1+ (**E**) y CD56+PD-L1+(**F**). MFI de PD-L1 en las pMSC (**G**). nBM, médula ósea normal; ALL, acute lymphoblastic leukemia; MSC, células estromales mesenquimales primarias; t0, antes del co-cultivo-tiempo inicial. nBM(n=1), ALL-MSC (n=7), *p <0.05.

9. Discusión

Las MSCs juegan un papel inmunomodulador en la normalidad, al actuar tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa, a través de la supresión de los linfocitos T (LT) y la maduración de las células dendríticas; reduciendo la activación y proliferación de los linfocitos B (LB), inhibiendo la proliferación y citotoxicidad de las células NK; además de promover la regeneración de Treg (10). Sin embargo, esta inmunomodulación no ha sido del todo definida en la leucemia linfoblástica aguda. Por lo observado en los resultados, podemos decir que el microambiente leucémico inducido experimentalmente mantiene la supresión en los LT, pero no así en las poblaciones LB, NK y NKT donde hay más proliferación en comparación con el microambiente normal. Aunque no se pudo llevar a cabo el ensayo con CFSE para las células mononucleares en co-cultivo con los estromas de pacientes, basándonos en las gráficas de porcentajes a partir de linfocitos totales, podemos sospechar que el comportamiento sería similar entre ALL-MSC con ALL-OP9, siendo incluso mayor la proliferación en los primeros co-cultivos. Las leucemias agudas se diseminan rápido después del comienzo, lo que impacta negativamente en la iniciación y ejecución de la inmunidad anti-leucemia (71). Los LB son los encargados de la inmunidad humoral, pero también pueden actuar como células efectoras o reguladoras. La clasificación de LB en la inmunología tumoral los divide en 4 grupos: LB activados por CD40, LB asesinos de tumores, LB infiltrantes de tumor (TIL-Bs), y células B reguladoras y en reposo. Los linfocitos B pueden eliminar las células tumorales directamente mediante mecanismos independientes de anticuerpos, como la expresión de ligandos causantes de muerte tales como Fas, TRAIL, PD-L1 y PD-L2. Los TIL-Bs son controversiales en la inmunidad antitumoral, ya que han sido asociados tanto a buenos como malos pronósticos de los pacientes; mientras que los LB reguladores (productores de IL-10) se han visto asociados al desarrollo o progresión del cáncer (72). En la leucemia linfocítica crónica, las mutaciones genéticas en LB y los receptores de LB (BCR) son factores impulsores clave junto con la evasión de LT citotóxicos y la promoción de Treg (73). Las MSCs influyen en el microambiente que rodea los precursores de LB y por lo tanto ejerce efectos locales en su desarrollo a través de citocinas y quimiocinas (74). Por su parte las células NK sirven como la primera línea de la defensa inmunitaria en

la protección del huésped contra virus y tumores. Sus funciones incluyen matar a las células blanco, producción de citocinas (sus dos principales funciones contra tumores), citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC); además de ser efectores críticos mediando citotoxicidad y reguladores de la activación y desarrollo de otros componentes de la respuesta inmune. Las NK son la única población linfocítica que produce constitutivamente TGF-β (75). Otras citocinas secretadas por estas células, son las citocinas pro-inflamatorias IL-1, IL-6, IL-12 y CXCL8 (IL-8). Una de las formas por las que las NK detectan las células tumorales o infectadas por virus es por medio de la expresión deficiente de MHC tipo I, pero se ha visto que los tumores evaden a estas células a través del incremento de MHC tipo I, MIC soluble, y la expresión FasL para incrementar las señales inhibitorias de las NK (76,77). En las malignidades hematológicas, se ha observado immunosupresión de la respuesta de las NK, llevando a tolerancia/anergia de estas células que puede evidenciarse por deficiencias cuantitativas, disminución en la expresión de receptores activadores, expresión y estimulación incrementada de receptores inhibitorios, señalización alterada de las NK y alteración en la producción de citocinas (78). Finalmente, las NKT también son consideradas como importantes actores en la inmunovigilancia tumoral. Tras su activación, son capaces de matar células directa o indirectamente; además de ser potentes inmunoreguladores, ya que pueden sesgar las respuestas inmunes tanto inflamatorias como de tolerancia rápidamente a través de la secreción de citocinas. Estas células pueden ser activadas por TCR o dependiendo del balance entre señales inhibidoras y estimuladoras (79). Las NKT se pueden dividir en tipo I y tipo II, las primeras relacionadas a la promoción de la inmunidad antitumoral, mientras que el segundo grupo suprime este tipo de inmunidad, pero ambas se regulan entre sí. También pueden promover otras células reguladoras como los Treg (80). Por todo lo anterior, la presencia de proliferación celular en estas poblaciones puede tener tanto un papel en la inmunovigilancia tumoral, como de supresión inmunitaria, pero esto será discutido más adelante, a partir de las otras características fenotípicas de estas poblaciones.

Los LT son un importante y abundante componente del microambiente inmunológico. Los linfocitos T citotóxicos ($CD8^+$) juegan un importante papel en las respuestas antitumorales inmunológicas, al inducir apoptosis a sus células blanco, además de secretar grandes cantidades de IFN-γ, que tiene un efecto inmunoestimulante. Los linfocitos T $CD4^+$ pueden diferenciarse a una variedad de células efectoras según las citocinas presentes en el microambiente; de igual manera ayudan mediando la muerte de células tumorales a través de LB, NK y LT $CD8^+$; además de poder diferenciarse a Treg (81,82). CD8 es una glicoproteína de superficie celular encontrada en los LT citotóxicos. Tiene dos formas, un homodímero (αα) y un heterodímero (αβ). La forma homodimérica está presente en diferentes células de origen linfoide como NKs, LT y linfocitos T intraepiteliales intestinales; mientras que la forma αβ se encuentra en aproximadamente del 90% de los linfocitos T citotóxicos (83). Es definido como co-receptor si se une al MHC tipo I al mismo tiempo que el TCR. Si se une al MHC independientemente del TCR es denominado molécula de adhesión. También ha sido señalada su función como inmunomodulador, ya que algunos linfocitos T intraepiteliales intestinales expresan CD8 que se une a una molécula no clásica de MHC tipo I, llamada TL (thymus leukemia antigen), independientemente de TCR/CD3 pero aun mandando señales a TCR por las mismas vías (84). La disrupción de la interacción MHC tipo I con CD8 tiene un importante impacto en la habilidad de los LT para reconocer antígenos, llegando incluso a abolir la activación de estos (83). La expresión de CD8 puede ser inhibido por IL-2, IL-4 (85) e IL-15 en LT activados. Subpoblaciones $CD8^{+low}$ han sido reportadas durante enfermedades crónicas, respuestas inmunes agudas a patógenos y líneas celulares. La regulación a la baja del CD8 puede ser dada por la reactividad de los LT a IFN de tipo I (86). Además de disminuir su actividad de co-receptor, también hay estudios que incluyen la posibilidad de que $CD8^{+low}$ sea usado como un marcador para LT CD8 polarizados tipo 2, con una actividad citolítica pobre y deficiente expresión de perforina (87). La presencia de la población $CD8^{+low}$ en los microambientes leucémicos de este proyecto hablan de un fenómeno que está siendo inducido en estos estromas. Un estudio realizado a pacientes con leucemia aguda reportó que los LT de sangre periférica liberaban IL-4, IL-10 e IFN-γ en la presencia de blastos de ALL que actúan como células accesorias

(88). Por otro lado, las MSC secretan IDO constitutivamente y su secreción incrementa por la estimulación de IFN-γ (que también es secretada por las MSCs ante ciertos estímulos (89)); la depleción constante de triptófano por medio de esta enzima, conlleva a la inhibición de la respuesta de los LT, generación de Tregs (90), además de estimular la secreción de IL-4 (91–93). De esta manera, se pretende dar una posible respuesta a la disminución en la expresión de CD8 en los LT, teniendo como posible responsable a la IL-4 que podría ser estimulada por la secreción de IDO en el estroma. Cabe mencionar que no se ha evaluado la secreción de esta interlucina en este tipo de modelo, por lo que su estudio resulta de gran interés.

El reconocimiento y eliminación de las células malignas por los LT necesita procesamiento de antígenos y su presentación a través de las moléculas MHC, pero se ha observado que en algunos tumores sólidos y hematológicos, existen defectos adquiridos en este proceso. Por ejemplo en los linfomas de células B existe una recurrente pérdida de MHC del tipo II o su regulación a la baja (71). En los resultados presentados podemos observar que si bien no existen diferencias significativas en la expresión de HLA-DR, su expresión en los linfocitos T es reflejo de su activación a través de componentes del microambiente; podemos presumir que la activación de los LT es efectiva, pero que sus propiedades efectoras están siendo modificadas, siendo reflejado en la baja expresión de CD8 en los microambientes leucémicos.

Durante las enfermedades crónicas, como infecciones virales crónicas y cáncer, los LT $CD8^+$ adquieren progresivamente un estado exhausto o disfuncional caracterizado por déficits variables en sus funciones efectoras, incluyendo citotoxicidad y la producción de citocinas proinflamatorias como IL-2, TNF-α e IFN-γ (94). IFN-γ es una parte central de la respuesta antitumoral, aunque también se ha propuesto su posible rol como promotor de la tumorigenesis. Es producido predominantemente por las células NK, NKT y LT $CD4^+$ y $CD8^+$. Entre sus funciones antitumorales se encuentran arresto del ciclo celular e inducción de la apoptosis en las células tumorales, además de inhibir la angiogénesis en los tumores. IFN-γ tiene un papel importante en el paradigma de la inmunoedición, principalmente en las fases de eliminación y equilibrio (95–97). Es crítico para el tráfico de las células T, NK y NKT en los tumores a través

de las quimiocinas de inducción CXCL9, CXCL10 y CXCL11(97). Como promotor de la inmunoevasión tumoral, IFN-γ es secretado por las células de la inmunidad antitumoral, en respuesta a cáncer inmunogénico, que a su vez induce a la inestabilidad genómica y/o a una firma de expresión génica inmunoevasiva en las células cancerígenas (PD-L1, PD-L2, CTLA-4, IDO1, etc), lo que esculpe el tumor a un inmunofenotipo que incremente su crecimiento (92). Su amplio rango de acciones depende del contexto de la especificidad tumoral, intensidad de la señal de IFN-γ y otras condiciones del microambiente (97). De manera interesante la IL-4 es uno de los reguladores negativos para IFN-γ (98), y es importante, ya que en los resultados obtenidos podemos observar una disminución significativa del porcentaje de NK IFN-γ^+ y una tendencia a disminuir en los LT $CD8^+$ y $CD4^+$, todo en los microambientes leucémicos, lo que corresponde con la aparición de las poblaciones $CD8^{+low}$. Las actividades antitumorales de las NK pueden guiar directamente a una erradicación del tumor a través de la citólisis o secreción de IFN-γ. Algunos estudios in vivo, mostraron que después de la implantación de células tumorales con MHC-I^{low}, la liberación de IFN-γ por las NK era un instrumento en la estimulación y maduración de células dendríticas (77). Al ser IFN-γ una quimiocina que estimula la acción de las células de la respuesta inmune, su expresión a la baja nos podría estar indicando una disminución en la actividad antitumoral inmunológica, pero dada su dualidad en el microambiente tumoral, será importante llevar a cabo otros experimentos que nos lleven a comprobar hacia qué lado de la balanza se está inclinando su efecto.

TGF-β es una citocina pleiotrópica y juega un papel importante en la inmunomodulación, inflamación y reparación de tejido, y puede inhibir la proliferación y citotoxicidad de los LT (75). También es una potente citocina inmunosupresora que afecta severamente la función de las NK, por lo que algunas células tumorales tienen la habilidad de enriquecer su microambiente con esta citocina. TGF-β es un regulador negativo de la producción de IFN-γ; de igual manera altera la expresión superficial de los receptores de quimiocinas CXCR3, CXCR4, CX3CR1, con un posible impacto en la migración de las NK y su reclutamiento (99). Se conoce generalmente como un regulador negativo del crecimiento, pero también promueve la proliferación de ciertas células como las MSC (100). En el cáncer, TGF-β tiene un rol dual (101,102), ya que

en los estadios tempranos opera como supresor tumoral; mientras que en los estadios tardíos soporta la invasión y metástasis al modular el sistema inmune y el microambiente tumoral. Cuando es producido por el tumor, actúa de forma autócrina para estimular las respuestas biológicas supresoras de tumores (101). Por otro lado hay estudios que muestran su acción para perjudicar las respuestas inmunológicas anticancerígenas de muchas maneras, incluyendo la inhibición de las células inmunológicas y la eliminación del complejo principal de histocompatibilidad clase I y II (67,103). Estudios previos de nuestro laboratorio indican que las células NK provenientes de pacientes leucémicos en co-cultivo con MSC derivadas de pacientes con LLA incrementan su producción de TGF-β, a diferencia de NKs provenientes de donadores sanos en co-cultivo (65). En este estudio se reafirma el hecho de que las NK provenientes de pacientes sanos en co-cultivo con 'MSC-leucémicas' no presentan expresión de TGF-β. Llama la atención que el estroma de línea celular condicionado con el sobrenadante de la línea celular leucémica (ALL-OP9) tiene un incremento de la expresión de TGF-β en las células NK, esto podría deberse a que el efecto que presenta el estroma leucémico de pacientes es más arraigado que el inducido en la línea celular. El estroma leucémico inducido experimentalmente, podría ser semejante al microambiente de una célula tumoral que empieza a remodelar el nicho, mientras que en el estroma de pacientes el cambio ya fue establecido. La inmunosupresión dada por las MSC de manera natural se debe en parte a su producción de TGF-β (15,103), pero al ser un inhibidor del crecimiento, en el escenario ALL-OP9 su incremento podría deberse a su efecto como supresor tumoral, tal como pasa en los estadios tempranos; mientras que en un tumor ya establecido (ALL-MSC), este efecto se ve inhibido, impulsando el crecimiento tumoral.

En los estudios realizados por la Dra. Boer, los co-cultivos con células de LLA y MSCs revelaron la inducción de un patrón de secreción única por paciente, generando perfiles únicos de citocina/quimiocina, sugiriendo la necesidad de enfoques paciente-específico para interrumpir el nicho leucémico (64). Las quimiocinas inducen quimiotaxis, promueven la diferenciación y multiplicación de leucocitos y causan la extravasación de tejidos. CXCL11 (quimiocina ligando de CXCR3) pertenece al eje que regula la migración de las células inmunológicas, diferenciación y activación; es

inducida por IFN-γ y su afinidad por CXCR3 es la más alta de los tres ligandos (CXCL9, CXCL10 y CXCL11) (104–106). De igual manera se puede unir a CXCR7, lo cual está asociado a invasividad y reduce la apoptosis de células tumorales. Interesantemente modelos murinos deficientes de CXCR3 manifiestan incremento en la producción de IL-4 (104). Además de ser expresado en leucocitos, páncreas, hígado, entre otros (105), también ha sido descrita su presencia en MSCs (93), lo cual ha sido comprobado en estudios previos de nuestro laboratorio (Balandrán JC., et.al. en revisión) y en el presente estudio donde además se ha observado que la expresión de esta quimiocina puede dividirse en $CXCL11^{+high}$ y $CXCL11^{+low}$ y que además esto está vinculado a la aparición de poblaciones Treg, pues entre menor es la expresión de CXCL11 mayor es la aparición de Treg ($CD3^{+}CD25^{+}$ y $CD3^{+}FOXP3^{+}$). Se conocen muchos tipos celulares inmunosupresores que son importantes en la promoción de la evasión inmunológica por parte del tumor, incluyendo los Treg. Estos linfocitos son una población de LT $CD4^{+}$ con funciones inmunosupresoras naturales que dependen de la expresión constitutiva del factor de transcripción FOXP3 y que son esenciales para el mantenimiento de la tolerancia periférica para los antígenos propios. En los tumores sólidos, la población Treg se expande y la frecuencia de estas células en el microambiente tumoral está frecuentemente correlacionada con el estadio del tumor y peor pronóstico. Interesantemente, en contraste, existe evidencia de que una mayor frecuencia de Treg puedan estar asociados a una mejora en el pronóstico en ciertos tipos de linfomas (71). Pese a que FOXP3 es el marcador de reconocimiento principal para esta subpoblación de linfocitos, es bien sabido que existe un porcentaje de Treg que son $FOXP3^{-}$, estas poblaciones pueden ser inducidas a expresar FOXP3 en presencia de TGF-β (iTregs) (107–109). Se han identificado más de 22 subpoblaciones diferentes de Tregs en humanos por citometría de flujo (90). Por su parte, la mayoría de las células Tregs pueden ser identificadas a partir de la expresión de CD25, además de que este marcador aparece posterior a la activación de los LT. Se ha observado que las células $CD4^{+}CD25^{-}FOXP3^{+}$ constituyen un reservorio periférico de Tregs diferenciadas, que se unirán al grupo CD25+ tras la expansión y/o activación homeostática (110). Una de las maneras por las que las MSC llevan a cabo su papel inmunosupresor es a través de Tregs. Se ha observado que en el co-cultivo de Tregs

y MSC hay una regulación al alza de PD-1 y elevada producción de IL-10 y TGF-β (111). Las MSCs han sido usadas como medio de soporte para el enriquecimiento de poblaciones Tregs (112). En la inmunidad tumoral, los Treg están envueltos en el desarrollo del tumor y su progresión al inhibir la inmunidad antitumoral (69), por lo que la presencia de estas poblaciones en nuestros co-cultivos con células estromales primarias es de gran relevancia para la deficiencia de la respuesta inmunológica contra el tumor, esto sin la necesidad de las células tumorales, simplemente con el nicho leucémico. Llama la atención que las MSC CXCL11^{+high} presenten menor cantidad de estas células, ya que uno de los estromas incorporados en este grupo es el de médula ósea normal, por lo que podríamos asumir que los estromas de este grupo podrían presentar un mejor pronóstico que el grupo contrario. Además de eso, la presencia de poblaciones Treg FOXP3^{-} de cierta manera comprueba el hecho de que los co-cultivos de ALL-MSC con PBMN de donadores sanos no producen TGF-β, por lo que FOXP3 no está siendo del todo inducido.

El compromiso de PD-1 con su ligando, PD-L1, conlleva a la regulación a la baja de la función de los LT efectores a través de la inhibición mediada por SHP-2 de los eventos de señalización de los TCR proximales. El eje PD-1/PD-L1 promueve el escape inmunológico en algunas malignidades hematológicas (71,113). Se ha reportado que PD-L1 no solo se expresa en células tumorales, sino también en células inmunológicas, incluyendo LT, NK y macrófagos dentro del microambiente tumoral. Sin embargo, la función y mecanismos de acción de PD-L1 en las NK se mantienen inexplorados. En líneas celulares de leucemia mieloide y en blastos de AML provenientes de pacientes se observa una regulación a la alza de PD-L1 en NKs y que su función citotóxica está incrementada en comparación con NKs PD-L1^{-} (114). PD-L1 también se expresa en células no hematopoyéticas, como células estromales (113). De igual manera se ha observado la presencia de células NK PD-1^{+} (115) circulantes en alta frecuencia en pacientes con sarcoma, mieloma múltiple y cáncer de ovario; y cuando se bloquea PD-1 se revierte su fenotipo disfuncional. En el caso de pacientes con cáncer de cabeza y cuello se vio que aquellos pacientes con una frecuencia de células NK PD-1^{+} por arriba del promedio mostraban mejor supervivencia, en comparación con aquellos que tenían una frecuencia por debajo del promedio (116).

En los co-cultivos realizados podemos apreciar la presencia tanto de células NK PD-1^+ como de PD-$L1^+$, estas últimas teniendo una aparente relación con la expresión de PD-L1 en las MSC de pacientes. Será importante medir en futuros experimentos la capacidad citotóxica de las NK en estos microambientes y con la expresión de estos marcadores.

Por los resultados obtenidos podemos decir que un acercamiento personalizado al estadio de la enfermedad de cada paciente, enfocándonos en el microambiente tumoral y su efecto en la educación de las células de la respuesta inmune, abrirá nuevas áreas de oportunidad en la búsqueda de terapias, además de permitir la clasificación de los pacientes acorde a los marcadores que están expresando.

10. Conclusiones

El presente modelo de microambiente tumoral es una herramienta de gran utilidad para determinar los efectos inmunomoduladores que tienen las células estromales mesenquimales (MSC) en la “re-educación” de las células de la respuesta inmune, dentro de un contexto leucémico. Confirmamos de forma experimental que los productos solubles de las células de leucemia linfoblástica aguda modifican las propiedades del estroma de la médula ósea comparables con aquellas MSC derivadas de pacientes. Gracias a esto podemos aproximarnos a la generación de perfiles estromales en los pacientes (nichescore), acorde al complejo microambiental tumoral generado a causa de la leucemia, por medio de los marcadores expresados en las MSC y las células inmunológicas, como resultado de la interacción de ambos tipos celulares y sus productos, tal y como ocurre en los nichos de la médula ósea (**figura 12**).

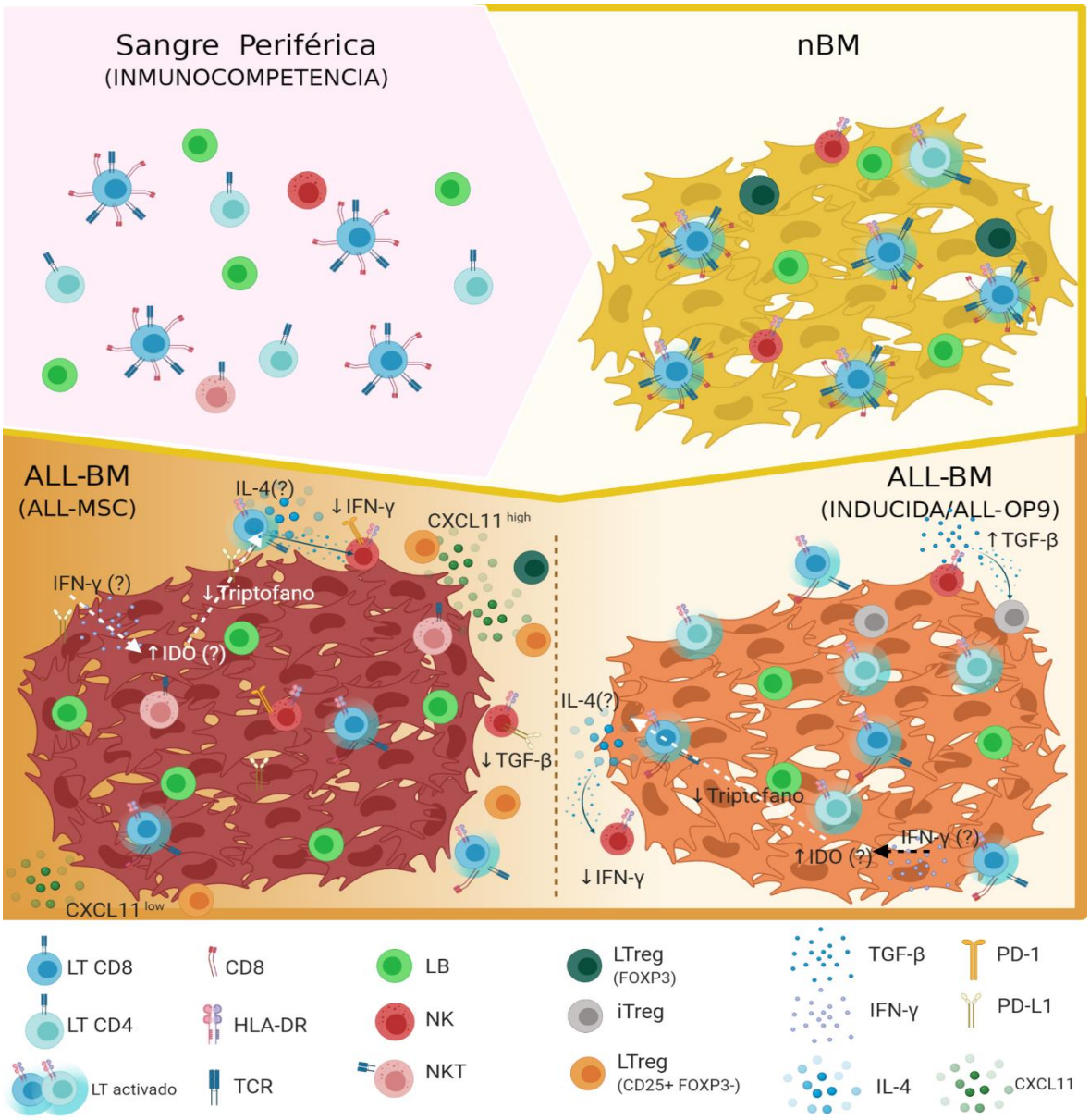

Figura 12. *Modelo concluyente.* Los LT, LB, células NK y NKT son una pieza fundamental de la respuesta antitumoral, pero sus propiedades se ven modificadas en el microambiente dado por la médula ósea, tendiendo principalmente a la inmunosupresión. Cuando este nicho se ve modificado por un insulto (en este caso, la presencia de blastos leucémicos o sus productos solubles), estas células presentarán cambios en su inmunofenotipo, tales como la desregulación de CD8 en LT, la aparición de marcadores de agotamiento celular como PD-1 y PD-L1 en las NK; la presencia de poblaciones reguladoras como LT FOXP3+/CD25+ relacionada con la expresión de quimiocinas como CXCL11 y la desregulación de citocinas con un importante papel inmunomodulador (TGF-β e IFN-γ). Dentro de la médula ósea, los nichos de las MSCs ejercerán propiedades inmunomoduladoras dependiendo del estado de salud (normal vs leucémico). En el nicho leucémico a su vez podemos observar diferencias acordes al estadio de la enfermedad. En un estadio inicial, se observan cambios relacionados a la remodelación del nicho como la aparición de poblaciones disfuncionales ($CD8^{+low}$) y el intento de contrarrestar el tumor, a través de la secreción de citocinas como TGF-β, que a su vez modifican el nicho alterando la expresión de CXCR4, disminuyendo la respuesta inmunológica por la aparición de Tregs y la disminución de IFN-γ. Una vez establecida la enfermedad, permanecen las poblaciones disfuncionales, pero disminuye drásticamente la secreción de TGF-β, promoviendo el crecimiento tumoral y la posible secreción de IFN-γ en las MSC, induciendo indirectamente la secreción de citocinas como IL-4, que generan las poblaciones $CD8^{+low}$ y la inhibición de IFN-γ en las células inmunitarias. De igual manera, en nichos leucémicos establecidos se encuentra la expresión de marcadores como CXCL11, que podría servir como marcador de pronóstico, debido a que una disminución en su expresión correlaciona con la aparición de Tregs.

11. Bibliografía

1. Flores-figueroa E, Pelayo R. Hematopoyesis Cancerología 2. Lab Hematop y Células Troncales, Unidad Investig Médica en Enfermedades Oncológicas Cent Médico Nac Siglo XXI, IMSS. 2009;2:95–107.

2. Chávez-González MA, Chimal-Monroy J, Flores-Figueroa E, Lamas M. Células Troncales, biología y aplicaciones en biomedicina. Ciudad de México; 2017.

3. Pelayo R, Balandrán JC, Ruiz-Argüelles A. Ontogenia de la inmunidad [Internet]. La Medicina es Así. 2018. Available from: https://www.asieslamedicina.org.mx/ontogenia-de-la-inmunidad/

4. Pinho S, Frenette PS. Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche. Nat Rev Mol Cell Biol [Internet]. 2019;20(5):303–20. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/s41580-019-0103-9

5. Szade K, Gulati GS, Chan CKF, Kao KS, Miyanishi M, Marjon KD, et al. Where Hematopoietic Stem Cells Live: The Bone Marrow Niche. Antioxidants Redox Signal. 2018;29(2):191–204.

6. Ding L, Morrison SJ. Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. Nature [Internet]. 2013;495(7440):231–5. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/nature11885

7. Nombela-Arrieta C, Pivarnik G, Winkel B, Canty KJ, Harley B, Mahoney JE, et al. Quantitative imaging of haematopoietic stem and progenitor cell localization and hypoxic status in the bone marrow microenvironment. Nat Cell Biol [Internet]. 2013;15(5):533–43. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/ncb2730

8. Krstic J, Herrmann M, Gadjanski I, Mojsilovic S. Editorial: Microenvironment-derived stem cell plasticity. Front Cell Dev Biol. 2017;5(SEP):1–2.

9. Aponte PM, Caicedo A. Stemness in cancer: Stem cells, cancer stem cells, and their microenvironment. Stem Cells Int. 2017;2017.

10. Keating A. Mesenchymal stromal cells: New directions. Cell Stem Cell [Internet]. 2012;10(6):709–16. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2012.05.015

11. Lourdes Mora-García M, García-Rocha R, Morales-Ramírez O, Montesinos JJ, Weiss-Steider B, Hernández-Montes J, et al. Mesenchymal stromal cells derived from cervical cancer produce high amounts of adenosine to suppress cytotoxic T lymphocyte functions. J Transl Med. 2016;14(1):1–14.

12. Sai B, Dai Y, Fan S, Wang F, Wang L, Li Z, et al. Cancer-educated mesenchymal stem cells promote the survival of cancer cells at primary and distant metastatic sites via the expansion of bone marrow-derived-PMN-MDSCs. Cell Death Dis [Internet].

2019;10(12):1–13. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/s41419-019-2149-1

13. Xu L, Liu Y, Sun Y, Wang B, Xiong Y, Lin W, et al. Tissue source determines the differentiation potentials of mesenchymal stem cells: A comparative study of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. Stem Cell Res Ther. 2017;8(1):1–12.

14. Dostert G, Mesure B, Menu P, Velot É. How Do Mesenchymal Stem Cells Influence or Are Influenced by Microenvironment through Extracellular Vesicles Communication? Front Cell Dev Biol. 2017;5(February):1–7.

15. Kudo-Saito C. Cancer-associated mesenchymal stem cells aggravate tumor progression. Front Cell Dev Biol. 2015;3(APR):1–6.

16. 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 [Internet]. 2015;363(2):156–65. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2015.04.012

17. Nagasawa T. CXCL12/SDF-1 and CXCR4. Front Immunol. 2015;6(JUN):10–2.

18. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. Immunity. 2004;21(2):137–48.

19. Lussier DM, Schreiber RD, Louis S. TUMOR IMMUNOLOGY Cancer Immunosurveillance : Immunoediting [Internet]. Vol. 4, Encyclopedia of Immunobiology. Elsevier; 2016. 396–405 p. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-374279-7.17001-8

20. OMS. Cáncer [Internet]. 2018. Available from: https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer

21. Catherine Sánchez DN, Veterinario M, en Ciencias Biomédicas D. Conociendo Y Comprendiendo La Célula Cancerosa: Fisiopatología Del Cáncer Knowing and Understanding the Cancer Cell: Physiopathology of Cancer. Rev Médica Clínica Las Condes. 2013;24:553–62.

22. Vahidian F, Duijf PHG, Safarzadeh E, Derakhshani A, Baghbanzadeh A, Baradaran B. Interactions between cancer stem cells, immune system and some environmental components: Friends or foes? Immunol Lett [Internet]. 2019;208(December 2018):19–29. Available from: https://doi.org/10.1016/j.imlet.2019.03.004

23. 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.

24. American Cancer Society. ¿Qué es el cáncer?

25. CeNSIA. Cáncer Infantil en México Te presentamos datos epidemiológicos del Cáncer en la. 2019;1–10. Available from: https://www.gob.mx/salud%7Ccensia/articulos/cancer-infantil-en-mexico-130956

26. Muñoz-Pérez MJ, Casco S, Soto-Vega E. Distribución del cáncer infantil en el Estado de Puebla. Gac Mex Oncol. 2017;16(3):162–6.

27. Jaime-Pérez JC, Gómez-Almaguer D. Hematología. La sangre y sus enfermedades. 2009.

28. Cevallos-Barrera E. Fundamentos de Oncología. 2006.

29. Quiroz E, Aldoss I, Pullarkat V, Rego E, Marcucci G, Douer D. The emerging story of acute lymphoblastic leukemia among the Latin American population – biological and clinical implications. Blood Rev [Internet]. 2019;33:98–105. Available from: https://doi.org/10.1016/j.blre.2018.08.002

30. Gómez-Almaguer D, Marcos-Ramírez ER, Montaño-Figueroa EH, Ruiz-Argüelles GJ, Best-Aguilera CR, López-Sánchez M del C, et al. Acute Leukemia Characteristics are Different Around the World: the Mexican Perspective. Clin Lymphoma, Myeloma Leuk [Internet]. 2017;17(1):46–51. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.clml.2016.09.003

31. Rivera-Luna R, Velasco-Hidalgo L, Zapata-Tarrés M, Cárdenas-Cardos R, Aguilar-Ortiz MR. Current outlook of childhood cancer epidemiology in a middle-income country under a public health insurance program. Pediatr Hematol Oncol. 2017;34(1):43–50.

32. Terreros E, DeLeón R, Sánchez E, Aguilar L, Guzmán L, Martínez C. Guía de Práctica Clínica de Diagnóstico y Tratamiento de Leucemia Linfoblástica Aguda, México. Cenetec [Internet]. 2009;1–42. Available from: http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/142_GPC_LEUCEMIA_LINFOBLASTICA/Imss_ER.pdf

33. Arriaga-Pizano L, Ramírez-Ramírez D, Prieto-Chávez J, Pelayo R, Ruiz-Argüelles A. Reporte de la primera reunión nacional de consenso para la inmunofenotipificación de leucemias agudas. Gac Med Mex. 2019;155(1):20–9.

34. Chiaretti S, Zini G, Bassan R. Diagnosis and subclassification of acute lymphoblastic leukemia. Mediterr J Hematol Infect Dis. 2014;6(1).

35. Greaves M. A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia. Nature Reviews Cancer. 2018;

36. Guzman ML, Allan JN. Concise review: Leukemia stem cells in personalized medicine. Stem Cells. 2014;

37. le Viseur C, Hotfilder M, Bomken S, Wilson K, R??ttgers S, Schrauder AAAA, et al. In Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia, Blasts at Different Stages of Immunophenotypic Maturation Have Stem Cell Properties. Cancer Cell. 2008;14(1):47–58.

38. Elder A, Bomken S, Wilson I, Blair HJ, Cockell S, Ponthan F, et al. Abundant and equipotent founder cells establish and maintain acute lymphoblastic leukaemia. Leukemia [Internet]. 2017;31(12):2577–86. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/leu.2017.140

39. Rehe K, Wilson K, Bomken S, Williamson D, Irving J, den Boer ML, et al. Acute B lymphoblastic leukaemia-propagating cells are present at high frequency in diverse lymphoblast populations. EMBO Mol Med. 2013 Jan;5(1):38–51.

40. Givan AL. Principles of flow cytometry: An overview. Methods Cell Biol. 2001;63(63):19–50.

41. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. Crit Rev Biotechnol. 2017;37(2):163–76.

42. Su-Yau M, Mullins JM. Conjugation of Fluorochromes to Antibodies. In: Methods in Molecular Biology [Internet]. 2010. p. 63–6. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-59745-324-0

43. Villegas Valverde CA, Torres López G, Morejón Morales A, Arango Prado M del C. Diseño de un panel de citometría de flujo para muestras de sangre, ascitis y tejido ovárico. Rev Cuba Hematol Inmunol y Hemoter. 2019;35(4):1–19.

44. Mateus J, Lasso P, González JM, Puerta CJ, Cuéllar A. Design of a multicolor panel to assess intracellular and surface molecules by flow cytometry | Diseño de un panel multicolor para evaluar moléculas intracelulares y de superficie mediante citometría de flujo. Biomedica. 2013;33(4):660–72.

45. Béné MC, Nebe T, Bettelheim P, Buldini B, Bumbea H, Kern W, et al. Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: A consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10. Leukemia. 2011;25(4):567–74.

46. Balandrán JC, Vadillo E, Dozal D, Reyes-López 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(8):629–43.

47. Ingangi V, Minopoli M, Ragone C, Motti ML, Carriero MV. Role of microenvironment on the fate of disseminating cancer stem cells. Front Oncol. 2019;9(FEB):1–8.

48. Birbrair A, editor. Tumor Microenvironment. 1st ed. Vol. 1259, Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer International Publishing; 2020. x,175.

49. Raaijmakers MHGP. Niche contributions to oncogenesis: Emerging concepts and implications for the hematopoietic system. Haematologica. 2011;96(7):1041–8.

50. Pal D, Blair HJ, Elder A, Dormon K, Rennie KJ, Coleman DJL, et al. Long-term in vitro maintenance of clonal abundance and leukaemia-initiating potential in acute lymphoblastic leukaemia. Leukemia. 2016;30(8):1691–700.

51. Hohtari H, Brück O, Blom S, Turkki R, Sinisalo M, Kovanen PE, et al. Immune cell constitution in bone marrow microenvironment predicts outcome in adult ALL. Leukemia [Internet]. 2019;33(7):1570–82. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/s41375-018-0360-1

52. Lima DS, Lemes RPG, Matos DM. Immunosuppressive monocytes (CD14+/HLA-DRlow/-) increase in childhood precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia after induction chemotherapy. Med Oncol [Internet]. 2018;35(3):36. Available from: https://doi.org/10.1007/s12032-018-1092-9

53. Duarte D, Hawkins ED, Lo Celso C. The interplay of leukemia cells and the bone marrow microenvironment. Blood. 2018;131(14):1507–11.

54. Lasfar A, Balan M, Cohen-solal KA, Zloza A. Editorial : Tumor Microenvironment and Resistance to Current Therapies. 2019;9(November):1–3.

55. Portale F, Cricrì G, Bresolin S, Lupi M, Gaspari S, Silvestri D, et al. ActivinA: a new leukemia-promoting factor conferring migratory advantage to B-cell precursor-acute lymphoblastic leukemic cells. Haematologica. 2019;104(3):533–45.

56. Mougiakakos D. The Induction of a Permissive Environment to Promote T Cell Immune Evasion in Acute Myeloid Leukemia : The Metabolic Perspective. 2019;9(November):1–9.

57. Lee GY, Jeong SY, Lee HR, Oh IH. Age-related differences in the bone marrow stem cell niche generate specialized microenvironments for the distinct regulation of normal hematopoietic and leukemia stem cells. Sci Rep. 2019;9(1):1–12.

58. Vilchis-Ordoñez A, Contreras-Quiroz A, Vadillo E, Dorantes-Acosta E, Reyes-López A, Quintela-Nuñez Del Prado HM, et al. Bone marrow cells in acute lymphoblastic leukemia create a proinflammatory microenvironment influencing normal hematopoietic differentiation fates. Biomed Res Int. 2015;2015.

59. 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. 2017;7(JAN).

60. Enciso J, Mayani H, Mendoza L, Pelayo R. Modeling the pro-inflammatory tumor microenvironment in acute lymphoblastic leukemia predicts a breakdown of hematopoietic-mesenchymal communication networks. Front Physiol. 2016;7(AUG):1–15.

61. Cordeiro Gomes A, Hara T, Lim VY, Herndler-Brandstetter D, Nevius E, Sugiyama T, et al. Hematopoietic Stem Cell Niches Produce Lineage-Instructive Signals to Control Multipotent Progenitor Differentiation. Immunity. 2016;45(6):1219–31.

62. Hirata Y, Furuhashi K, Ishii H, Li HW, Pinho S, Ding L, et al. CD150 high Bone Marrow Tregs Maintain Hematopoietic Stem Cell Quiescence and Immune Privilege via Adenosine. Cell Stem Cell. 2018;

63. Chiarini F, Lonetti A, Evangelisti C, Buontempo F, Orsini E, Evangelisti C, et al. Advances in understanding the acute lymphoblastic leukemia bone marrow microenvironment: From biology to therapeutic targeting. Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res [Internet]. 2016;1863(3):449–63. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.08.015

64. De Rooij B, Polak R, Van Den Berk LCJ, Stalpers F, Pieters R, Den Boer ML. Acute lymphoblastic leukemia cells create a leukemic niche without affecting the CXCR4/CXCL12 axis. Haematologica. 2017.

65. Ramírez-Ramírez D, Padilla-Castañeda S, Galán-Enríquez CS, Vadillo E, Prieto-Chávez JL, Jiménez-Hernández E, et al. CRTAM + NK cells endowed with suppressor properties arise in leukemic bone marrow. J Leukoc Biol. 2019;105(5):999–1013.

66. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. Inmunología celular y molecular. Octava. España; 2015. 537 p.

67. Liu S, Chen S, Zeng JUN. TGF - β signaling : A complex role in tumorigenesis (Review). 2018;699–704.

68. Szylberg A, Karbownik D, Marszaek A. The role of FOXP3 in human cancers. Anticancer Res. 2016;36(8):3789–94.

69. Ohue Y, Nishikawa H. Regulatory T (Treg) cells in cancer: Can Treg cells be a new therapeutic target? Cancer Sci. 2019;110(7):2080–9.

70. Sundin M, D´Arcy P, Johansson CC, Barrett AJ, Lönnies H, Sundberg B, et al. Multipotent mesenchymal stromal cells express FoxP3: a marker for the immunosuppressive capacity? J Immunother [Internet]. 2011;34(4):336–42. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4157637/

71. Curran EK, Godfrey J, Kline J. Mechanisms of Immune Tolerance in Leukemia and Lymphoma. Trends Immunol. 2017;38(7):513–25.

72. E Goret N, C Goret C, Topal U, F Ozkan O. A review of B lymphocytes in tumour immune response. J Stem Cell Res Med. 2019;4(1):1–3.

73. Haseeb M, Anwar MA, Choi S. Molecular interactions between innate and adaptive immune cells in chronic lymphocytic leukemia and their therapeutic implications. Front Immunol. 2018;9(NOV):1–16.

74. Aribi M. Introductory Chapter: B-Cells. In: Normal and Malignant B-Cell [Internet]. IntechOpen; 2020. p. 38. Available from: https://www.intechopen.com/books/normal-and-malignant-b-cell/introductory-chapter-b-cells

75. Jiang Y, Yang M, Sun X, Chen X, Ma M, Yin X, et al. IL-10+ NK and TGF-β+ NK cells play negative regulatory roles in HIV infection. BMC Infect Dis. 2018;18(1):1–10.

76. Sabry M, Lowdell MW. NK Cells and Cancer. In: Natural Killer Cells [Internet]. InTech; 2017. p. 38. Available from: http://www.intechopen.com/books/natural-killer-cells/nk-cells-and-cancer

77. Waldhauer I, Steinle A. NK cells and cancer immunosurveillance. Oncogene. 2008;27(45):5932–43.

78. Gross E, Sunwoo JB, Bui JD. Cancer immunosurveillance and immunoediting by natural

killer cells. Cancer J (United States). 2013;19(6):483–9.

79. Krijgsman D, Hokland M, Kuppen PJK. The role of natural killer T cells in cancer-A phenotypical and functional approach. Front Immunol. 2018;9(FEB).

80. Terabe M, Berzofsky JA. Tissue-specific roles of NKT cells in tumor immunity. Front Immunol. 2018;9(AUG):1–11.

81. Lamble AJ, Lind EF. Targeting the immune microenvironment in acute myeloid leukemia: A focus on T cell immunity. Front Oncol. 2018;8(JUN):1–13.

82. Wood KL. Dysregulation of CD8+ lymphocyte apoptosis, chronic disease, and immune regulation. Front Biosci. 2009;Volume(14):3771.

83. Cole DK, Laugel B, Clement M, Price DA, Wooldridge L, Sewell AK. The molecular determinants of CD8 co-receptor function. Immunology. 2012;137(2):139–48.

84. Cole DK, Gao GF. CD8 : Adhesion Molecule , Co-Receptor and Immuno-Modulator. 2004;(2).

85. Kienzle N, Baz A, Kelso A. Profiling the CD8low phenotype, an alternative career choice for CD8 T cells during primary differentiation. Immunol Cell Biol. 2004;82(1):75–83.

86. Xiao Z, Mescher MF, Jameson SC. Detuning CD8 T cells: Down-regulation of CD8 expression, tetramer binding, and response during CTL activation. J Exp Med. 2007;204(11):2667–77.

87. Kienzle N, Olver S, Buttigieg K, Groves P, Janas ML, Baz A, et al. Progressive Differentiation and Commitment of CD8 + T Cells to a Poorly Cytolytic CD8 low Phenotype in the Presence of IL-4 . J Immunol. 2005;174(4):2021–9.

88. Park HH, Kim M, Lee BH, Lim J, Kim Y, Lee EJ, et al. Intracellular IL-4, IL-10, and IFN-γ levels of leukemic cells and bone marrow T cells in acute leukemia. Ann Clin Lab Sci. 2006;36(1):7–15.

89. Prockop DJ, Youn Oh J. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): Role as guardians of inflammation. Mol Ther [Internet]. 2012;20(1):14–20. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/mt.2011.211

90. Negi N, Griffin MD. Effects of mesenchymal stromal cells on regulatory T cells: Current understanding and clinical relevance. Stem Cells. 2020;38(5):596–605.

91. Weiss ARR, Dahlke MH. Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells (MSCs): Mechanisms of action of living, apoptotic, and dead MSCs. Front Immunol. 2019;10(JUN):1–10.

92. Keating A. How Do Mesenchymal Stromal Cells Suppress T Cells? Cell Stem Cell. 2008;2(2):106–8.

93. Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, et al. Mesenchymal Stem Cell-Mediated Immunosuppression Occurs via Concerted Action of Chemokines and Nitric

Oxide. Cell Stem Cell. 2008;2(2):141–50.

94. Wang C, Singer M, Anderson AC. Molecular Dissection of CD8+ T-Cell Dysfunction. Trends Immunol [Internet]. 2017;38(8):567–76. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2017.05.008

95. Zaidi MR. The Interferon-Gamma Paradox in Cancer. J Interf Cytokine Res. 2019;39(1):30–8.

96. Mojic M, Takeda K, Hayakawa Y. The dark side of IFN-γ: Its role in promoting cancer immunoevasion. Int J Mol Sci. 2018;19(1):1–13.

97. Castro F, Cardoso AP, Gonçalves RM, Serre K, Oliveira MJ. Interferon-gamma at the crossroads of tumor immune surveillance or evasion. Front Immunol. 2018;9(MAY):1–19.

98. Bhat MY, Solanki HS, Advani J, Khan AA, Keshava Prasad TS, Gowda H, et al. Comprehensive network map of interferon gamma signaling. J Cell Commun Signal. 2018;12(4):745–51.

99. Regis S, Dondero A, Caliendo F, Bottino C, Castriconi R. NK Cell Function Regulation by TGF-β-Induced Epigenetic Mechanisms. Front Immunol. 2020;11(February):1–7.

100. Slattery K, Gardiner CM. NK Cell Metabolism and TGFβ – Implications for Immunotherapy. Front Immunol. 2019;10(December):1–14.

101. Syed V. TGF-β Signaling in Cancer. J Cell Biochem. 2016;117(6):1279–87.

102. Joan Massagué. TGFβ in Cancer. Cell. 2008;134(2):215–230.

103. Otegbeye F, Ojo E, Moreton S, Mackowski N, Lee DA, De Lima M, et al. Inhibiting TGF-beta signaling preserves the function of highly activated, in vitro expanded natural killer cells in AML and colon cancer models. PLoS One. 2018;13(1):1–13.

104. Tokunaga R, Zhang W, Naseem M, Puccini A, Berger MD, Soni S, et al. CXCL9, CXCL10, CXCL11/CXCR3 axis for immune activation – A target for novel cancer therapy. Cancer Treat Rev [Internet]. 2018;63:40–7. Available from: https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2017.11.007

105. Nazari A, Ahmadi Z, Hassanshahi G, Abbasifard M, Taghipour Z, Falahati-Pour SK, et al. Effective treatments for bladder cancer affecting CXCL9/CXCL10/CXCL11/ CXCR3 axis: A review. Oman Med J. 2020;35(2).

106. Metzemaekers M, Vanheule V, Janssens R, Struyf S, Proost P. Overview of the mechanisms that may contribute to the non-redundant activities of interferon-inducible CXC chemokine receptor 3 ligands. Front Immunol. 2018;8(JAN).

107. Shevach EM, Thornton AM. tTregs, pTregs, and iTregs: similarities and differences. Immunol Rev [Internet]. 2014 May;259(1):88–102. Available from: http://doi.wiley.com/10.1111/imr.12160

108. Kanamori M, Nakatsukasa H, Okada M, Lu Q, Yoshimura A. Induced Regulatory T Cells: Their Development, Stability, and Applications. Trends Immunol [Internet]. 2016;37(11):803–11. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2016.08.012

109. Schmidt A, Éliás S, Joshi RN, Tegnér J. In vitro differentiation of human CD4+FOXP3+ induced regulatory T cells (iTregs) from naïve CD4+ T cells using a TGF-β-containing protocol. J Vis Exp. 2016;2016(118):1–10.

110. Zelenay S, Lopes-Carvalho T, Caramalho I, Moraes-Fontes MF, Rebelo M, Demengeot J. Foxp3+ CD25- CD4 T cells constitute a reservoir of committed regulatory cells that regain CD25 expression upon homeostatic expansion. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(11):4091–6.

111. Yan Z, Zhuansun Y, Chen R, Li J, Ran P. Immunomodulation of mesenchymal stromal cells on regulatory T cells and its possible mechanism. Exp Cell Res [Internet]. 2014;324(1):65–74. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.03.013

112. Azevedo RI, Minskaia E, Fernandes-Platzgummer A, Vieira AIS, da Silva CL, Cabral JMS, et al. Mesenchymal stromal cells induce regulatory T cells via epigenetic conversion of human conventional CD4 T cells in vitro. Stem Cells. 2020;38(8):1007–19.

113. Ai L, Xu A, Xu J. Roles of PD-1/PD-L1 Pathway: Signaling, Cancer, and Beyond [Internet]. Vol. 1248, Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer Singapore; 2020. 33–59 p. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/978-981-15-3266-5_3

114. Dong W, Wu X, Ma S, Wang Y, Nalin AP, Zhu Z, et al. The mechanism of anti–pd-l1 antibody efficacy against pd-l1–negative tumors identifies nk cells expressing pd-l1 as a cytolytic effector. Cancer Discov. 2019;9(10):1422–37.

115. Pesce S, Greppi M, Grossi F, Del Zotto G, Moretta L, Sivori S, et al. PD/1-PD-Ls checkpoint: Insight on the potential role of NK cells. Front Immunol. 2019;10(JUN):1–8.

116. Concha-Benavente F, Kansy B, Moskovitz J, Moy J, Chandran U, Ferris RL. PD-L1 Mediates Dysfunction in Activated PD-1 + NK Cells in Head and Neck Cancer Patients. Cancer Immunol Res [Internet]. 2018 Dec;6(12):1548–60. Available from: http://cancerimmunolres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/2326-6066.CIR-18-0062

12. Anexos

12.1. Definiciones operacionales

La inmunomodulación de las células estromales mesenquimales en la leucemia linfoblástica aguda será evaluada a través de dos factores: la estratificación de las células estromales mesenquimales primarias de acuerdo con su fenotipo y poblaciones celulares inmunológicas generadas en un microambiente tumoral inducido experimentalmente. Se empleará la citometría de flujo como método de medición, específicamente la expresión de marcadores celulares. Esto será expresado a través de números de células positivas al marcador, porcentajes celulares e intensidad media de fluorescencia.

12.2. Definiciones conceptuales

Inmunomodulación de las células estromales mesenquimales en la leucemia linfoblástica aguda: Son las modificaciones en el sistema inmunitario causadas por la secreción de sustancias que activan o debilitan su función por las células estromales mesenquimales, mientras estas se encuentran en un microambiente tumoral dado por la leucemia linfoblástica aguda.

12.3. Descripción de las técnicas de medición de las variables relevantes

La citometría de flujo es un sistema que sirve para detectar y después analizar las señales de luz generadas por partículas mientras pasan por una corriente líquida atravesada por un haz de luz (40). Analiza múltiples características físicas de cada célula individualmente, tales como tamaño y granularidad; además de brindar información de aspectos bioquímicos, biofísicos y moleculares de las mismas.

12.4. Formatos de captura de datos

Depth	Name	Statistic	#Cells
	MSC_Muestra 1 (fecha)		
>	Singlets		
> >	Lymphocytes		
> > >	???		
> > > >	B cells		
> > > > >	B regs		
> > > > >	PD-1 +		
> > > > >	PD-L1 +		
> > > >	NK cells		
> > > > >	NK regs		
> > > > >	PD-1 +		
> > > > >	PD-L1 +		
> > >	NKT		
> > > >	NKT regs		
> > > >	PD-1 +		
> > > >	PD-L1 +		
> > > > >	PD-L1 + high		
> > > > >	PD-L1 + low		
> > >	T cells		
> > > >	PD-1 +		
> > > >	PD-L1 +		
> > > >	Treg cells		
> > > >	Treg cells FOXP3		

Fecha	Siglas	Nombre	Sexo	Edad	**Procedencia**	Tipo de muestra	Estadio clínico	Leucos/ul	Plasma

12.5. Formatos de consentimiento informado

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN
Y POLITICAS DE SALUD
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD

Carta de consentimiento informado para participación en protocolos de investigación (padres o representantes legales de niños)

Nombre del estudio:	**"Papel inmunomodulador de las células estromales mesenquimales en la leucemia linfoblástica aguda"**
Patrocinador externo (si aplica)*:	No Aplica
Lugar y fecha:	
Número de registro institucional:	
Justificación y objetivo del estudio:	Estamos invitando a su hijo(a) a participar en un protocolo de investigación que consiste en evaluar el papel inmunomodulador de las células estromales mesenquimales en un microambiente tumoral. Al contar su hijo(a) con diagnóstico de leucemia aguda y ser candidato a trasplante hematopoyético, cumple los requisitos para incluirlo en el estudio.
Procedimientos:	Las muestras de los aspirados de médula ósea obtenidas con la finalidad de establecer el diagnóstico patológico o la respuesta al tratamiento se desechan tras haber realizado las pruebas necesarias. En este estudio solicitamos su consentimiento para que la muestra residual, posterior a todas las pruebas hospitalarias solicitadas por su médico, sea aprovechada para realizar otras pruebas de investigación biomédica. Además, permitirnos analizar los datos clínicos y estudios de laboratorio registrados en su resumen clínico.
Posibles riesgos y molestias:	Los riesgos más frecuentes asociados al procedimiento o intervención quirúrgica incluyen dolor, inflamación, infección y lesión vascular. Sin embargo, no habrá riesgos adicionales a los que se podrían presentar en la intervención asociados a esta investigación, ya que la muestra proviene del aspirado realizado para el diagnóstico o el seguimiento de la respuesta al tratamiento. Para garantizar la seguridad del paciente, la toma de muestra se efectuará por personal sanitario capacitado y bajo condiciones de seguridad y de asepsia rigurosa.
Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio:	La participación de su hijo(a) en el estudio no tendrá ningún beneficio inmediato para él/ella, sin embargo, será importante ya que su muestra ayudará en la investigación para mejorar las condiciones del trasplante.
Información sobre resultados y alternativas de tratamiento:	La muestra biológica recolectada sólo cumplirá funciones en investigación y no busca cumplir objetivos de alternativas de tratamiento en la enfermedad actual del paciente.
Participación o retiro:	La participación de su hijo(a) en este estudio es completamente voluntaria y podrá retirarse del mismo en el momento que lo desee sin que esto afecte la atención que recibe del Instituto.
Privacidad y confidencialidad:	La información será resguardada de manera confidencial para garantizar su privacidad. Su nombre permanecerá oculto durante el análisis de los resultados, así como durante las presentaciones, conferencias o publicaciones que pudieran surgir de la misma.

Declaración de consentimiento:

Después de heber leído y habiéndoseme explicado todas mis dudas acerca de este estudio:

☐ Si acepto que mi familiar o representado participe y que se tome la muestra solo para este estudio.

☐ Si acepto que mi familiar o representado participe y que se tome la muestra para este estudios y estudios futuros, conservando su muestra hasta por 10 años tras lo cual se destruirá la misma.

En caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podrá dirigirse a:

Investigadora o Investigador Responsable:	Dra. Rosana Pelayo Camacho. Investigadora Titular D. Laboratorio de Oncoinmunología. Centro de Investigación Biomédica de Oriente, IMSS, Puebla. Teléfono: (244) 444-0122 y (244) 444-1173. Correo: rosana.pelayo.c@gmail.com
Colaboradores:	Dra. Uendy Pérez Lozano. Médico adscrito al Servicio de Hematología. Unidad Médica de Alta Especialidad Hospital de Especialidades Manuel Ávila Camacho, IMSS Puebla. Teléfono: 222-156-3144. Correo: dra_uendy@yahoo.com.mx

En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante podrá dirigirse a: Comité de Ética de Investigación en Salud del CNIC del IMSS: Avenida Cuauhtémoc 330 4° piso Bloque "B" de la Unidad de Congresos, Colonia Doctores. México, D.F., CP 06720. Teléfono (55) 56 27 69 00 extensión 21230, correo electrónico: comité.eticainv@imss.gob.mx

Si durante su participación en el estudio, identifica o percibe alguna sensación molesta, dolor, irritación, alteración en la piel o evento que suceda como consecuencia de la toma o aplicación del tratamiento, podrá dirigirse a: Área de Farmacovigilancia, al teléfono (55) 56276900, ext. 21222, correo electrónico: iris.contreras@imss.gob.mx

Nombre y firma de ambos padres o tutores o representante legal	Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento
Testigo 1	Testigo 2
Nombre, dirección, relación y firma	Nombre, dirección, relación y firma

2 de 2

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN
Y POLITICAS DE SALUD
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD

Carta de asentimiento en menores de edad
(8 a 17 años)

Nombre del estudio: **"Papel inmunomodulador de las células estromales mesenquimales en la leucemia linfoblástica aguda".**
Número de registro institucional: _____

Objetivo del estudio y procedimientos
Estamos invitándote a participar en un protocolo de investigación que consiste en evaluar el papel inmunomodulador de las células estromales mesenquimales en un microambiente. Las muestras de los aspirados de médula ósea obtenidas con la finalidad de establecer el diagnóstico o la respuesta al tratamiento se desechan tras haber realizado las pruebas necesarias. En este estudio solicitamos tu consentimiento para que la muestra residual, posterior a todas las pruebas hospitalarias solicitadas por tu médico, sea aprovechada para realizar otras pruebas de investigación. Así como, permitirnos analizar los datos clínicos y estudios de laboratorio registrados en tu resumen clínico.

Hola, mi nombre es _____ y trabajo en el Instituto Mexicano del Seguro Social. Actualmente estamos realizando un estudio para conocer la capacidad que tienen las células progenitoras hematopoyéticas de reconstituir la médula ósea de pacientes con leucemias agudas y para ello queremos pedirte que nos apoyes.

Tu participación en el estudio consistiría en permitir la conservación y almacenamiento de las muestras residuales de aspirados de médula ósea que el personal de salud obtiene para realizar las pruebas diagnósticas o dar seguimiento de la respuesta al tratamiento, así como la revisión de tu resumen clínico.

Tu participación en el estudio es voluntaria, es decir, aun cuando tu papá o mamá hayan dicho que puedes participar, si tú no quieres hacerlo puedes decir que no. Es tu decisión si participas o no en el estudio. También es importante que sepas que, si en un momento dado ya no quieres continuar en el estudio, no habrá ningún problema, o si no quieres responder a alguna pregunta en particular, tampoco habrá problema.

Esta información será confidencial. Esto quiere decir que no diremos a nadie tus respuestas o resultados sin que tú lo autorices, solo lo sabrán las personas que forman parte del equipo de este estudio.

Si aceptas participar, te pido que por favor pongas una **(x)** en el cuadrito de abajo que dice "Sí quiero participar" y escribe tu nombre. Si **no** quieres participar, déjalo en blanco.

☐ Si quiero participar

Nombre: _____

Nombre y firma de la persona que obtiene el asentimiento: _____

Fecha: _____

12.6. Tabla de clasificación de las MSC provenientes de pacientes

Código de identificación	Estadio de la enfermedad	Inmunofenotipo	Edad (años)	Sexo
nBM	-	-	60	F
ALL_001	Diagnóstico (Dx.)	ProB	25	M
ALL_002	Diagnóstico (Dx.)	ProB	4	F
ALL_003	MRD	ProB	13	F
ALL_004	Diagnóstico (Dx.)	ProB/PreB	13	F
ALL_005	Recaída	ProB/PreB	13	M
ALL_007	Diagnóstico (Dx.)	ProB	15	M