



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla



Instituto de Fisiología

**Laboratorio de Oncoinmunología y Citómica
del Cáncer Infantil**

CIBIOR, IMSS



**“Uso del nichescore para la generación de
perfiles predictores en leucemia linfoblástica
aguda pediátrica por citometría de masas”**



Tesis para obtener el grado de:
Maestra en Ciencias Fisiológicas

Presenta:

Lic. Biom. Gabriela Rocío Zamora Herrera

Director:

**Dr. Eduardo
Monjaraz Guzmán**

Co-Directora:

**Dra. Rosana
Pelayo**

Asesores:

**Dra. Aida Josefina Ortega Cambranis
Dr. Martín Pérez Santos**



Puebla, Mayo de 2024

Índice

1.	Resumen	6
2.	Introducción	7
3.	Antecedentes	8
3.1.	Antecedentes generales	8
3.1.1.	Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) Pediátrica: Contexto y Diagnóstico	8
3.1.1.1.	Definición y tipos de LLA pediátrica	8
3.1.1.2.	Epidemiología y prevalencia de la LLA en población pediátrica	11
3.1.1.3.	Importancia del diagnóstico y pronóstico en LLA pediátrica	13
3.1.1.4.	Proyecto Nacional de Investigación e Incidencia (PRONAI) de Leucemia	13
3.2.	Antecedentes específicos	15
3.2.1.	Hematopoyesis y el nicho hematopoyético	15
3.2.1.1.	La hematopoyesis en la médula ósea	15
3.2.1.2.	Nicho hematopoyético: papel y relevancia	19
3.2.1.3.	Células Estromales Mesenquimales, pieza clave del nicho hematopoyético	23
3.2.2.	Microambiente tumoral en LLA	25
3.2.2.1.	Células leucémicas, nicho leucémico y el sistema inmune	25
3.2.2.2.	Características e impacto del microambiente tumoral en LLA	30
3.2.3.	Herramientas y pruebas diagnósticas y pronósticas en cáncer	35
3.2.3.1.	El estándar de oro para el diagnóstico de la leucemia: la citometría de flujo	35
3.2.3.2.	La citometría de masas	39
3.2.3.3.	Desarrollo de pruebas pronósticas en el cáncer	42
4.	Planteamiento del problema	45
5.	Hipótesis científica	45
6.	Objetivos	46
6.1.	Objetivo General	46
6.2.	Objetivos Particulares	46
7.	Material y métodos	47
7.1.	Diseño del estudio	47

7.2.	Ubicación espacio-temporal.....	47
7.3.	Estrategia de trabajo.....	48
7.4.	Muestreo	50
7.4.1.	Definición de la unidad de población	50
7.4.2.	Selección de la muestra	50
7.4.3.	Criterios de selección de las unidades de muestreo	50
7.4.3.1.	Criterios de inclusión	50
7.4.3.2.	Criterios de exclusión	51
7.4.3.3.	Criterios de eliminación	51
7.4.4.	Diseño y tipo de muestreo.....	51
7.4.5.	Tamaño de la muestra	51
7.5.	Definición de las variables y escalas de medición.....	51
7.6.	Método de recolección de datos.....	52
7.7.	Técnicas y procedimientos	53
7.8.	Análisis de datos	65
7.9.	Diseño estadístico.....	65
7.9.1.	Hipótesis estadística	65
7.9.2.	Pruebas estadísticas	65
8.	Resultados.....	67
9.	Discusión	84
10.	Conclusiones	93
11.	Bibliografía.....	95
12.	Anexos.....	112
12.1.	Formatos de consentimiento informado	112

Agradecimientos

El segundo capítulo en mi vida académica inició antes de este maravilloso proyecto y se vio marcado por el paso de una pandemia que nos marcó de diversas maneras. Agradezco la oportunidad de haber estado en las filas del personal de salud que quiso contribuir a cambiar el rumbo de la enfermedad, pero sobre todo agradezco a la ciencia que nos mostró como puede salvar vidas con sus avances y conocimiento. Aprendí como nunca la importancia de la resiliencia y la disciplina.

Gracias a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y al Instituto de Fisiología, piezas claves de mi formación académica, mi alma mater. A las y los profesores investigadores que con su conocimiento han instruido mi camino. Mi particular agradecimiento a mi director de tesis, Dr. Eduardo Monjaraz, quien creyó en mi persona y en este proyecto. Muchas gracias por su apoyo Doctor. De igual manera agradezco a mis asesores, Dra. Aida Ortega Cambranis y Dr. Martín Pérez Santos, quienes se tomaron tiempo y dedicación para brindarme sus valiosos comentarios y sugerencias. A mis amigos y compañeros de la Maestría en Ciencias Fisiológicas.

Agradezco infinitamente a mi nicho, el Laboratorio de Oncoinmunología y Citomica del Cáncer Infantil, mi familia académica. Dra. Ros las palabras no alcanzan para agradecer todo lo que ha hecho en mí. Creyó que yo podía ser parte del proyecto más relevante en la historia de la leucemia en nuestro país y me ha dado alas para volar y aprender, incluso en los lugares más inesperados, recónditos y maravillosos de nuestro planeta. Porque no sólo aprendo de su capacidad académica sino también de su bondad y valores humanos. Muchas gracias por su apoyo y cariño. Rubí y Ana, la pandemia nos reunió y BTS nos unió. Gracias por escucharme, aconsejarme y cuidar de mí. Por ser mis amigas. Por todas las mañanas y tardes en la carretera y por las noches de chismes y llantos. Dal, muchas gracias por las aventuras compartidas y las pláticas profundas, por el conocimiento brindado y la discusión de ideas, tu acompañamiento ha sido muy importante en este proyecto. Diana, gracias por tu apoyo y amistad, por guiar el acervo celular y al equipo que lo conforma (Pedro, Liz y Eli), sin ustedes muchos de los experimentos no hubieran sido posibles. Jio, soy muy afortunada de ser tu amiga, gracias por tu compañía durante todos estos años en el laboratorio y la universidad. A nuestro miembro honorario, Alfonso, por las palabras de aliento y apoyo en las aventuras del laboratorio. Gracias a todos y cada uno de los miembros del lab, los cuales son piezas importantes en todo este proyecto y que estoy orgullosa de llamar amigos.

Mamá y papá, saben que los amo y nada de esto sería posible sin ustedes, son mi fortaleza y ejemplo a seguir, gracias por cuidar de nosotras y velar nuestros sueños. Marian, mi sunshinesito, te quiero hermanita, gracias por ser fuerte y resiliente por ser mi confidente y fuente de inspiración, por estar conmigo entre lágrimas y risas, por seguir aprendiendo a ver las tonalidades de la vida, por ser valiente y vivir tus aventuras a pesar de tener miedo, porque como lo dijo Ned Stark, es la única manera de ser valientes. Gracias por todo tu apoyo y amor.

A toda mi familia, muchas gracias por siempre cuidar de mí y acompañarme en las aventuras. Los quiero.

A mi chico abeja, Pedro, muchas gracias por enseñarme algunas de las cosas más bonitas de la vida. Por acompañarme en los desvelos y largos experimentos, ahí estuviste incluso cuando el cansancio era demasiado. Por siempre cuidar de mí y aventurarte conmigo.

Un especial agradecimiento a la Dra. Kara Davis y su equipo en la universidad de Stanford, quienes me acogieron y enseñaron sobre citometría de masas. Sus enseñanzas fueron indispensables para la implementación de la tecnología en nuestro país.

A Danny Lozano, por su apoyo y maravillosa amistad en mis aventuras por Stanford. Su compañía fue un regalo en medio de lo desconocido.

Este proyecto es por y para los niños, niñas y adolescentes con leucemia en nuestro país. Son nuestra inspiración y muestra de valor y fuerza. Mi reconocimiento y gratitud a CONAHCYT y al Instituto Mexicano del Seguro Social, gracias a su financiamiento este proyecto pudo ser realizado.

“Agradece a la llama su luz, pero no olvides el pie del candil que, constante y paciente, la sostiene en la sombra.”- Rabindranath Tagore.

1. Resumen

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es la neoplasia maligna más común en la infancia, caracterizada por la proliferación descontrolada de linfoblastos en la médula ósea y otros tejidos linfoides. A pesar de los grandes avances en el tratamiento, un porcentaje significativo de pacientes sufre recaídas, las cuales están directamente relacionadas a desenlaces fatales de la enfermedad, lo que subraya la necesidad de desarrollar herramientas predictivas precisas que puedan guiar la terapia y mejorar los resultados clínicos.

Este proyecto se centra en la implementación de una nueva herramienta pronóstica para la leucemia pediátrica, basada en paneles de citometría de flujo y de masas que permitan evaluar el microambiente leucémico desde una perspectiva global denominada "Nichescore" con la interacción de más de 60 marcadores, una herramienta innovadora que permita la generación de perfiles predictores de respuesta al tratamiento y progresión de la enfermedad LLA pediátrica. El Nichescore evalúa la interacción entre las células leucémicas y su microambiente, proporcionando un análisis detallado de las características inmunológicas y del nicho celular que pueden influir en el comportamiento de la enfermedad.

El uso del "Nichescore" tiene el potencial de proponer nuevas estratificaciones de riesgo de los pacientes con LLA pediátrica al proporcionar un panorama completo de la enfermedad de cada paciente y su asociación con el riesgo de mala respuesta al tratamiento y el futuro riesgo de recaída. Esta innovación podría mejorar significativamente los resultados de los pacientes al permitir una toma de decisiones terapéuticas más informada, además de proponer nuevos blancos terapéuticos enfocados en el microambiente, ampliando su impacto en la oncología pediátrica y más allá.

2. Introducción

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es la primera causa de muerte por enfermedad en la edad pediátrica. A diferencia de los países de altos ingresos donde la sobrevivencia de los pacientes pediátricos con leucemia aguda es mayor al 90%, la sobrevivencia en países con bajos y medianos ingresos, como México y en general América Latina, es muy baja (Muñoz-Aguirre P et al., 2020). La vulnerabilidad para morir por esta enfermedad incrementa de 4-7 veces debido a las altas tasas de recaída temprana. Hoy en día no es posible distinguir un perfil característico entre los niños que recaen de aquellos que alcanzan la remisión. Aún con el uso de pruebas pronósticas como la Enfermedad Medible Residual (EMR) y de tratamientos basados en quimioterapia homologada, los casos de recaída son crecientes y muy tempranos, así como los desenlaces fatales. Para realizar una adecuada clasificación del riesgo de la enfermedad y establecer un plan personalizado de tratamiento, es indispensable proveer al paciente de un diagnóstico preciso. A pesar de que la EMR es una importante herramienta para la toma de decisiones terapéuticas, al identificar los casos que requieren intensificación del tratamiento, no provee de información sobre los efectos de la terapia en el microambiente de la médula ósea (MO) y su posible relación con la reemergencia de la enfermedad. Se ha sugerido que la generación de perfiles de Células Estromales Mesenquimales y otras células estromales de la médula ósea asociadas a tratamiento pueden ser poderosas herramientas pronósticas, en conjunto con la evaluación de EMR para pacientes con LLA-B (Oliveira et al., 2022).

Existe una necesidad impostergable de nuevas herramientas que ayuden a predecir el riesgo antes del re-establecimiento de clonas malignas en EMR. Debido a que el microambiente tumoral dentro del nicho leucémico es un factor primordial en la efectividad del tratamiento y pronóstico de los pacientes con tumores, la generación de perfiles pronósticos basados en el contexto inmunológico, el tumor y las CEM permitiría identificar aquellos pacientes cuyas características microambientales sean un sustrato fértil para el crecimiento y progresión de nuevo tumor y por lo tanto, a presentar EMR detectable.

3. Antecedentes

3.1. Antecedentes generales

3.1.1. Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) Pediátrica: Contexto y Diagnóstico

3.1.1.1. Definición y tipos de LLA pediátrica

El primer caso de leucemia fue documentado por John Bennett en 1845, identificando signos como la hipertrofia del bazo e hígado, junto con la presencia de células sanguíneas anormales. Sin embargo, fue Rudolph Virchow quien introdujo el término "leucemia". En 1850, Henry Fuller realizó la primera descripción de la leucemia en niños. Posteriormente, en 1872, Neumann identificó la leucemia como una enfermedad primaria de la médula ósea. La denominación "leucemia" deriva de la raíz griega que significa "sangre blanca", refiriéndose a la apariencia de los vasos sanguíneos llenos de una sustancia similar al pus en los primeros casos registrados (Jaime-Pérez & Gómez-Almaguer, 2009).

La leucemia se caracteriza por la proliferación descontrolada de células hematopoyéticas malignas, lo que conlleva a una acumulación progresiva de estas células y la consecuente disminución en la producción de elementos sanguíneos normales. Esta enfermedad se divide en dos grupos principales acorde a su agresividad, conocidos como leucemia aguda y leucemia crónica. Estos grupos, a su vez, se subdividen en leucemia linfoide y mieloide, dependiendo del linaje afectado. Los subtipos más comunes incluyen la Leucemia Mieloide Aguda (LMA), Leucemia Mielocítica Crónica (LMC), Leucemia Linfocítica Crónica (LLC) y Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA). Además, se pueden identificar subtipos adicionales utilizando criterios morfológicos, citoquímicos, inmunológicos y citogenéticos para caracterizar las células malignas en cada caso (Cevallos-Barrera, 2006).

LMA, LMC y LLC son las menos comunes en latinos en comparación con personas blancas y de color no latinas. Sin embargo, la LLA tiene una mayor incidencia en la población latina, incluyendo los peores pronósticos (Gómez-Almaguer et al., 2017; Quiroz et al., 2019).

La leucemia aguda se define por la proliferación neoplásica de cualquier célula del tejido hematopoyético, que puede resultar, sin el tratamiento adecuado, en la muerte del paciente en un corto periodo de tiempo (Jaime-Pérez & Gómez-Almaguer, 2009). Dentro de las leucemias agudas, encontramos la LLA, nombrada así por la acumulación de células inmaduras anormales de origen linfoide (linfoblastos), que presentan una proliferación descontrolada, invadiendo la médula ósea y bloqueando la hematopoyesis normal (Terreros et al., 2009). La LLA es la enfermedad maligna más frecuente en la edad pediátrica, representando el 76% de todos los casos de leucemia en menores de 15 años y aproximadamente el 30% de todos los cánceres pediátricos. La etiología de las leucemias agudas no es conocida con precisión por ser multifactorial (Jaime-Pérez & Gómez-Almaguer, 2009). 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 compresión mediastinal.

La población hispana presenta una mayor incidencia de casos con consecuencias desfavorables en comparación con otros grupos étnicos. Aunque las tasas de supervivencia han aumentado en los últimos años gracias al desarrollo de tratamientos más efectivos, existen factores que contribuyen significativamente a un peor pronóstico de la enfermedad, tales como un diagnóstico tardío, resistencia a la quimioterapia, infiltración de tejidos fuera de la médula ósea, presencia de enfermedad residual, y las recaídas. Por lo tanto, la búsqueda y aplicación de nuevas estrategias de tratamiento y pronóstico se convierten en una prioridad en el ámbito de la salud (Arriaga-Pizano et al., 2019; Terreros et al., 2009).

La LLA se presenta en al menos tres variantes morfológicas distintas: L-1, L-2 y L-3. Estas categorías se diferencian en términos de tamaño celular, grado de maduración del núcleo, presencia de nucléolos y vacuolas (Cevallos-Barrera, 2006; Jaime-Pérez & Gómez-Almaguer, 2009). Sin embargo, el diagnóstico basado únicamente en características morfológicas puede ser subjetivo y dar lugar a interpretaciones

variables. Por ello, en la hematología moderna, la clasificación de las leucemias linfoblásticas se basa no solo en criterios morfológicos, sino también en características inmunofenotípicas y genéticas.

Según la Organización Mundial de la Salud, las neoplasias linfoides se dividen en dos categorías principales: neoplasias derivadas de precursores linfoides de linaje B y T, y neoplasias derivadas de células maduras B, T o NK. La LLA pertenece 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 linaje T. Dado que no es posible distinguir morfológicamente entre la LLA de linaje B y T, el inmunofenotipo, determinado mediante citometría de flujo, es el método estándar para el diagnóstico de esta enfermedad (Chiaretti et al., 2014).

El inmunofenotipo permite determinar 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 (Terreros et al., 2009).

El grupo EGIL (European Group for the Immunological Characterization of Leukemias) propuso el sistema de clasificación de leucemias agudas basado en la expresión de marcadores de diferenciación de los blastos. De acuerdo con este sistema, las leucemias agudas se clasifican como LMA y LLA, donde esta última subdivide en LLA-B o LLA-T, y leucemia aguda bifenotípica (Mejía-Aranguré, 2016). Nuestro grupo ha propuesto una subestratificación adicional del grupo de LLA-B basada en la expresión de marcadores mediante citometría de flujo en las células blásticas, identificando subgrupos como Pro-B (CD34+CD10+CD19+), Pre-B (CD34-CD10+CD19+) o una combinación de ambos precursores (Pro-B-Pre-B)(Balandrán et al., 2016).

3.1.1.2. Epidemiología y prevalencia de la LLA en población pediátrica

En 2015 la prevalencia de leucemia en México entre la población infantil con cáncer fue de 59.4%, con una incidencia de 79.8 casos de LLA por cada millón de niños (Rivera-Luna et al., 2017).

El cáncer representa una de las principales causas de morbimortalidad en niños y adolescentes a nivel mundial, con aproximadamente 200,000 casos diagnosticados en este grupo etario. En países de bajos y medianos ingresos, la tasa de supervivencia es de tan solo 20%, debido a la carencia de un diagnóstico preciso y oportuno, un poco o nulo acceso a los tratamientos, abandono del tratamiento, defunciones por toxicidad y exceso de recidivas. En México, la tasa de incidencia de cáncer en niños y adolescentes hasta el 2017 fue de 89.6 casos por millón, siendo los más comunes las leucemias (48%), los linfomas (12%) y los 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 del 57%, en marcado contraste con el 90% de supervivencia observado en países de altos ingresos (CeNSIA, 2019).

El cáncer pediátrico representa 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 la leucemia (52%), los linfomas y neoplasias reticuloendoteliales (12%) y las neoplasias de células germinales (9%) (Muñoz-Pérez et al., 2017).

Se prevé que para 2030 incrementará la mortalidad por leucemia en 2030, incluyendo México. Nuestro país presenta una de las más altas tasas de incidencia y mortalidad a nivel mundial (**Figura 1**). Las recaídas y muertes tempranas (durante el primer año de tratamiento) por la enfermedad son tres veces más frecuentes que en países de altos ingresos, a pesar de usar los mismos regímenes de tratamiento, indicando que otros factores pueden estar involucrados, incluyendo factores ambientales y socioeconómicos. Particularmente, Puebla, Oaxaca y Tlaxcala presentan una alta incidencia de leucemia pediátrica con tasas de entre 96.7 – 173.2 casos por millón. Es relevante considerar que una importante parte de la población (aproximadamente 61.1%) de estos estados vive en pobreza, frecuencia más alta que el promedio nacional de 36.3% (Flores-Lujano et al., 2024).

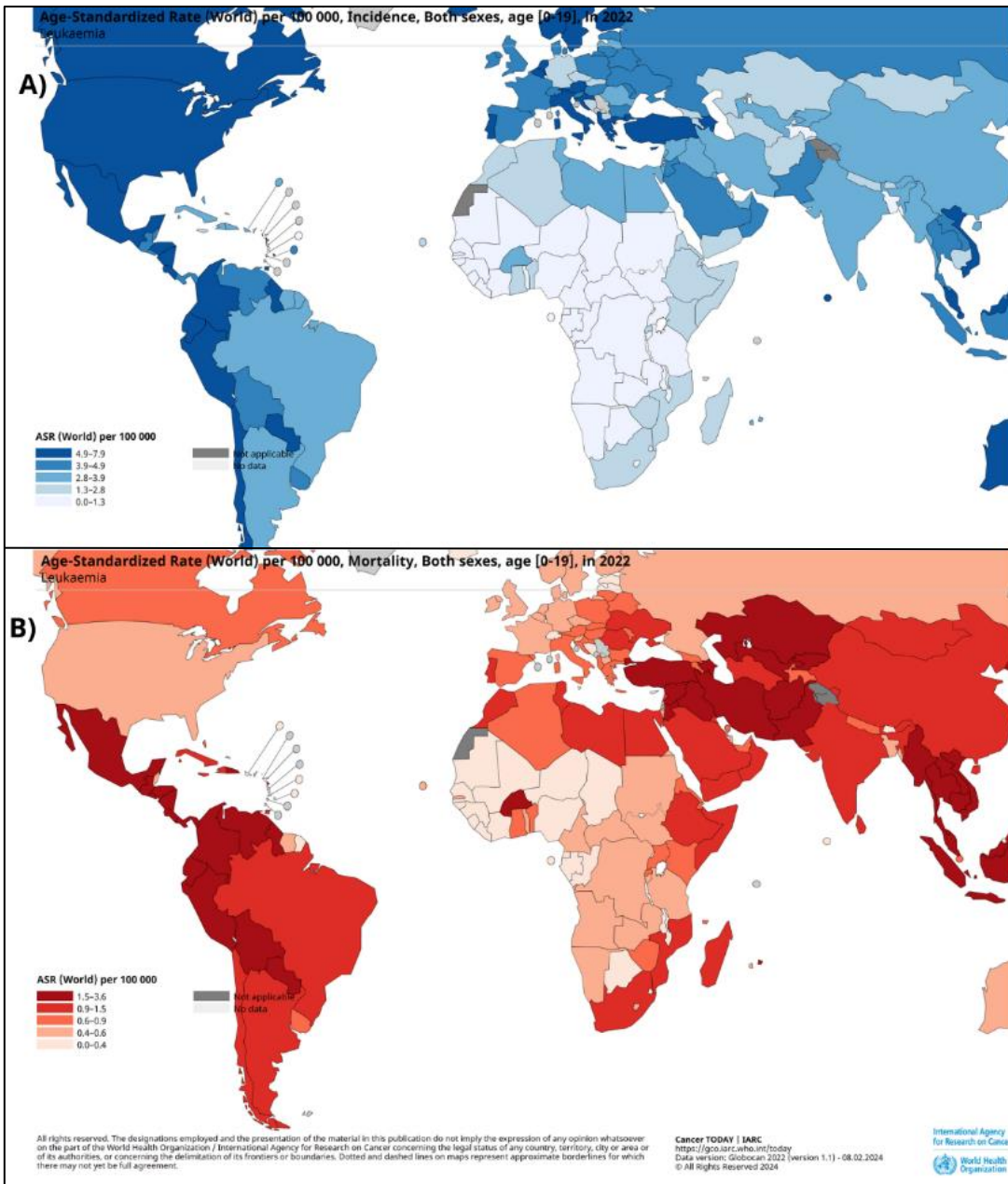


Figura 1. Incidencia y mortalidad mundial de la leucemia. México presenta de las más altas tasas de incidencia y mortalidad a nivel mundial. Mapa de calor representando las tasas por edad estandarizada (ASR) de incidencia (A) y mortalidad (B) a nivel mundial por cada 100,000 individuos de 0-19 años, de ambos sexos en 2022 acorde al Observatorio Global de Cáncer (Globocan) (IARC, 2022).

3.1.1.3. Importancia del diagnóstico y pronóstico en LLA pediátrica

Años atrás, el término cáncer era asociado con el envejecimiento, sin embargo, cada vez gana más terreno como enfermedad del desarrollo, con altas incidencias y un creciente número de casos de mal pronóstico en países de bajos y medianos ingresos, donde vive el 90% de la población infantil mundial (Zapata-Tarrés et al., 2021). Se pronostica que para 2025 cuatro quintas partes de los 20 millones de nuevos casos de cáncer estimados, así como el 84.1% de los casos de cáncer pediátrico se encontrarán en estas regiones. De mayor preocupación, es la estimación de riesgo de muerte por cáncer infantil al menos 4 veces mayor que en países desarrollados. En México la incidencia de cáncer infantil es una de las más altas a nivel mundial, especialmente en el grupo de edad de 0-4 años y con las tasas de mortalidad más altas en el grupo de 15-19 años (Zapata-Tarrés et al., 2021). Como se mencionó previamente el principal tipo de cáncer infantil es la leucemia; 54% de los pacientes son clasificados de alto riesgo en el diagnóstico y muestran baja respuesta al tratamiento, con eventos de recaída muy temprana (dentro de los primeros 18 meses de tratamiento), 3 veces más que en otras regiones. Solamente el 17% de los casos al diagnóstico muestran rearrreglos genéticos asociados al pronóstico, lo que limita la estratificación de los pacientes para opciones de tratamiento. En países de bajos y medianos ingresos, el estatus socioeconómico, origen étnico, contexto ambiental y estilo de vida, contribuyen a las altas tasas de incidencia y mortalidad de cáncer infantil (Zapata-Tarrés et al., 2021).

3.1.1.4. Proyecto Nacional de Investigación e Incidencia (PRONAI) de Leucemia

Ante la creciente emergencia sanitaria que representa la leucemia en la población pediátrica de nuestro país, el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT), en conjunto con la Secretaría de Salud, implementó el Proyecto Nacional de Investigación e Incidencia (PRONAI) en Leucemia infantil, como parte del Programa Estratégico Nacional (PRONACE) en Salud, el cual se enfoca en apoyar la investigación en salud mediante la creación de redes que vinculen grupos académicos

y organizaciones sociales. A través de la formación de grupos multidisciplinarios colaborativos, se busca abordar la incidencia social a partir de enfoques transdisciplinarios e integrales, con el propósito de contribuir aportando conocimiento y acciones estratégicas para proponer soluciones que impacten los problemas de salud más apremiantes de México (*Salud – Conahcyt, n.d.*).

El PRONAI de Leucemia Infantil tiene como objetivo contribuir a la disminución de la tasa de mortalidad temprana por leucemia infantil en regiones vulnerables del país, particularmente Puebla, Oaxaca y Tlaxcala. Esto a través de la priorización de la investigación científica que incluya el contexto social y ambiental en el que se desarrolla la patología y de esta manera generar propuestas innovadoras de control que incidan en la práctica clínica y en las políticas públicas de prevención, vigilancia y tratamiento de la LLA en nuestro país. Para lograr esto, se han implementado diversas estrategias entre las que destaca la implementación de la Ruta de la Incidencia de Leucemia Infantil que busca garantizar un diagnóstico temprano y completo, así como un seguimiento de cada paciente perteneciente a las áreas urbanas y rurales de Puebla, Oaxaca y Tlaxcala, a través de un algoritmo sistematizado, que empieza con la llegada del paciente al hospital, hasta la emisión de un reporte estandarizado de inmunofenotipo de leucemia dirigido al médico tratante del paciente (Núñez-Enríquez et al., 2024). Otra pieza fundamental del PRONAI es la instauración del Laboratorio de Citómica del Cáncer Infantil, dirigido por nuestro grupo de investigación, único en su tipo en nuestro país, el cual brinda servicios de diagnóstico de leucemias pediátricas y simultáneamente realiza investigaciones científicas para la estratificación de pacientes pediátricos mexicanos con leucemia. Con la ayuda de citometría de flujo, citometría de masas, y otras variantes oncoinmunológicas, se pretende comprender la identidad biológica de la enfermedad, la relación entre la progresión tumoral y los factores ambientales, para predecir respuestas a los agentes terapéuticos y los factores de recaída, lo que impactará en la adecuada orientación de los tratamientos y contribuirá al manejo integral y la prevención de resultados desfavorables (*Consejo Técnico Del IMSS Aprueba Primer Laboratorio de Cáncer Infantil En Latinoamérica | Sitio Web “Acercando El IMSS Al Ciudadano,” n.d.; Laboratorio de Citómica Para El Cáncer Infantil – Conahcyt, n.d.*).

3.2. Antecedentes específicos

3.2.1. Hematopoyesis y el nicho hematopoyético

3.2.1.1. La hematopoyesis en la médula ósea

El cuerpo humano está equipado con sistemas complejos y altamente especializados que trabajan en conjunto para mantener la salud y proteger contra enfermedades. Dos de estos sistemas fundamentales son el sistema inmunológico y el sistema sanguíneo. El sistema inmunológico es responsable de proteger al organismo contra invasiones de patógenos, mientras que el sistema sanguíneo desempeña un papel vital en el transporte de nutrientes, oxígeno y desechos por todo el cuerpo. Aunque tienen funciones distintas, estos sistemas están estrechamente interrelacionados y trabajan en conjunto para garantizar la homeostasis y la respuesta eficaz ante amenazas externas e internas. Ambos sistemas son conformados por células sanguíneas. El proceso a través del cual se generan las células de la sangre se denomina hematopoyesis (Flores-figueroa & Pelayo, 2009). La hematopoyesis es el proceso dinámico y altamente regulado dentro de la médula ósea, responsable de la formación de todas las células de la sangre a partir de las células troncales hematopoyéticas, las únicas células dentro del sistema hematopoyético con propiedades de multipotencialidad y autorrenovación, que experimentan restricción de linaje dando origen a una serie de progenitores que van perdiendo gradualmente potencialidad, hasta la formación de los elementos celulares encargados del transporte de oxígeno, reparación de tejido y funciones inmunológicas (Cordeiro et al., 2020; Crane et al., 2017; Pel et al., 2015; Zhang et al., 2019).

Tanto el sistema inmunológico como el sanguíneo comparten un origen en la embriogénesis temprana, en el saco vitelino, donde alrededor de las 3-4 semanas de concepción se generan las células progenitoras intraembrionarias en la aorta-gónada-mesonefros. Estos progenitores migran y colonizan diferentes sitios del feto, como el hígado, que actúa como el principal órgano hematopoyético hasta la mitad del segundo trimestre. La médula ósea (MO) es colonizada alrededor de la semana 11 y se convierte en el principal sitio de hematopoyesis después de la semana 20 (Chávez-

González et al., 2017). Se estima que un adulto humano produce aproximadamente de $4-5 \times 10^{11}$ células hematopoyéticas por día (Pelayo et al., 2018).

De acuerdo con el 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 (CTH). 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 (Chávez-González et al., 2017). Las CTH representan el 0.01% del total de células nucleadas en la MO. Expresan marcadores de superficie como CD34, CD90, CD117 y CD133; pero carecen de marcadores de linaje maduro (Lin^-) (Flores-figueroa & Pelayo, 2009).
- b) Células progenitoras hematopoyéticas (CPH). Conforman $<0.5\%$ del total de células dentro de la MO. Proviene de las CTH 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 hacia linajes específicos. A partir de ellos, todas las células sanguíneas se generan mediante dos procesos intrínsecos de la hematopoyesis en el interior de la médula ósea: la mielopoyesis y la linfopoyesis; a los grupos de células provenientes de estos se denominan mieloides y linfoides, 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 están los eritrocitos, plaquetas, granulocitos (eosinófilos, neutrófilos, basófilos), monocitos (que darán paso a los macrófagos) y algunas células dendríticas (**Figura 2**).

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; los precursores de linfocitos T tienen que viajar hacia el timo para completar su desarrollo.

El inicio de la diferenciación linfoide ocurre 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, se lleva a cabo 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 y continúa 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 ocurre 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 (Pelayo et al., 2018).

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 (Flores-figueroa & Pelayo, 2009).

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 (Pinho & Frenette, 2019).

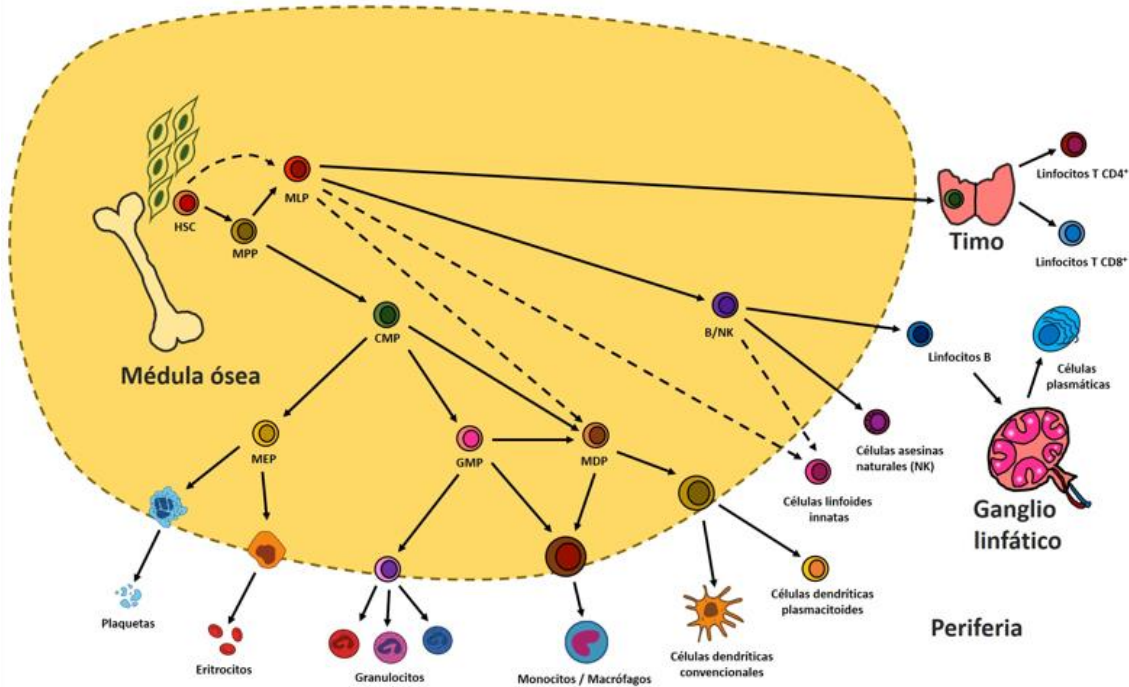


Figura 2. Representación esquemática del proceso de hematopoyesis. Todas las células de la sangre y del sistema inmunológico se producen durante la hematopoyesis a través de una población única de células troncales hematopoyéticas (*CTH*), que dan lugar a los progenitores multipotentes (MPP) y a los progenitores multilineales (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 mielode proviene del progenitor mielode 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 (Pelayo et al., 2018)

3.2.1.2. Nicho hematopoyético: papel y relevancia

Las CTH se localizan en microambientes especializados, denominados nichos hematopoyéticos, que garantizan la homeostasis hematopoyética controlando la proliferación, autorrenovación, diferenciación y migración de las CTH y células progenitoras en estados fisiológicos normales y en respuesta a emergencias o daño (Baccin et al., 2020; Comazzetto et al., 2022; Pinho & Frenette, 2019; Purizaca et al., 2012).

El concepto de nicho fue adoptado al campo de las células troncales por Ray Schofield, postulando que las CTH deben residir en un lugar específico dentro de la médula ósea, conocido como nicho, donde están estrechamente asociadas con otros tipos celulares.

Este entorno celular proporciona regulación fisiológica y protección a las CTH, evitando que reciban señales que induzcan su maduración o proliferación descontrolada. Además, el nicho controla el equilibrio entre la proliferación y la diferenciación de las CTH, asegurando la producción adecuada de células maduras a lo largo de la vida (Chávez-González et al., 2017; Sugiyama & Nagasawa, 2012). Sin embargo, la identidad de este nicho o nichos aún está en estudio y es motivo de debate en la comunidad científica.

La MO es el sitio principal (después del nacimiento) de producción de células sanguíneas. Se localiza al interior de los huesos (principalmente en los huesos planos y en la epífisis de los huesos largos). Dentro de ella se encuentran tres nichos: el endosteal o trabecular, el endotelial/perivascular y el reticular/parenquimal (Hernández-Barrientos et al., 2023). El primer nicho está formado de osteocitos, osteoblastos y osteoclastos; el endotelial corresponde al sitio de los sinusoides y arteriolas (vasos sanguíneos) y el último (parenquimal) hace referencia a todos los elementos hematopoyéticos (Chávez-González et al., 2017).

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 (no hematopoyético), involucrando a las células troncales/estromales mesenquimales, así como a sus productos de diferenciación (adipocitos, osteoblastos, condrocitos), vasos, nervios y otras células accesorias (Chávez-González et al., 2017; Lucas, 2021).

Se han empleado diferentes metodologías para desentrañar la composición celular y molecular de los nichos hematopoyéticos, como la inmunofenotipificación, deleción selectiva, imagenología *in vivo*, técnicas de microscopía novedosas, secuenciación de alta resolución a nivel de célula única y el uso de modelos murinos (Hernández-Barrientos et al., 2023; Lucas, 2021). Tanto en el nicho endosteal como en el vascular se ha observado la presencia de las CTH, distribuyéndose preferentemente en el vascular. Las CTH encontradas asociadas al nicho vascular de arterias se encuentran en quiescencia (Chávez-González et al., 2017; Szade et al., 2018). En 1994, se probó que osteoblastos humanos primarios mantenían la proliferación de progenitores

hematopoyéticos primitivos *in vitro*. Sin embargo, experimentos posteriores demostraron que, si bien el nicho endosteal funciona como nicho para las CTH y progenitores hematopoyéticos, la disminución de los osteoblastos en modelos murinos no afectó los números de CTH y células sanguíneas, por lo que debe haber otros sitios que sean de mayor relevancia para estas células (Sugiyama & Nagasawa, 2012).

En la MO existen dos tipos de células troncales: las CTH y las células troncales/estromales mesenquimales (CEM, en inglés MSC “Mesenchymal Stem/Stromal Cells”). Las CTH y sus progenitores se encuentran rodeados por las células estromales, donde crecen y se expanden en la cavidad del hueso y ahí permanecen hasta completar su maduración (L. Ding & Morrison, 2013), conformando la mayor fracción celular en la MO (Szade et al., 2018).

El nicho de las CTH 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 (Chávez-González et al., 2017). En este nicho, la actividad de las CTH 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 del microambiente (Pinho & Frenette, 2019). De igual manera, provee un ambiente inmunosupresor que protege a las propias CTH de un ataque inmunológico, donde también intervienen poblaciones de células T reguladoras (Tregs) y otras poblaciones supresoras (Szade et al., 2018).

Una característica del nicho de las células troncales y progenitoras hematopoyéticas es su perfil hipóxico (Nombela-Arrieta et al., 2013). Las especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*) pueden dañar moléculas biológicas como el DNA, ocasionando mutaciones. Las CTH cuentan con varios mecanismos intrínsecos para evitar este tipo de daños en su código genético. 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 CTH y su ligando, KITL mejor conocido como *stem cell factor* (SCF), constituyen una interacción esencial dentro de la dupla nicho-CTH para mantener bajos los niveles de ROS (Szade et al., 2018). Se ha observado que CTH con altos niveles de ROS se encuentran localizadas cerca de los sinusoides (Lucas, 2021)

Al conjunto de nichos hematopoyéticos también se le denomina microambiente hematopoyético, 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, citocinas, quimiocinas, etc), que regulan la localización y fisiología de las células hematopoyéticas (Flores-figueroa & Pelayo, 2009). Además de los factores biológicos, se encuentran las interacciones célula-célula, señales bioquímicas y metabólicas (Krstic et al., 2017).

Algunos factores que han demostrado tener un papel en el mantenimiento de las CTH son CXCL12 y SCF. CXCL12 es el ligando del nicho para CXCR4 expresado en las CTH y en su progenie, dirige la migración de las CTH 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 CEM que expresan el receptor de leptina (LepR⁺) son altamente productoras de CXCL12 y SCF (Szade et al., 2018). De hecho, esta misma población traslapa 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 CTH.

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 (Krstic et al., 2017). Las células troncales no pueden

sobrevivir, ya sea fuera de su microambiente o en ausencia de factores de crecimiento y/o citocinas específicas (Aponte & Caicedo, 2017).

3.2.1.3. Células Estromales Mesenquimales, pieza clave del nicho hematopoyético

Como se mencionó anteriormente, la regulación de la actividad de las CTH depende de varios tipos de células, incluyendo las CEM, adipocitos, células vasculares y células gliales (Pinho & Frenette, 2019).

La función de las CEM en la hematopoyesis ha sido estudiada a profundidad en los últimos años, dada su relevante participación en el proceso hematopoyético mediado por la interacción célula-célula o su secretoma (Chávez-González et al., 2017; Cordeiro et al., 2020; L. Ding & Morrison, 2013; Li & Hua, 2017). Las CEM son capaces de inducir la proliferación y la autorenovación de las CTH, 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 CEM y su participación dentro del nicho de las CTH en un modelo *in vivo* (Chávez-González et al., 2017). A partir de ello, otros grupos de investigación han confirmado la participación de las células del nicho en la supervivencia de las CTH y en la promoción de los linajes linfoides o mieloides en modelos *in vivo* con ratones transgénicos (L. Ding & Morrison, 2013).

Las CEM 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, condroblastos, células epiteliales y endoteliales (Chávez-González et al., 2017; Dominici et al., 2006; Keating, 2012; Li & Hua, 2017; Lourdes Mora-García et al., 2016; Sai et al., 2019; Wolock et al., 2019).

Este tipo de células puede encontrarse en tejidos fetales, y tejidos adultos como MO, sangre de cordón umbilical, células perivasculares de cordón umbilical y leche materna. Algunos otros tejidos donde se encontraron células que exhibían características de las CEM son, tejido adiposo, líquido amniótico, membrana amniótica, tejido dental, endometrio, sangre menstrual, sangre periférica, glándulas salivales, piel y gelatina de Wharton (Keating, 2012). Pese a la gran cantidad de fuentes dónde se pueden encontrar este tipo de células, la médula ósea y el tejido adiposo se consideran las principales (Xu et al., 2017). Poseen la capacidad de autorrenovación, potencial de diferenciación multilineaje y potentes propiedades inmunomoduladoras, las cuales dependen del tipo e intensidad de estímulos inflamatorios presentes en el microambiente (D. Ding & Shyu, 2011; J. Liu et al., 2022; Ullah et al., 2015).

Las CEM pueden ser atraídas a los tejidos dañados por citocinas inflamatorias y quimiocinas que soportan la regeneración y reparación del tejido. En este proceso las CEM 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 (Dostert et al., 2017; Lourdes Mora-García et al., 2016).

Las CEM 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 (Keating, 2012). La supresión de la respuesta de los linfocitos T podría ser a través de la vía purinérgica (Lourdes Mora-García et al., 2016). La supresión directa de las respuestas del sistema inmune es dada por la producción de moléculas inmunomoduladoras como IDO, PGE2, TGF β , 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 CEM son originalmente silentes, y se vuelven inmunosupresoras por la activación de citocinas inflamatorias como IFN γ , TNF α e IL1 β , y por ligandos de TLR expresados en las CEM (Kudo-Saito, 2015).

Las CEM no sólo son importantes en el mantenimiento de la hematopoyesis, también 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, donde uno de los componentes claves de este microambiente son las CEM (Entrena et al., 2015). 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 (Aponte & Caicedo, 2017). 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 (Kudo-Saito, 2015; Sai et al., 2019). De igual manera, se ha reportado que las señales de CXCL12-CXCR4 forman parte de la migración de células cancerígenas a sitios de metástasis, y de esta manera incrementan la supervivencia y/o crecimiento de varios cánceres como el de mama, pulmón, leucemia y linfoma (Nagasawa, 2015).

3.2.2. Microambiente tumoral en LLA

3.2.2.1. Células leucémicas, nicho leucémico y el sistema inmune

Las células leucémicas se caracterizan por el arresto de las vías de diferenciación, incremento de la proliferación celular, aumento de la auto-renovación, disminución de

la tasa de apoptosis y mantenimiento de los telómeros. Estas alteraciones conducen a la producción altamente proliferativa de clonas de células blásticas leucémicas inmaduras con ventajas de supervivencia intrínsecas y potencial replicativo ilimitado sobre las células troncales y progenitoras hematopoyéticas normales y puede resultar en la supresión de la hematopoyesis funcional o en la remodelación de los nichos hematopoyéticos, contribuyendo así al mantenimiento de las células malignas. En la etapa inicial leucemogénica, las poblaciones normales y malignas comparten los nichos hematopoyéticos, de esta forma la hematopoyesis tanto normal y neoplásica son co-reguladas por señales innatas que influyen en su proliferación y diferenciación. Sin embargo, los cambios progresivos, tanto en la composición y funciones celulares del microambiente, favorecen la actividad de los progenitores celulares anormales conduciendo al establecimiento de nichos que propician la proliferación celular leucémica y son incapaces de mantener la hematopoyesis normal, promoviendo el desarrollo de la enfermedad (Balandrán et al., 2016; Pelayo et al., 2012; Pinho & Frenette, 2019; Vilchis-Ordoñez et al., 2021).

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 la 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 (Greaves, 2018). 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. Las leucemias de origen mielóide permitieron establecer el modelo jerárquico del cáncer donde las células troncales leucémicas (LSC, del inglés *leukemia stem cell*) son la población encargada del mantenimiento del tumor y pueden ser enriquecidas en el mismo compartimento inmunofenotípico de CTH normales. Se conocen ciertos marcadores diferenciales entre las LSC y las CTH en humanos como el CD123, pero su expresión es heterogénea a través de los pacientes (Guzman & Allan, 2014). 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 (le Viseur et al., 2008). 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 (Elder et al., 2017; Rehe et al., 2013).

El sistema inmune tiene su origen en la hematopoyesis, generando los linajes mieloide y linfóide. 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 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 (Dunn et al., 2004).

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 3**).

Diferentes estudios han sugerido que las clonas leucémicas producen citocinas, factores inflamatorios y microvesículas exosomales (conteniendo ARN y otros productos). La inflamación resultante induce capacidades distintivas como la evasión de la inmunovigilancia y selección de clonas pre-oncogénicas capaces de desarrollar un tumor en condiciones adecuadas, además de reacondicionar los nichos normales y formar sitios hostiles para las clonas normales favoreciendo su escape o eliminación y un nicho óptimo para la proliferación de las clonas malignas (Juárez-Avenidaño et al., 2021). Nuestro grupo de trabajo ha reportado que algunas poblaciones de células leucémicas en la médula ósea de pacientes con LLA-B son capaces de producir factores pro-inflamatorios y de crecimiento (como TNF α , IL-1 β , IL-12 y GM-CSF) contribuyendo al daño de la hematopoyesis normal a largo plazo en estos pacientes.

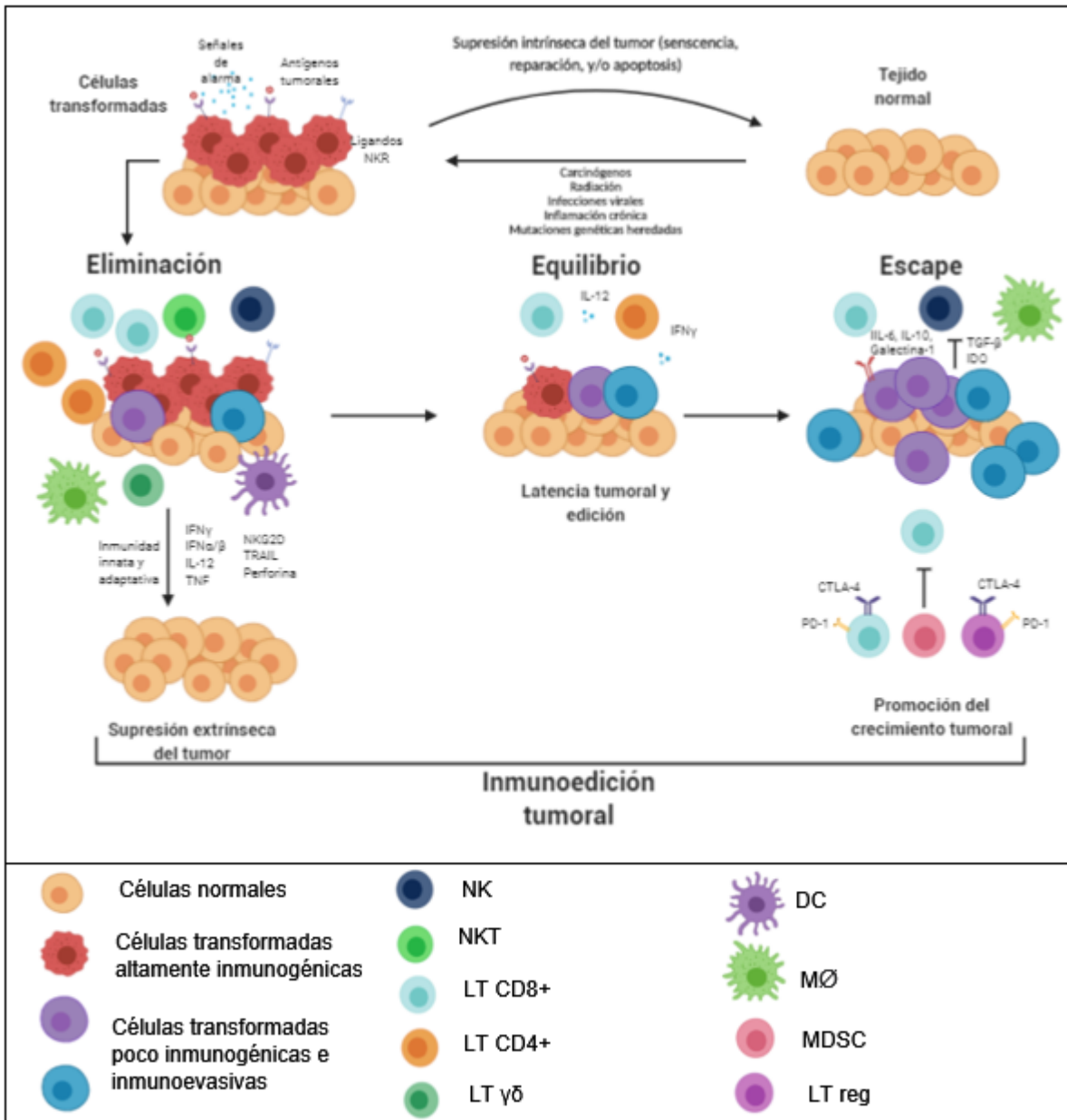


Figura 3. Imunoedición tumoral. La imunoedición tumoral consta de 3 fases: eliminación, equilibrio y escape. La fase de eliminación contempla el concepto de inmunovigilancia tumoral, donde los principales protagonistas son IFN α/β , IFN γ , IL-12 y TNF; células de la inmunidad innata como NK, NKT, LT $\gamma\delta$, 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 (Lussier et al., 2016) usado previamente en (Zamora-Herrera, 2020).

Además de esto, reportamos que las frecuencias celulares de las CTHs funcionales se encuentran críticamente reducidas en los pacientes con LLA-B y que el nicho reticular mesenquimal leucémico no es capaz de mantener *ex vivo* la linfopoyesis normal debido a la expresión disminuida de CXCL12 (Balandrán et al., 2016; Vilchis-Ordoñez et al., 2015, 2021).

3.2.2.2. Características e impacto del microambiente tumoral en LLA

Como en la hematopoyesis normal, las células cancerígenas emergen y progresan dentro de nichos específicos, denominados en conjunto microambiente tumoral (MAT), en el que participan diferentes tipos celulares y moléculas de señalización. El MAT además de estar implicado en el crecimiento tumoral, invasión y metástasis (Ingangi et al., 2019), está asociado con adquisición de resistencia a quimioterapia (“Tumor Microenvironment,” 2020).

El microambiente de la MO mantiene la supervivencia y diferenciación de las CTH, pero también puede ser permisivo para el inicio y mantenimiento del desarrollo, progresión y expansión de la leucemia (Raaijmakers, 2011; “Tumor Microenvironment,” 2020). Un ejemplo son las células estromales que proveen de señales cruciales a las células leucémicas que afectan para la resistencia a quimioterapia (Pal et al., 2016).

En la LLA, el papel inmunológico del nicho de la MO no ha sido completamente estudiado, muy a pesar del incremento de evidencia que sugiere que el sistema inmune contribuye al desarrollo y en el resultado de la leucemia. En comparación con controles sanos, un incremento de marcadores, incluyendo PD-1, está asociado a la regulación inmunitaria en pacientes con LLA (Hohtari et al., 2019), o la aparición de poblaciones reguladoras como Treg, resaltando el importante rol que juega el estado de inmunosupresión en el MAT (Lima et al., 2018).

Aparentemente las células leucémicas secuestran y destruyen los nichos que soportan las CTH 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 (Duarte et al., 2018; Lasfar et al., 2019).

La leucemia linfoblástica aguda de precursores de linfocitos B edita 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 (Portale et al., 2019).

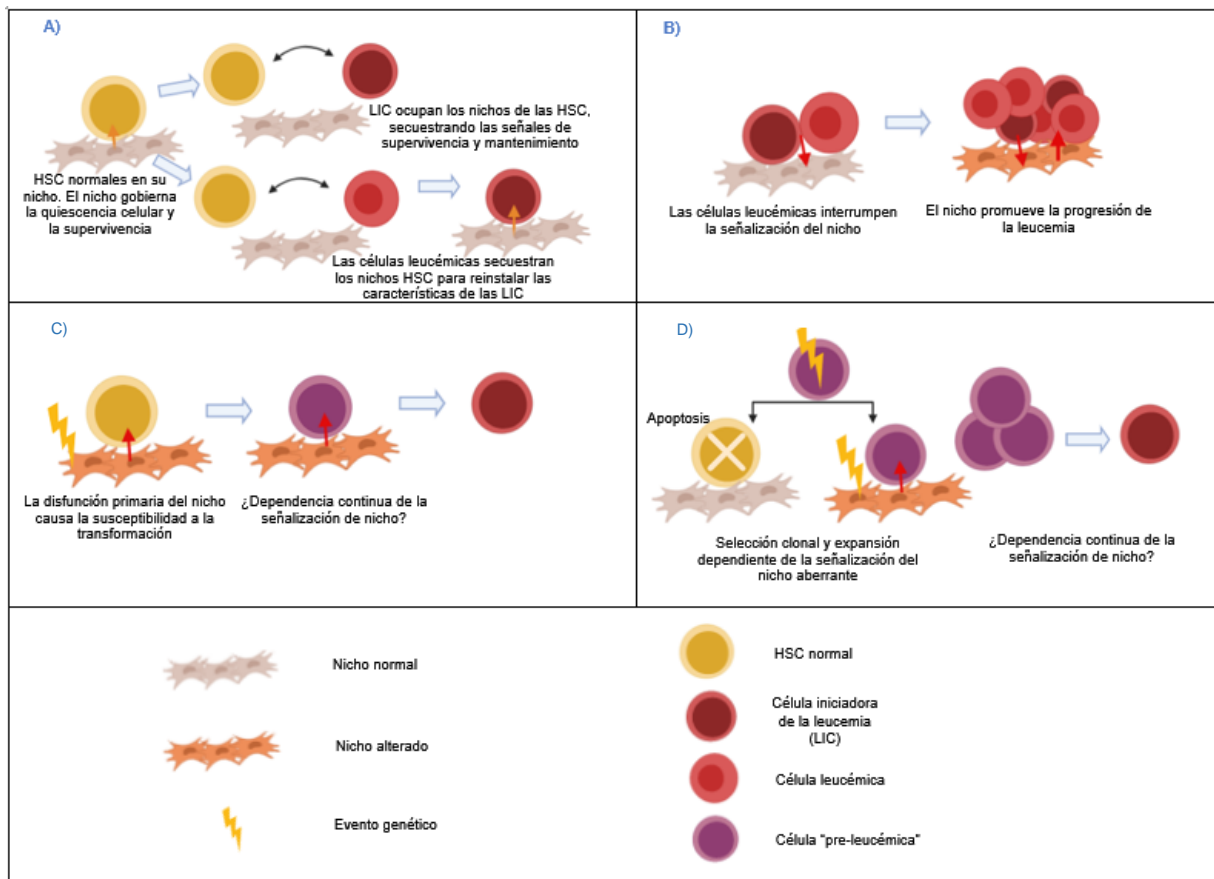


Figura 4. Contribución del nicho en la leucemogénesis. A) Competencia por los nichos innatos y su señalización para el mantenimiento y supervivencia entre CTH y LIC. Alternativamente las células leucémicas ocupan los nichos de las CTH para reinstalar las características de las LIC. Consecuencias clínicas: 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 (Raaijmakers, 2011) usado previamente en (Zamora-Herrera, 2020)

Las diferencias en los nichos dependiendo de la edad, pueden influir de manera importante en el comportamiento de las células troncales cancerígenas y el curso de la enfermedad, pero al mismo tiempo pone en evidencia las propiedades innatas anti-tumorales del nicho (G. Y. Lee et al., 2019).

Las células de la inflamación y sus productos son importantes reguladores del MAT (Balandrán et al., 2023). 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 (Vilchis-Ordoñez et al., 2015). Esto podría ser a través de dos vías: la extrínseca, resultante de factores externos latentes en la respuesta inflamatoria, o la intrínseca, conducida por oncogenes o genes supresores de tumores que activan la expresión de programas relacionados a la inflamación. Trabajos previos de nuestro grupo soportan la noción de que las células malignas contribuyen directamente en la patogénesis de la LLA al crear un microambiente inflamatorio (Vilchis-Ordoñez et al., 2015), que provoca el agotamiento de las células troncales y progenitoras en la médula ósea leucémica (Balandrán et al., 2016), acompañado de la secreción anormal de citocinas pro-inflamatorias (Balandrán et al., 2017), lo que provoca la perturbación del nicho tras la pérdida de ejes reguladores de la hematopoyesis normal como CXCR4-CXCL12. (Enciso et al., 2016).

Como se enfatizó previamente, las CEM 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 CEM, se co-expresan CXCL12, SCF e IL-7 esenciales para este proceso (Cordeiro Gomes et al., 2016). Además, las CEM mantienen un nicho inmuno-privilegiado 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 (Hirata et al., 2018). Durante la leucemia, las CEM son receptivas de productos celulares como citocinas inflamatorias, exosomas y otras moléculas que editan su comportamiento normal en favor de la progresión tumoral (Chiarini et al., 2016). En un estudio realizado por el grupo de la Dra. Den Boer se demostró que las CEM producen

citocinas inflamatorias como CXCL8 por la estimulación generada tras el contacto con células de leucemia linfoblástica aguda (tanto de pacientes como de líneas celulares) en co-cultivo (De Rooij et al., 2017). Interesantemente, las CEM aisladas de sujetos normales actúan como las CEM aisladas de pacientes leucémicos cuando son co-cultivadas con células leucémicas, disminuyendo sus propiedades inmunosupresoras (Entrena et al., 2015). Recientemente, nuestro grupo demostró la existencia de una población de células NK con fenotipo supresor que es promovido por CEM derivados de pacientes de mal pronóstico (Ramírez-Ramírez et al., 2019). En conjunto, estos hallazgos sugieren que las CEM además de proveer el sitio de retención para las CTH, durante la LLA sus propiedades inmunomoduladoras se modifican de forma orquestada por el tumor a través de factores solubles y contacto.

Mediante un modelo Booleano se demostró que la activación constitutiva de NF- κ B en la red molecular hematopoyética establece un asa de retroalimentación positiva que mantiene la secreción constitutiva de citocinas pro-inflamatorias (IL-1 β y G-CSF) e induce la disrupción de los ejes de comunicación entre las CEM-CTPH, CXCR4/CXCL12 y VLA4/VCAM1, permitiendo el mantenimiento de las células malignas (Baladrán et al., 2016; Enciso et al., 2016). Mediante experimentos teóricos y experimentales, se sugiere que los niveles de expresión de CXCL12 son fundamentales para la progresión y recaída de leucemia. La pérdida aberrante de CXCL12 y SCF bajo condiciones pro-inflamatorias marca la dominancia de las células malignas a expensas de la diferenciación normal, y es en ocasiones seguida de la aparición de un nicho CXCL11, el cual puede ser colonizado por células que expresan fuertemente CXCR7 inducido por inflamación (Vilchis-Ordoñez et al., 2021). Como resultado del microambiente pro-inflamatorio, las CEM causan inmunosupresión y ayudan en el soporte de la progresión tumoral, lo que ha generado nuevas áreas de oportunidad terapéutica por su efecto negativo, que corresponde a un problema crítico en el tratamiento de los pacientes con cáncer (Aponte & Caicedo, 2017; Kudo-Saito, 2015; Poggi et al., 2018).

El MAT ha sido asociado como un factor primordial en la efectividad del tratamiento y pronóstico de los pacientes con tumores (Yuan & Wang, 2022). En su interacción con

las células malignas juega un papel crucial en el desarrollo del cáncer (Yang et al., 2022). La progresión tumoral no depende solamente de las alteraciones genéticas o modificaciones epigenéticas de las células cancerígenas, sino también de los componentes del MAT capaces de influir en varios aspectos del crecimiento tumoral, incluyendo proliferación y supervivencia de las células cancerígenas, angiogénesis, y quimioresistencia. Se ha demostrado que los desenlaces clínicos del cáncer dependen en gran medida de la composición, organización y orientación funcional del MAT. La capacidad inmunomoduladora de las células estromales puede afectar la respuesta inmune antitumoral, tanto innata como adaptativa, haciendo evidente que las CEM como parte del MAT no solo se encuentran asociadas con el pronóstico del paciente, sino que también son puntos esenciales para el desarrollo de terapias antineoplásicas complementarias de los cuadros terapéuticos existentes (Fridman, 2020; Mhaidly & Mechta-Grigoriou, 2020). Pese a que existen moléculas conocidas con impacto negativo para la respuesta anti-tumoral, como PD-L1, su correlación heterogénea con el pronóstico de los pacientes da indicios de la necesidad de proveer un sistema de clasificación pronóstica basada en el MAT (Lasfar et al., 2019; Yang et al., 2022). Dentro de la médula ósea, la caracterización del microambiente permite identificar la remodelación que se genera en respuesta al tumor (Lasry et al., 2022a). La identificación de biomarcadores para la generación de nuevas terapias dirigidas basadas en el microambiente tumoral, así como la generación de perfiles pronósticos ha sido explorado en distintos tipos de cáncer, tales como adenocarcinoma pulmonar/ cáncer pulmonar (Huang et al., 2022; Shinohara et al., 2022), cáncer cervical (Lourdes Mora-García et al., 2016; Montesinos et al., 2013; Nie et al., 2022) y cáncer gástrico (Duan et al., 2021).

Estudios previos de nuestro grupo sugieren la presencia de por lo menos dos nichos (por medio de secuenciación de RNA de CEM de pacientes leucémicos) que sostienen de manera distinta la leucemogénesis, distinguidos especialmente por la expresión de CXCL11 (Nicho Supresor de las Células Iniciadoras de la Leucemia (SLIC)) y la disminución de CXCL12 (Nicho Inflamatorio y de Expansión de la Leucemia (ILE)) en modelos in vitro. A través de modelado computacional se infirió la posible presencia de una célula precursora de linfocitos B con fenotipo compatible al de las células

iniciadoras de la leucemia (LIC) y con capacidad de desplazar los nichos linfoides centrales, caracterizado por la expresión elevada de CXCR7, un receptor de quimiocinas con alta afinidad por CXCL12 y CXCL11, lo que denota la importante comunicación del tumor con los nichos en los que se desarrolla (Enciso et al., 2020). A partir de la generación de organoides (PDLS) que emulan la estructura tridimensional de los nichos en la MO co-cultivando CEM y células leucémicas, se demostró que dentro de ellos, las células leucémicas presentan propiedades de troncalidad, además de quimioresistencia por el efecto protector de las CEM (Balandrán et al., 2021).

3.2.3. Herramientas y pruebas diagnósticas y pronósticas en cáncer

3.2.3.1. El estándar de oro para el diagnóstico de la leucemia: la citometría de flujo

La citometría de flujo es un sistema que sirve para detectar y analizar las señales de luz generadas por partículas mientras pasan por una corriente líquida atravesada por un haz de luz (Givan, 2001). 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 hacia 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 5**).

Un compuesto fluorescente tiene un rango específico de longitud de onda en la cual absorbe la energía de la luz. Esta absorción de la luz estimula el electrón a un nivel más alto de energía, o estado excitado. Al volver a su estado base, el electrón libera el exceso de energía en forma de fotones de luz (fluorescencia) en una longitud de onda específica. 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 (Adan et al., 2017). Para que esto sea posible, el compuesto fluorescente debe encontrarse unido covalentemente a un anticuerpo. El anticuerpo es 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 (Su-Yau & Mullins, 2010).

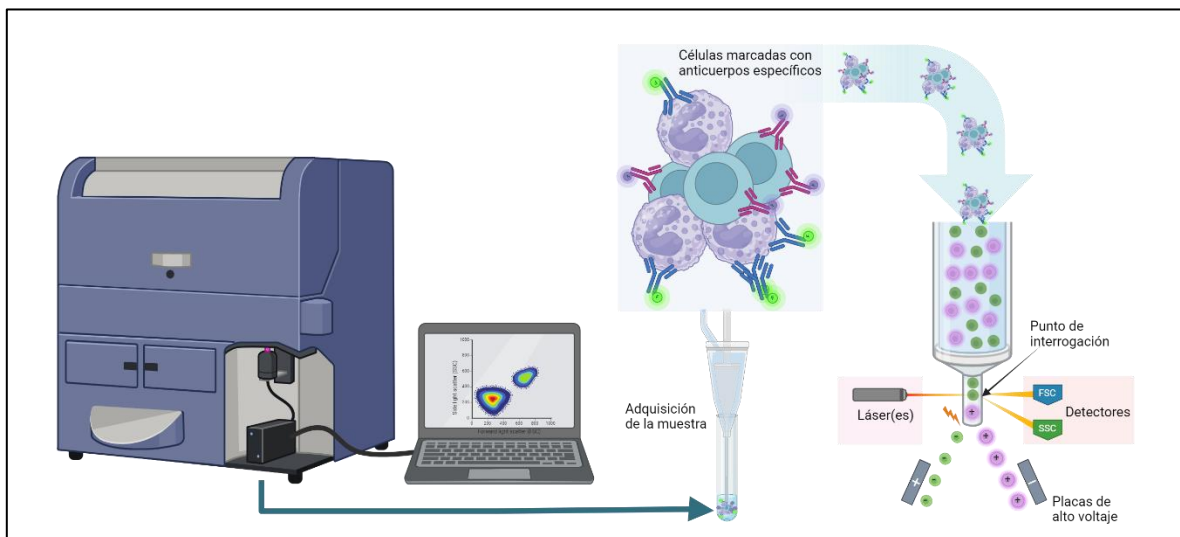


Figura 5. La Citometría de flujo y sus componentes principales. La técnica se basa en el paso de células en suspensión a través de un haz de luz láser, donde los diferentes componentes celulares son identificados y cuantificados según su dispersión de luz y fluorescencia emitida tras la interacción con anticuerpos fluorescentemente marcados. Los principales componentes del sistema incluyen el citómetro de flujo, el fluido de transporte de muestras, los láseres, los detectores fotomultiplicadores, y el software de análisis de datos.

El inmunofenotipo realizado por citometría de flujo de multicanal es 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”, debido a la limitante en la sensibilidad del sistema analítico para cuantificar blastos en la sangre (Arriaga-Pizano et al., 2019), gracias a su rapidez, eficacia y sensibilidad (Chiaretti et al., 2014). Para 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 (Mateus et al., 2013; Villegas Valverde et al., 2019).

Para poder realizar el inmunofenotipo por citometría de flujo para el diagnóstico y la subclasificación de la LLA es necesario un aspirado de médula ósea. El aspirado de médula ósea (AMO) es una técnica para obtener la médula o tejido central del hueso para diagnósticos, exámenes o trasplantes. Para llevar a cabo este procedimiento, se debe insertar una aguja especial en el hueso, y recoger la médula mediante succión. El AMO es necesario cuando diferentes tipos de células sanguíneas están afectadas, especialmente cuando las tres líneas celulares (glóbulos blancos, glóbulos rojos y plaquetas) están afectadas, lo que corresponde a la reducción en la producción de médula ósea.

El hueso de la cadera y el esternón son los lugares más comunes del cuerpo para obtener médula ósea. El uso del ilion es útil en el caso de pacientes ansiosos de todas las edades, especialmente en adultos y niños mayores, mientras que la tibia es un sitio satisfactorio en niños, incluyendo menores de dos años y recién nacidos. La cresta ilíaca posterior superior es un sitio favorable para obtener la médula ósea de los niños, ya que posee la mayor parte de la médula celular, mientras que la cresta ilíaca anterior es un sitio favorable en el caso de pacientes obesos. En niños menores de 18 meses

de edad, la cara anteromedial de la tuberosidad tibial es el sitio favorable para la BMA (Bhaskar, 2021) .

Uno de los retos más grandes en el inmunofenotipo de las leucemias es identificar a las células malignas y distinguirlas de sus contrapartes hematopoyéticas normales. Las similitudes entre las células sospechosas y sus potenciales contrapartes normales permiten la asignación de esas células a un linaje celular hematopoyético y estadio madurativo, así como la identificación de fenotipos aberrantes, tales como los inmunofenotipos asociados a la leucemia. Para lograrlo se necesita una selección cuidadosa de las combinaciones únicas de marcadores individuales basados en su grado de especificidad, identificación del linaje, maduración, aberrancias, clonas de anticuerpos y fluorocromos conjugados para ser usados en combinaciones multicolores (Van Dongen et al., 2012). Euroflow es un consorcio formado por más de 20 grupos de investigación diagnóstica dedicada al desarrollo y estandarización de pruebas de citometría de flujo con el propósito de diagnosticar y subclasificar con precisión las malignidades hematológicas. Entre sus logros se incluye la creación de procedimientos estandarizados para la configuración de citómetros de flujo y protocolos optimizados para la tinción de paneles de 8 colores destinados a la inmunofenotipificación de leucemias. La estrategia para la caracterización por inmunofenotipificación por citometría de flujo de leucemias agudas mediante la plataforma de Euroflow consiste en dos pasos: i) teñir la muestra sospechosa con un panel de screening rápido basado en un número limitado de anticuerpos que permite la identificación diferencial y enumeración de todas las poblaciones celulares relevantes en una muestra, y ii) caracterizar y clasificar las células sospechosas. Los paneles Euroflow contienen prácticamente todos los marcadores “clásicos” y los recomendados por la OMS, sin embargo, algunos no fueron incluidos basados en su información redundante o inferior al ser comparados con otro conjunto de marcadores en el panel. Los marcadores seleccionados que fueron incluidos se basaron en el tipo y calidad de información diagnóstica que proveen en combinación con los otros marcadores del mismo panel (Kalina et al., 2012; van Dongen & Orfao, 2012). Nuestro grupo emplea los paneles estandarizados del consorcio Euroflow para llevar a cabo la inmunofenotipificación de los casos sospechosos de leucemia.

3.2.3.2. La citometría de masas

La citometría de masas (CM), una tecnología relativamente nueva, ha surgido como una herramienta prometedora capaz de analizar múltiples parámetros en una sola muestra, célula por célula (tecnología de célula única). Esta innovación permite la cuantificación de características en células individuales que componen tumores o se encuentran dentro de ellos.

La CM surge de la fusión de dos técnicas: citometría de flujo y espectrometría de masas. Si bien la citometría de flujo ha sido fundamental para el estudio de diversas características biológicas y el diagnóstico de enfermedades, como la leucemia (Di Zeo-Sánchez et al., 2021), su capacidad está limitada en cuanto al número de parámetros que puede analizar simultáneamente, restringiendo su utilidad (Gadalla et al., 2019). Mientras que la citometría de flujo analiza típicamente hasta 12 marcadores por panel, la citometría de masas puede evaluar más de 60 parámetros al mismo tiempo (Bendall et al., 2012).

Con la citometría de masas, es posible identificar casi cualquier característica celular o blanco terapéutico, incluyendo células raras, y estudiar su comportamiento funcional a través de redes de señalización entre millones de células individuales. Esta tecnología no solo ha revolucionado la inmunofenotipificación, sino que también se ha convertido en un recurso valioso para la oncología de precisión, al permitir la medición e incorporación de información de distintos tipos celulares dentro del tumor (Iyer et al., 2022; Mistry et al., 2019)

Esta tecnología se basa en el principio de “Tiempo de Vuelo” o por su origen en el idioma inglés “Time-of-Flight (TOF)”, por lo que la CM también se conoce como CyTOF. Para su análisis, las células en suspensión previamente marcadas con anticuerpos acoplados a isótopos de metales pesados estables, una vez adquiridas en el instrumento serán transformadas en una nube iónica al pasar por un plasma de argón generado al interior del equipo, que estará a una temperatura cercana a la del sol (~5,000-9,500°C), los iones serán separados de acuerdo con la relación “masa/carga” por el TOF. Una vez que llegan al detector del equipo, las cuentas iónicas serán convertidas en señales eléctricas y de ahí a una matriz de datos (Bendall et al., 2011,

2012). La CM permite el análisis de 3.6-7.2 millones de células en el lapso de una hora. Además de esto, es posible procesar 20 muestras provenientes de distintos pacientes y analizarlas juntas en un solo tubo a través de la tecnología de “barcoding”, lo que permite análisis cuantitativos simultáneos y la eficiencia del uso de los recursos al reducir tiempos y costos (Mistry et al., 2019).

La generación de perfiles a través de la tecnología CyTOF ha sido ampliamente utilizada en múltiples estudios de farmacodinámica, farmacocinética y de descubrimiento de nuevos fármacos, con el fin de determinar las mejores combinaciones de fármacos y blancos terapéuticos, especialmente en enfermedades autoinmunes y cáncer, incluyendo la evaluación de vacunas (Di Zeo-Sánchez et al., 2021).

Otras patologías en las que la CM ha sido fundamental para su estudio se encuentran el síndrome nefrótico idiopático (Fribourg et al., 2021), melanoma (Zhu et al., 2020), colitis ulcerativa, enfermedad de Chron (Mitsialis et al., 2020), tumores cerebrales (Friebel et al., 2020), y en enfermedades emergentes de preocupación mundial como la enfermedad por el virus del Ébola (McElroy et al., 2020), y COVID-19.

Inicialmente diseñada para analizar muestras en suspensión como tumores líquidos (por ejemplo, leucemia) o tejidos disgregados, la CM ha avanzado para permitir el análisis de tejidos sin alterar su estructura, conocido como Imagenología por Citometría de Masas (ICM). La estructura de los tejidos desempeña un papel crucial en los procesos fisiológicos y patológicos necesarios para comprender la homeostasis normal y el desarrollo de enfermedades. Con la ICM, es posible capturar la heterogeneidad a nivel de células individuales y preservar la orientación espacial de diversos tipos celulares, subclases y estados de activación (como la inflamación). Esto se logra mediante el marcado de proteínas tisulares con anticuerpos acoplados a metales y la ablación láser de tejidos, lo que permite analizar más de 40 marcadores en una sola sección de tejido y generar una clasificación histopatológica más precisa en muestras clínicas, con el potencial de mejorar las pruebas pronósticas. El alcance de aplicación de la ICM es tan amplio como el de la CM convencional, y se utiliza en

el estudio de diversas enfermedades, incluyendo cáncer, diabetes y esclerosis múltiple, entre otras.

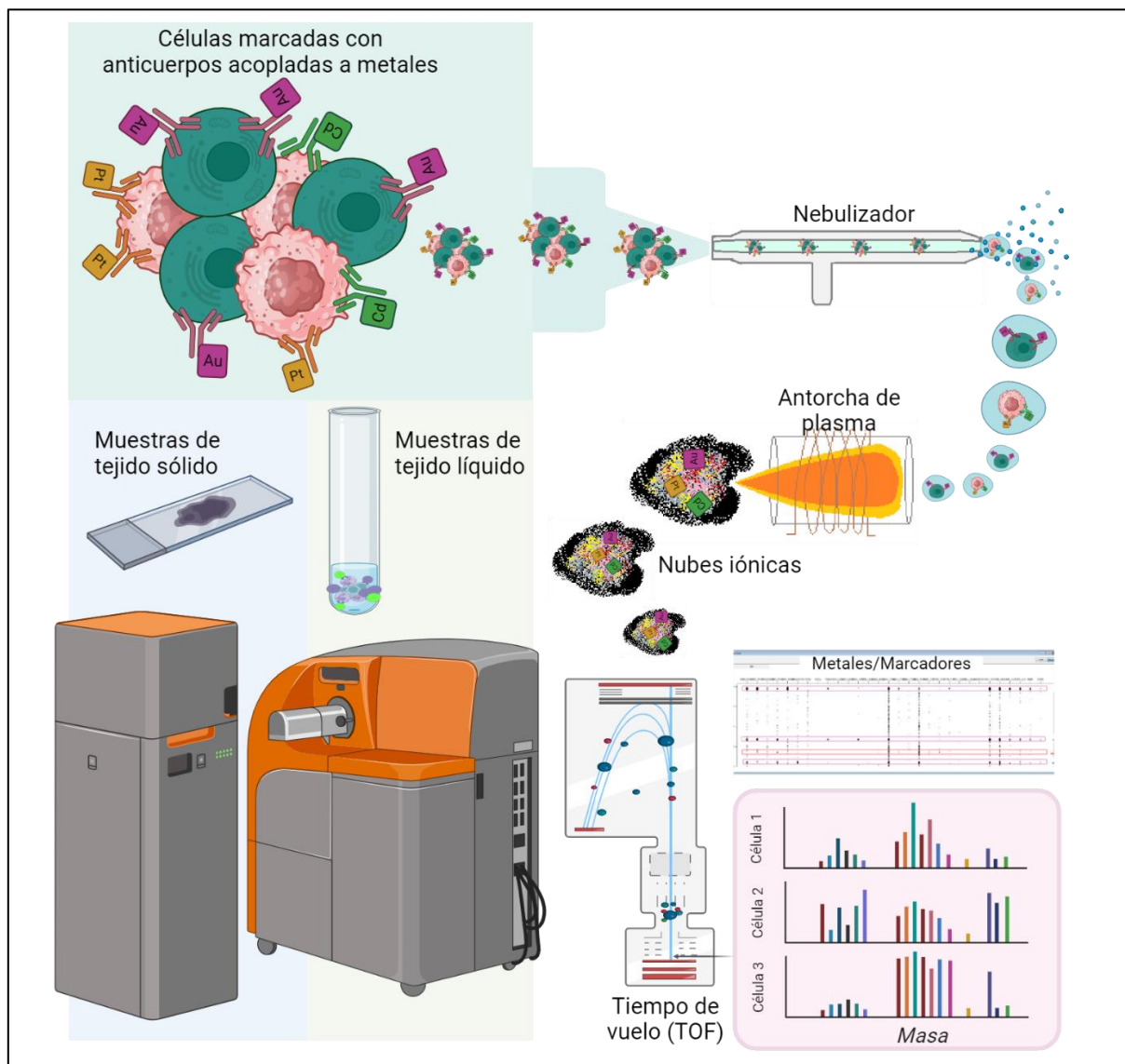


Figura 6. La Citometría de masas y la imagenología por citometría de masas. La citometría de masas se basa en la ionización de células marcadas con anticuerpos acoplados a metales pesados estables, seguido por la separación de los iones en función de su relación masa/carga en un analizador de tiempo de vuelo (TOF). Por otro lado, la imagenología por citometría de masas se basa en el mismo principio, pero incluye la ablación por láser de tejido para generar una clasificación histopatológica precisa en muestras clínicas. Los componentes principales incluyen el citómetro de masas, el plasma de argón para la ionización, los detectores de iones, los láseres, y el software de análisis de datos.

3.2.3.3. Desarrollo de pruebas pronósticas en el cáncer

Gracias a la generación de pruebas estandarizadas en la inmunofenotipificación de leucemias, es posible un diagnóstico más preciso y la identificación de leucemias atípicas. La aplicación de la prueba para medición de enfermedad medible residual (EMR) ha demostrado ser de gran valor pronóstico en la LLA durante los últimos 20 años. En países de economía desarrollada, se ha observado un incremento en las tasas de supervivencia libres de enfermedad que son mayores al 90% y una reducción del 60% en las tasas de mortalidad de leucemias agudas como respuesta a la mejora en la combinación de agentes citotóxicos, el trasplante con células troncales hematopoyéticas, la implementación de sistemas diagnósticos de alta precisión y la detección de EMR. La mayoría de los protocolos de tratamiento actuales de LLA-B incluyen la evaluación de enfermedad mínima/medible residual, los cuales se basan generalmente en el análisis por PCR del rearreglo de genes de receptores de antígenos. El protocolo y panel de Euroflow para evaluación de EMR-LLA-B es totalmente estandarizado y es aplicable en más del 98% de los pacientes, con una sensibilidad menor a 10^{-5} comparable a la detección mediante RQ-PCR (Theunissen et al., 2017) (Theunissen et al., 2017). A pesar de esto, las incidencias globales han incrementado, con el 94% de las muertes relacionadas a esta patología en países de bajo-mediano ingreso. En México y América Latina, la vulnerabilidad a morir por esta enfermedad incrementa de 4-7 veces; teniendo como causas asociadas el fracaso al tratamiento, con altas tasas de recaída temprana. Aún no es posible distinguir un perfil característico entre los niños que recaen de aquellos que alcanzan la remisión (Zapata-Tarrés et al., 2021). Para realizar una adecuada clasificación del riesgo de la enfermedad y establecer un plan personalizado de tratamiento, es indispensable proveer al paciente de un diagnóstico preciso. Los predictores de recaída en LLA infantil incluyen variables clínicas, biológicas, y genéticas basadas en respuesta al tratamiento, así como características inmunofenotípicas, citogenéticas y moleculares (Dai et al., 2021).

En México, al debut de la enfermedad, la frecuencia de pacientes con alto riesgo es cercana al 70%. De los casos al diagnóstico, solo alrededor de 17% muestran

rearreglos genéticos asociados a pronóstico, lo que limita la estratificación de riesgo y pone de manifiesto la necesidad de subclasificar las leucemias y su riesgo considerando otros factores, como lo es el microambiente.

A pesar de que la EMR es una importante herramienta para la toma de decisiones terapéuticas, identificando los casos que requieren intensificación del tratamiento, no provee de información sobre los efectos de la terapia en el microambiente de la MO y su posible relación con la reemergencia de la enfermedad. Se ha sugerido que la generación de perfiles de CEM y otras células estromales de la médula ósea asociados a tratamiento pueden ser poderosas herramientas pronósticas, en conjunto con la evaluación de EMR para pacientes con LLA-B (Oliveira et al., 2022), especialmente en atención a las altas tasas de mortalidad, que es un indicador determinado por las características del paciente y de la enfermedad al diagnóstico, la respuesta al tratamiento y la presencia y severidad de complicaciones. De forma preocupante, la tasa de supervivencia general a 5 años en niños mexicanos con LLA se estima en 61.8% (datos del Seguro Popular en el periodo 2005-2015). Acorde a su estratificación de riesgo, la tasa de supervivencia a 5 años fue de 72.5% para pacientes con riesgo estándar y de 56.9% para pacientes con riesgo alto. Comparando las tasas de mortalidad entre las entidades federativas, Tabasco, Hidalgo, Chiapas, Puebla, Yucatán, Oaxaca y Quintana Roo reportaron los números más altos de defunciones (Muñoz-Aguirre et al., 2021, 2022; Zapata-Tarrés et al., 2021).

La predicción de riesgo de recaída en los pacientes con leucemia implica una combinación de características clínicas, mutaciones somáticas pronósticas y respuesta temprana a la terapia. Estas métricas de predicción de riesgo orientan al clínico sobre la intensidad del tratamiento y a pesar de esto son imperfectas. Más de la mitad de las recaídas ocurren en pacientes no clasificados como de alto riesgo, mientras que aproximadamente el 2-5% de los pacientes mueren debido a toxicidades del tratamiento. Existe debate sobre si las poblaciones resistentes de células cancerosas están presentes en el momento del diagnóstico, o se desarrollan bajo la presión de la terapia; muchos estudios se han inclinado a la primera opción. Durante la remisión, las células cancerosas se reducen a una cantidad indetectable, por lo

tanto, si existen poblaciones pronósticamente predictivas, es razonable suponer que estas células son un subconjunto raro de las células tumorales a granel. Por esta razón, en pacientes con LLA-B es necesario un análisis de alto rendimiento de células individuales para lograr una mejor comprensión de los tipos de células resistentes a la terapia convencional (Sarno & Davis, 2018). A través del uso de la citometría de masas y un panel de 35 anticuerpos que incluía marcadores fenotípicos, funcionales y de transcripción involucrados en el desarrollo de las células B, Good et al. propusieron un enfoque innovador para estudiar la LLA-B basado en la alineación de cada célula cancerosa con su etapa de desarrollo de células B normales más similar. A través de la aplicación de aprendizaje autónomo (machine learning) a las características proteómicas de las poblaciones expandidas, se diseñó un modelo predictivo de recaída denominado Predictor de Recaída Dependiente del Desarrollo (DDPR por sus siglas en inglés) capaz de predecir con precisión el tiempo de recaída en un análisis retrospectivo de la cohorte. El análisis de muestras emparejadas de 7 pacientes al diagnóstico y recaída reveló la persistencia células malignas con una señalización aberrante del receptor de células B pre-B y sus características predictivas en la recaída. Con estos resultados se sugiere que DDPR surge como una herramienta clínica de predicción de riesgos, aumentando el poder predictivo de los métodos actualmente utilizados (Good et al., 2018).

La generación de nuevas pruebas pronósticas que sean de utilidad para las decisiones clínicas basadas en el MAT ha mostrado ser de gran importancia en otros cánceres y en la misma LLA. Con la identificación de marcadores específicos y perfiles de los nichos respecto a la progresión de la enfermedad se podrán generar nuevas herramientas de estratificación de riesgo tomando en cuenta no solo al tumor sino también al componente microambiental, que es de suma relevancia en la patogenia y progresión de la enfermedad.

4. Planteamiento del problema

En países de altos ingresos la sobrevida de los pacientes pediátricos con leucemia aguda es mayor al 90%, en los países de bajos y medianos ingresos como México, es muy baja y con alta variabilidad geográfica. Aún con el uso de pruebas pronósticas como EMR y de tratamientos basados en quimioterapia homologada, los casos de recaída son crecientes y muy tempranos, así como los desenlaces fatales. La necesidad de desarrollar nuevas herramientas que ayuden a predecir el riesgo antes del re-establecimiento de clonas malignas en EMR, es impostergable. Debido a que el microambiente tumoral dentro del nicho leucémico ha sido asociado como un factor primordial en la efectividad del tratamiento y pronóstico de los pacientes con tumores, la generación de perfiles pronósticos basados en el contexto inmunológico, del tumor y las CEM ayudaría a identificar a los pacientes cuyas características microambientales fueran un sustrato fértil para el crecimiento y progresión del nuevo tumor y a presentar EMR detectable.

5. Hipótesis científica

La caracterización y evaluación del microambiente tumoral en el nicho leucémico (Nichescore), incluyendo el análisis del contexto inmunológico y la contribución de las CEM, permitirá identificar perfiles pronósticos del riesgo de EMR detectable en pacientes pediátricos con LLA.

6. Objetivos

6.1. Objetivo General

Caracterizar el microambiente tumoral en el nicho leucémico, incluyendo el análisis del contexto inmunológico y la contribución de las CEM para asociarlo con el riesgo de EMR detectable en pacientes pediátricos con LLA en México.

6.2. Objetivos Particulares

- Caracterizar fenotípicamente, mediante citometría de flujo, aquellas CEM primarias derivadas de aspirado de MO de pacientes pediátricos con LLA
- Evaluar el contexto inmunológico y tumoral mediante el establecimiento de un panel de 43 marcadores por citometría de masas en muestras de sangre total obtenidas de aspirados de MO.
- Correlacionar los perfiles del contexto inmunológico, tumoral y de las CEM con la evolución clínica de los pacientes, específicamente en la evaluación de la presencia de EMR.

7. Material y métodos

7.1. Diseño del estudio

Estudio experimental biomédico longitudinal, observacional, analítico y prospectivo, que explora el uso de la caracterización del contexto inmunológico, el tumor y las CEM en conjunto (Nichescore) para la generación de perfiles pronósticos de riesgo a EMR detectable. La población de estudio está conformada por pacientes pediátricos (niños y adolescentes menores de 18 años), con diagnóstico de leucemia aguda, que hayan sido incorporados al Programa Nacional de Investigación e Incidencia (PRONAI) en Leucemia y por tanto, son sujetos a Inmunofenotipificación estandarizada por Citometría de Flujo al diagnóstico y pruebas pronósticas de Enfermedad Mínima/Medible Residual (EMR) en el Laboratorio de Citómica del Cáncer Infantil. Las muestras de pacientes fueron colectadas en apego a los lineamientos éticos y de acuerdo con las guías institucionales e internacionales, bajo consentimiento informado escrito, el cual fue firmado por los padres o representantes legales (tutores) de los pacientes menores de edad, así como también bajo el asentimiento informado escrito de los menores de edad (8 a 17 años) y fueron tomadas por los médicos especialistas a cargo de los pacientes. Los datos clínicos fueron obtenidos de la información colectada por parte del PRONAI Leucemia, en el Laboratorio de Citómica del Cáncer Infantil, así como por instrumentos aplicados por colaboradores en los hospitales donde se recolectan las muestras (Unidad Médica de Alta Especialidad Hospital de Especialidades Manuel Ávila Camacho, IMSS Puebla, Hospital para el Niño Poblano, Hospital Infantil de Tlaxcala, Hospital de la Niñez Oaxaqueña y el Hospital General de Zona No.1, IMSS)

7.2. Ubicación espacio-temporal

La parte experimental de este proyecto se realizó en su totalidad en el Laboratorio de Oncoinmunología y Citómica del Cáncer Infantil, del Centro de Investigación Biomédica de Oriente del IMSS, ubicado en el Hospital General de Zona No. 5 de Metepec, Delegación Puebla, Puebla, México. La cohorte comprendida en este proyecto consiste de pacientes pediátricos atendidos en los hospitales PRONAI con sospecha de leucemia y que tuvieron la evaluación de inmunofenotipo para diagnóstico

y seguimiento de EMR dentro del Laboratorio de Citómica del Cáncer Infantil de Marzo 2022 a Junio de 2023.

7.3. Estrategia de trabajo

Las etapas que corresponden a este proyecto para lograr los objetivos propuestos son:

1. Obtención de muestras biológicas. Todas las muestras procesadas dentro del laboratorio para inmunofenotipificación de leucemia aguda por citometría de flujo y evaluación de Enfermedad Mediable Residual, que contaban con consentimiento/asentimiento para ser usadas con propósitos de investigación fueron procesadas para su uso posterior en los diferentes proyectos de investigación por parte del Acervo Celular del PRONAI de Leucemia Infantil (Gaspar-Mendoza P, 2024 en preparación) como parte de la Ruta de Incidencia de la Leucemia Infantil, incluido el presente proyecto. Dentro del mismo procesamiento se llevó a cabo la derivación de células estromales mesenquimales primarias a partir de los aspirados de médula ósea y el almacenamiento de muestras para citometría de masas. El procesamiento de las muestras para su uso posterior no forma parte de los objetivos de este proyecto y los detalles pueden ser consultados en Núñez-Enríquez JC & Romo-Rodríguez R, et al., 2024 (Núñez-Enríquez et al., 2024). Tanto los cultivos de células estromales mesenquimales como las muestras para citometría de masas fueron cedidas a este proyecto por parte del equipo responsable del Acervo Celular del PRONAI de Leucemia Infantil.
2. Caracterización de las CEM. Esta etapa incluyó el establecimiento de un panel por citometría de flujo para el análisis fenotípico de las CEM primarias derivadas de aspirados de MO utilizando citometría de flujo.
3. Evaluación del contexto inmunológico y tumoral. Se generó y estableció un panel de 43 marcadores para citometría de masas. Se conjugaron anticuerpos primarios con metales para el panel diseñado. Los protocolos de procesamiento

de la muestra y marcaje con los anticuerpos para citometría de masas fueron establecidos y finalmente, se llevó a cabo el análisis de contexto inmunológico y tumoral, incluida la composición celular y la expresión de marcadores específicos asociados con la leucemia posterior a la adquisición de las muestras en el citómetro de masas.

4. Correlación con la evolución clínica de los pacientes y análisis estadístico. Se correlacionaron los perfiles del contexto inmunológico, tumoral y de las CEM con la evolución clínica de los pacientes, específicamente en la evaluación de la presencia de EMR. Se analizaron los datos para identificar posibles asociaciones entre las características del MAT y el riesgo de EMR detectable

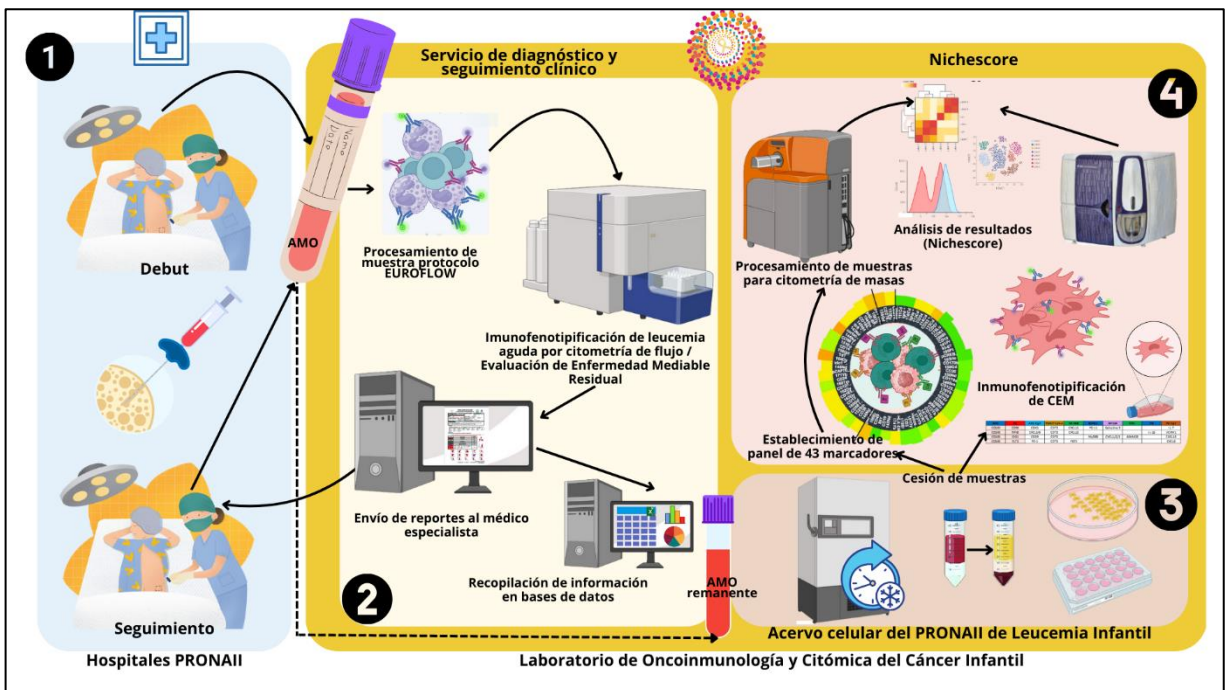


Figura 7. Estrategia experimental.

7.4. Muestreo

7.4.1. Definición de la unidad de población

Pacientes pediátricos con sospecha o confirmación diagnóstica de leucemia linfoblástica aguda de los estados de Puebla, Oaxaca y Tlaxcala que acudan a los hospitales PRONAI y se les haya efectuado un aspirado de médula ósea.

7.4.2. Selección de la muestra

- Muestras almacenadas a -80°C de sangre total de aspirado de médula ósea que cumplan con los requisitos de inclusión, exclusión y eliminación.
- 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 pacientes no leucémicos de los que a partir de inmunofenotipificación por citometría de flujo se descartó la patología (controles), que cumplan con los requisitos de inclusión, exclusión y eliminación.

7.4.3. Criterios de selección de las unidades de muestreo

7.4.3.1. Criterios de inclusión

Los criterios considerados para la solicitud y posterior cesión de muestras por parte del Acervo Celular del PRONAI de Leucemia Infantil son los siguientes:

Citometría de masas

- Aspirados de médula ósea de pacientes pediátricos o adolescentes recientemente diagnosticados con leucemia aguda.
- Aspirados de médula ósea de pacientes pediátricos o adolescentes que se encuentren bajo tratamiento (inducción a la remisión, consolidación y mantenimiento) cuyas muestras sean enviadas para evaluación de enfermedad mínima/medible residual.
- Aceptación de participación en el estudio

Cultivos de células estromales mesenquimales

- Cultivos en fase 2 confluentes, con buena morfología, derivados de aspirados de médula ósea al debut y seguimiento de la enfermedad de los pacientes de la cohorte contemplada en este proyecto.

7.4.3.2. Criterios de exclusión

- Aspirados de médula ósea que tuvieron un inmunofenotipo distinto a leucemia linfoblástica aguda.
- Pacientes con diagnóstico previo de leucemia que interrumpieron su tratamiento.

7.4.3.3. Criterios de eliminación

- Niños, niñas, adolescentes que rechacen participar en el estudio o lo rechacen sus tutores legales.
- Volumen insuficiente de muestras remanente (menor a 1ml)
- Niños, niñas y adolescentes cuyo diagnóstico no sea compatible con leucemia.
- Muestras de aspirado de médula ósea que al ser descongeladas tienen una viabilidad menor al 50% o un número de células viables menor a 1 millón (1×10^6).

7.4.4. Diseño y tipo de muestreo

El proyecto cuenta con un diseño de estudio observacional, de cohorte prospectiva, longitudinal y analítica. El tipo de muestreo empleado es no probabilístico y por conveniencia.

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		Dimensión	Indicador	Índice
Diagnóstico		Inmunofenotipificación de Leucemia Aguda por Citometría de Flujo	Presencia de blastos y tipo de leucemia	% de blastos, linaje afectado
Nicho tumoral	Células Estromales Mesenquimales	Fenotipificación de las CEM	Marcadores de superficie e intracelulares	Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) y % de células positivas e a los marcadores
	Contexto inmunológico	Inmunofenotípica	Perfil de marcadores inmunológicos en las células inmunes	Perfil inmunológico completo, identificación de subpoblaciones celulares
		Funcional	Activación y señalización celular de las células inmunes	Nivel de fosforilación, % de células positivas
	Contexto tumoral	Inmunofenotípica	Perfil de marcadores inmunológicos en el tumor	Perfil inmunofenotípico completo, identificación de subpoblaciones celulares
		Funcional	Activación y señalización celular del tumor	Nivel de fosforilación, % de células positivas
	Evolución clínica		EMR detectable	Presencia o ausencia de enfermedad medible residual
Nichescore		Correlación fenotípica y funcional	Asociación entre perfiles de los componentes del Nichescore y la evolución	Relación entre los perfiles del Nichescore y las EMR

Tabla 1. Variables y escalas de medición del proyecto.

7.6. Método de recolección de datos

Obtención de muestras biológicas:

- -Fuente de muestras: Las muestras utilizadas en este proyecto provienen del Acervo Celular del PRONAI de Leucemia Infantil y contaban con consentimiento/asentimiento necesario para su uso en la investigación. Dentro el procesamiento de las muestras para el acervo, se derivaron CEM y se almacenó una fracción de la muestra para citometría de masas.

Caracterización de las Células Estromales Mesenquimales:

- Panel de citometría de flujo: Se estableció un panel específico de anticuerpos para el análisis fenotípico de las CEM derivadas de aspirados de MO.
- Fenotipificación de las CEM: Las CEM fueron analizadas mediante citometría de flujo para determinar su perfil fenotípico.

Evaluación del Contexto Inmunológico y Tumoral

- Panel para citometría de masas: Se diseñó y estableció un panel de 43 marcadores para citometría de masas.
- Conjugación de anticuerpos: Los anticuerpos primarios fueron conjugados con metales específicos para el panel
- Protocolos de procesamiento y marcaje: Se establecieron protocolos para el procesamiento de muestras y el marcaje con anticuerpos.
- Análisis de citometría de masas: Las muestras fueron adquiridas y analizadas en el citómetro de masas para evaluar el contexto inmunológico y tumoral, incluyendo la composición celular y la expresión de marcadores específicos

Correlación con la Clínica de los pacientes y Análisis Estadístico

- Correlación de perfiles: Los perfiles inmunológicos, tumorales y las CEM obtenidos fueron correlacionados con la evolución clínica de los pacientes.
- Análisis estadístico: Se realizaron análisis estadísticos para determinar la significancia de las correlaciones y las posibles asociaciones identificadas.

7.7. Técnicas y procedimientos

- Muestras biológicas

Aspirado de médula ósea. Procedimiento que consiste en la obtención de tejido hematopoyético mediante la punción y aspiración de la cavidad ósea. La médula ósea se obtiene preferentemente del borde superior de la parte posterior del hueso de la cadera (cresta ilíaca posterosuperior), tanto en adultos como en niños, y es llevada a

cabo por un médico especialista en el quirófano. En primer lugar, se colocará al paciente decúbito lateral o prono, se desinfectará la zona de punción y se administrará un anestésico local. Tras la inserción de una aguja hueca a través del hueso hasta la médula ósea, con una jeringa unida a la aguja se extrae la muestra y se cubre la zona con un apósito estéril. El procedimiento fue efectuado por personal sanitario capacitado dentro de los hospitales de concentración.

- Inmununofenotipificación de Leucemia Aguda por Citometría de Flujo y Evaluación de Enfermedad Medible Residual (EMR)

Las muestras contempladas en este proyecto fueron procesadas dentro del Laboratorio de Citómica del Cáncer Infantil con propósitos de diagnóstico y pronóstico clínico por personal especializado, con los paneles estandarizados del consorcio EUROFLOW. Los detalles de este procesamiento pueden ser consultados en Romo-Rodríguez & Zamora-Herrera et al., 2024 (Romo-Rodríguez et al., 2024). Los datos obtenidos de estas pruebas, así como datos clínicos de los pacientes fueron colectados en las bases de datos del Laboratorio.

- Aislamiento de células estromales mesenquimales y conservación de muestras para citometría de masas

Los remanentes de las muestras fueron procesados por el equipo del Acervo Celular del PRONAI de Leucemia Infantil y los procedimientos pueden ser consultados en Núñez-Enríquez JC & Romo-Rodríguez R, et al., 2024 (Núñez-Enríquez et al., 2024) y Gaspar-Mendoza P, 2024 (en preparación).

❖ **Fenotipificación de CEM**

- Establecimiento del panel para la evaluación del fenotipo

Acorde a resultados previos de nuestro grupo de investigación (Balandrán et al., 2021), se generó un panel de 21 marcadores para citometría de flujo.

El panel diseñado incluye marcadores para la identificación fenotípica de las CEM, así como marcadores de inflamación y de supresión para la estratificación de los nichos formados por las CEM. Se llevó a cabo la estandarización y compensación de las plantillas dentro del programa FACSCorus™ previo a la adquisición de las muestras.

Marcador	Fluorocromo	Localización celular del marcador	Tinción de doble reacción
CD105	APC	Superficial	
CD90	PE	Superficial	
CD73	PerCP-Cy5	Superficial	
CD45	APC-Cy7	Superficial	
PD-L1	BV421	Superficial	
CXCL11	AF488	Superficial	
Galectina-9	BV510	Superficial	
IL-7	PE-Cy7	Superficial	
VCAM1	PE-Cy7	Superficial	
NF-κB	PE	Nuclear	
IL-1β	PB	Intracelular	
CXCL12	AF488	Superficial	
CD39	APC-Cy7	Superficial	
CXCL10	PE-Cy7	Superficial	
MyD88	BV421	Intracelular	
IDO1	PE	Intracelular	
ADAM28	FITC	Intracelular	
FLT3	PE	Superficial	
PD-1	APC-Cy7	Superficial	
CXCL8	PE-Cy7	Superficial	
FGF2	AF488	Nuclear	

Tabla 2. *Panel de anticuerpos para la fenotipificación de CEM.* El panel consta de 21 marcadores distribuidos en 4 tubos, que pueden localizarse superficialmente, intracelular o nuclearmente en la célula. Algunos de los marcadores necesitan una tinción de doble reacción, que implica la unión de un anticuerpo primario a su antígeno celular y la posterior unión de un anticuerpo secundario con la unión covalente al fluorocromo correspondiente.

- Evaluación de fenotipo de las Células Estromales Mesenquimales

Una vez que las CEM en fase 2 alcanzaron la confluencia, se retiró el medio y se lavaron las células con PBS. Se añadieron 4 mL de tripsina 0.05% y se incubaron durante 5 minutos a 37°C, posteriormente se colocaron 4 mL de medio de cultivo en la placa. Se transfirió la suspensión celular a un tubo estéril de 15 mL. Se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante. Se resuspendieron las células en 1 mL de medio D-MEM para realizar el conteo y viabilidad con azul de tripano. Se recolectaron las CEM en tubos de citometría ($1-5 \times 10^5$ células por tubo en 100 μ L de PBS), y se lavaron con 2 mL de PBS. Se agregaron 50 μ L de bloqueador e incubaron 10 minutos. Se añadieron 50 μ L de cocktail de backbones y de superficie correspondiente a la tinción por tubo. Se incubaron 20 minutos y se lavaron con 1 mL de PBS. Se agregaron 100 μ L de cytofix-cyperm e incubaron 20 minutos. Se lavaron con 1 mL de Permwash. Se añadieron anticuerpos primarios e intracelulares. Se incubaron durante 1 hora. Se lavaron con 1 mL de PBS. Se añadieron anticuerpos secundarios e incubaron 30 minutos. Se lavaron con 1 mL de PBS.

Para las tinciones que incorporaron marcadores nucleares, una vez recolectadas las CEM en tubos de citometría, se lavaron con 2 mL de PBS. Se añadieron 50 μ L de bloqueador e incubaron 10 minutos. Se añadieron 50 μ L de cocktail de backbones y de superficie correspondiente a la tinción por tubo. Se incubaron 20 minutos y se lavaron con 1 mL de PBS. Se añadieron 1 mL de True-Nuclear 1X a cada tubo, se colocaron en el vortex y se incubaron a temperatura ambiente por 50 minutos. Se agregaron 2 mL del buffer permeabilizador True Nuclear 1X. Se centrifugaron los tubos a 1500 rpm durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Se repitió una segunda vez. Se resuspendió el botón celular en 100 μ L de True-Nuclear 1X. Se añadieron los anticuerpos intracelulares y nucleares y se incubaron durante 30 minutos. Se agregaron 2 mL del buffer permeabilizador True Nuclear 1X y se centrifugaron durante 5 minutos.

Posterior a las tinciones, se procedió a adquirir las células en el citómetro de flujo BD FACS Melody.

- Análisis de archivos de citometría de flujo

Posterior a la adquisición de las muestras en el citómetro de flujo, los archivos obtenidos (fcs) fueron analizados con el software de análisis FlowJo™ v10.10. El algoritmo de análisis empleado se muestra en la **Figura 8**.

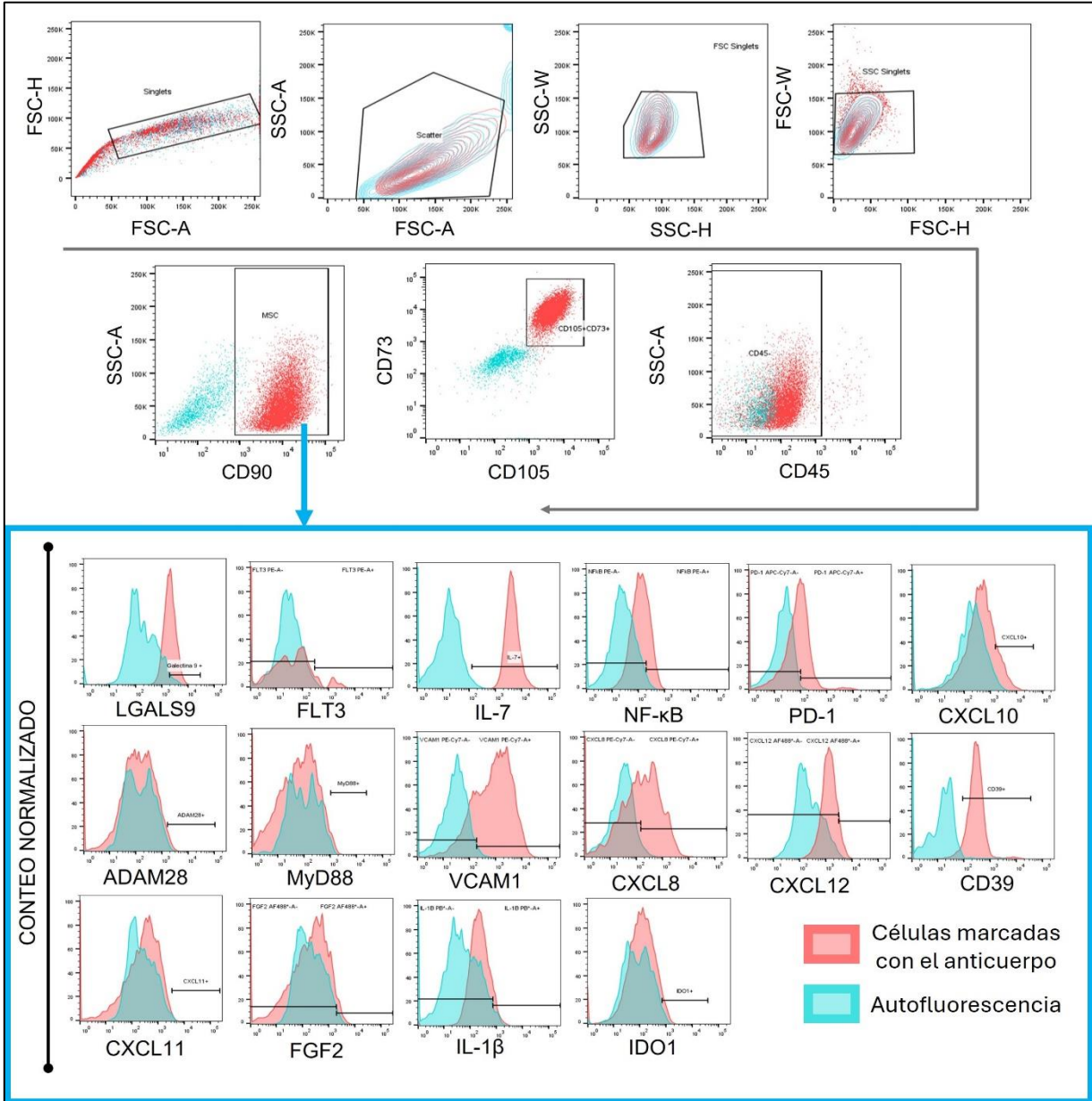


Figura 8. Algoritmo de análisis para el fenotipo de las CEM. La primera parte del algoritmo se basa en la identificación de las CEM por tamaño y complejidad, seguida de la limpieza de la población de restos celulares que puedan interferir con los resultados. Posteriormente se identifica fenotípicamente a las CEM a través de los marcadores CD45(-), CD73(+), CD105(+) y CD90(+). Una vez marcada la población de las CEM se procede a evaluar la positividad de los 18 marcadores restantes haciendo una comparación con la autofluorescencia propia de las células de cada paciente.

Los resultados obtenidos de porcentajes (%) e Intensidades Medias de Fluorescencia (IMF) fueron colectados en una base de datos para los sucesivos análisis estadísticos.

❖ **Evaluación del Contexto Tumoral y Microambiental por citometría de masas.**

- Diseño del panel de 43 marcadores para citometría de masas

Se llevó a cabo el diseño de un panel que contemplara 4 componentes principales: i) la vía de diferenciación de los linfocitos B, ii) las proteínas fosforiladas previamente reportadas (Good et al., 2018) con valor pronóstico de recaída, iii) la identidad tumoral y iv) contexto inmunológico y microambiental. En el diseño del panel, se le asignó un metal a cada marcador de interés cuidando no interferir en la señal de los otros canales disponibles. El panel resultante contempla 43 marcadores (**Tabla 3 y Figura 9**).

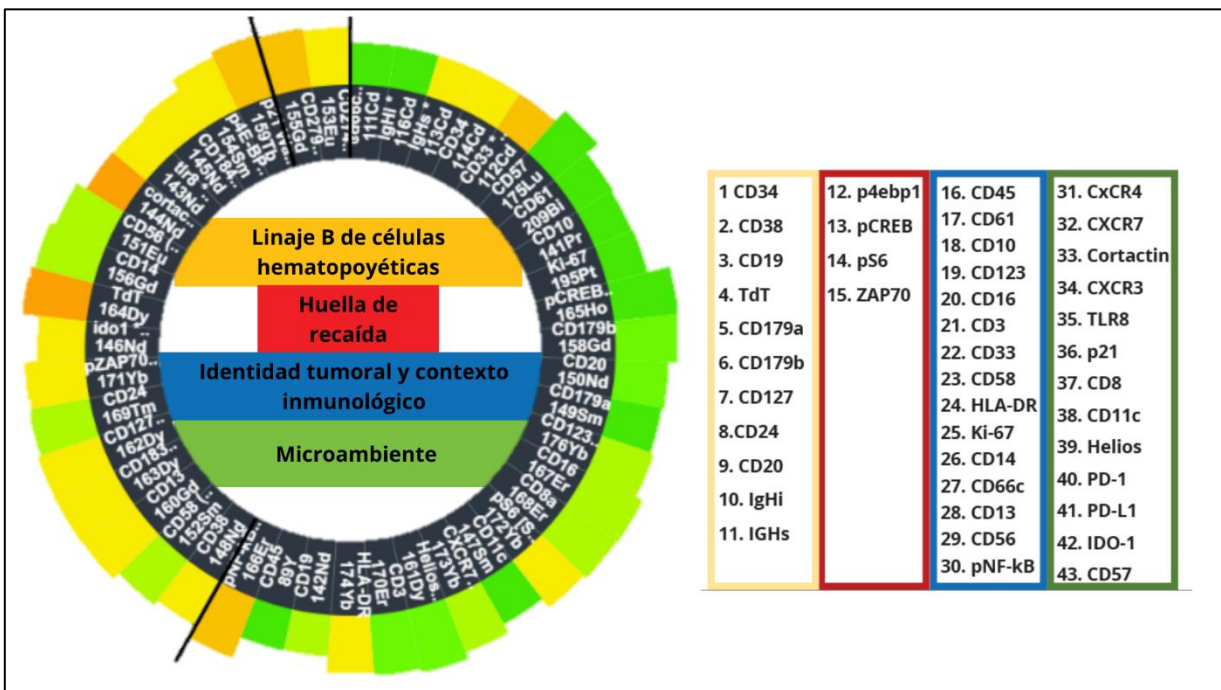


Figura 9. Panel de 43 marcadores para citometría de masas. Panel representado en la rueda de interferencia de los distintos metales acoplados a los marcadores de interés. Las tonalidades verdes de la rueda representan la nula interferencia con otros canales, los tonos amarillos representan una ligera interferencia con otros canales, mientras que los naranjas muestran interferencia con otros canales pero que es resuelta con las apropiadas titulaciones de anticuerpos.

Marcador	Metal	Conjugado/Sin conjugar	Protocolo de conjugación
CD34	Cd	Sin conjugar	Cd
CD38	Nd	Sin conjugar	Ln
CD19	Nd	Conjugado	-
TdT	Dy	Conjugado	-
CD179a	Sm	Conjugado	-
CD179b	Gd	Conjugado	-
CD127 (IL-7Ra)	Dy	Sin conjugar	Ln
CD24	Tm	Conjugado	-
CD20	Nd	Sin conjugar	Ln
p4E-BP1	Sm	Sin conjugar	Ln
pCREB [S133]	Ho	Conjugado	-
pS6 [S235/S236]	Yb	Sin conjugar	Ln
pZAP70 /Syk	Yb	Conjugado	-
CD45	Y	Conjugado	-
CD61	Bi	Conjugado	-
CD10	Pr	Sin conjugar	Ln
CD123 (IL-3R)	Yb	Sin conjugar	Ln
CD16	Er	Sin conjugar	Ln
CD3	Er	Conjugado	-
CD33	Cd	Sin conjugar	Cd
CD58 (LFA-3)	Sm	Sin conjugar	Ln
HLA-DR	Yb	Conjugado	-
Ki-67	Pt	Sin conjugar	Pt
CD14	Gd	Sin conjugar	Ln
CD66c	Cd	Sin conjugar	Cd
CD13	Gd	Conjugado	-
CD56 (NCAM)	Eu	Sin conjugar	Ln
pNF-kB p65 [S529]	Er	Conjugado	-
CD184 (CXCR4)	Nd	Sin conjugar	Ln
CXCR7	Yb	Sin conjugar	Ln
Cortactina	Nd	Sin conjugar	Ln
CD183 (CXCR3)	Dy	Conjugado	-
TLR8	Nd	Sin conjugar	Ln
p21 Waf1/Cip1	Tb	Conjugado	-
CD8	Er	Conjugado	-
CD11c	Sm	Sin conjugar	Ln
Helios	Dy	Sin conjugar	Ln
CD279 (PD-1)	Gd	Conjugado	-
CD274 (PD-L1)	Eu	Sin conjugar	Ln

IDO1	Nd	Sin conjugar	Ln
CD57	Lu	Sin conjugar	Ln
IgHi	Cd	Sin conjugar	Cd
IgHs	Cd	Sin conjugar	Cd

Tabla 3. Marcadores y metales dentro del panel para citometría de masas. De los 43 anticuerpos contemplados en el panel, solamente 17 de ellos eran comercializados conjugados con su metal correspondiente. Los 26 restantes tuvieron que ser conjugados acorde a 3 protocolos distintos dependiendo del tipo de metal que sería asociado al anticuerpo primario. Ln- Protocolo para conjugación de Lantánidos; Cd-Protocolo para conjugación de Cadmio; Pt-Protocolo para conjugación de Platino.

- Conjugación de anticuerpos para citometría de masas

Para la conjugación de los anticuerpos se llevó a cabo el establecimiento de tres protocolos distintos descritos a continuación y basados en protocolos previos del laboratorio de la Dra. Kara Davis de la Universidad de Stanford y de la compañía Standard BioTools™. Todos los anticuerpos primarios fueron medidos previamente con el espectrofotómetro de microvolumen Thermo Scientific NanoDrop One a través del programa de cuantificación de proteínas con medición directa A280/A260.

- Conjugación con Lantánidos

Se utiliza un tubo de polímero MaxPar por cada 100 µg de anticuerpo, y se añaden 95 µL de buffer L. Se mezcla completamente y se añade la solución del metal a conjugar al tubo del polímero MaxPar. Se mezcla y se incuba a temperatura ambiente durante 60 minutos, vortexeando cada 20 minutos. Durante la incubación, se pipetea la cantidad requerida de anticuerpo en una unidad de filtración de 50 kDa, concentrando el anticuerpo si es necesario, y se lleva el volumen total a 400 µL con buffer R, seguido de centrifugaciones y lavados a 12,000 x g con buffer R. Se lleva a cabo la reducción del anticuerpo, diluyendo TCEP y añadiéndolo a la unidad de filtración del anticuerpo, incubando a 37°C durante 30 minutos exactos. Después de la incubación del polímero, se añaden 200 µL de buffer L y se transfiere a una unidad de filtración Amicon Ultra de 3 kDa y se centrifuga durante 25 minutos. Después de añadir TCEP diluido a la unidad de filtración de anticuerpos y de incubar a 37°C, se realizan lavados con buffer C. Posteriormente, se resuspende el polímero cargado de metal en 200 µL de buffer C y se transfiere al tubo de anticuerpo correspondiente, incubando a 37°C durante aproximadamente 90 minutos. Se realizan 4 lavados con buffer W, centrifugando a 12,000 x g por 8 minutos. Se centrifuga a 1000 x g durante dos minutos y se añaden

otros 50 μL de buffer W, pipeteando para mezclar y enjuagar las paredes del filtro. Se invierte la columna en el mismo tubo de recolección. Se centrifuga a 1000 x g durante dos minutos. Se cuantifica la cantidad de anticuerpo y se diluye para una concentración de 0.5 mg/ml o 0.2 mg/ml en buffer W con azida sódica o Solución de Estabilización de Anticuerpos Candor. Se etiqueta y almacena a 4°C.

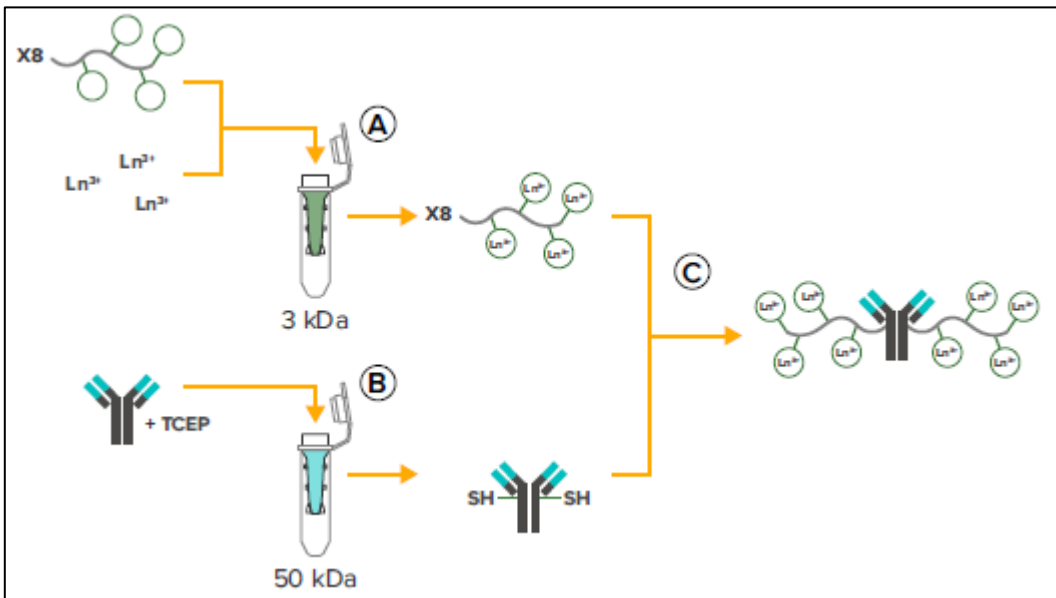


Figura 10. Resumen gráfico de Conjugación de anticuerpo con Lantánidos (Ln). Fuente: Maxpar Antibody Labell User Guide

- Conjugación con Cadmio

Se utiliza un tubo de PCR de MCP9 polymer por cada 100 μg de anticuerpo, y se añaden 87 μL de buffer L. Se mezcla completamente y se añaden 13 μL de solución de metal Cd al tubo de MCP9. Se mezcla y se incuba a 37°C durante 60 minutos, vortexeando cada 20 minutos. Durante la incubación, se etiquetan nuevas unidades de filtración de 3 kDa y se añaden 100 μL de buffer L a cada una. Después de la incubación, se transfiere el contenido del tubo MCP9 a las unidades de filtración etiquetadas y se centrifuga a 12,000 x g durante 25 minutos. Durante el primer lavado del polímero, se recupera el anticuerpo de stock y se etiqueta una nueva unidad de filtración de 50 kDa. Se pipetea la cantidad requerida de anticuerpo en la unidad de filtración de 50 kDa, ajustando el volumen total a 400 μL con buffer R y centrifugando a 12,000 x g durante 10 minutos. Se añade 300 μL de buffer L a la unidad de filtración de 3 kDa para el segundo lavado del polímero y se centrifuga a 12,000 x g durante 30

minutos. Se realizan dos lavados adicionales del anticuerpo con buffer R, centrifugando a 12,000 x g durante 10 minutos cada vez. Se diluye TCEP a una concentración final de 4mM, y se añaden 100 µL de TCEP diluido a la unidad de filtración de anticuerpos, incubando a 37°C durante 30 minutos. Después de comenzar la reducción del anticuerpo, se añade 400 µL de buffer C a la unidad de filtración de polímero y se centrifuga a 12,000 x g durante 45 minutos. Se añade 300 µL de buffer C al anticuerpo, se centrifuga y se repite con 400 µL de buffer C. Se resuspende el polímero cargado de metal en 60 µL de buffer C y se transfiere al tubo de anticuerpo correspondiente, incubando a 37°C durante 90 minutos. Se transfieren los contenidos a una unidad de filtración de 100 kDa, se añaden 200 µL de buffer W y se centrifuga a 5,000 x g durante 10 minutos. Se realizan cuatro lavados adicionales con buffer W, centrifugando a 5,000 x g durante 10 minutos cada vez. Se cuantifica la cantidad de anticuerpo utilizando Nanodrop y se ajusta a una concentración final de 0.5 mg/ml o al menos 50% HRP. Se etiqueta y almacena a 4°C.

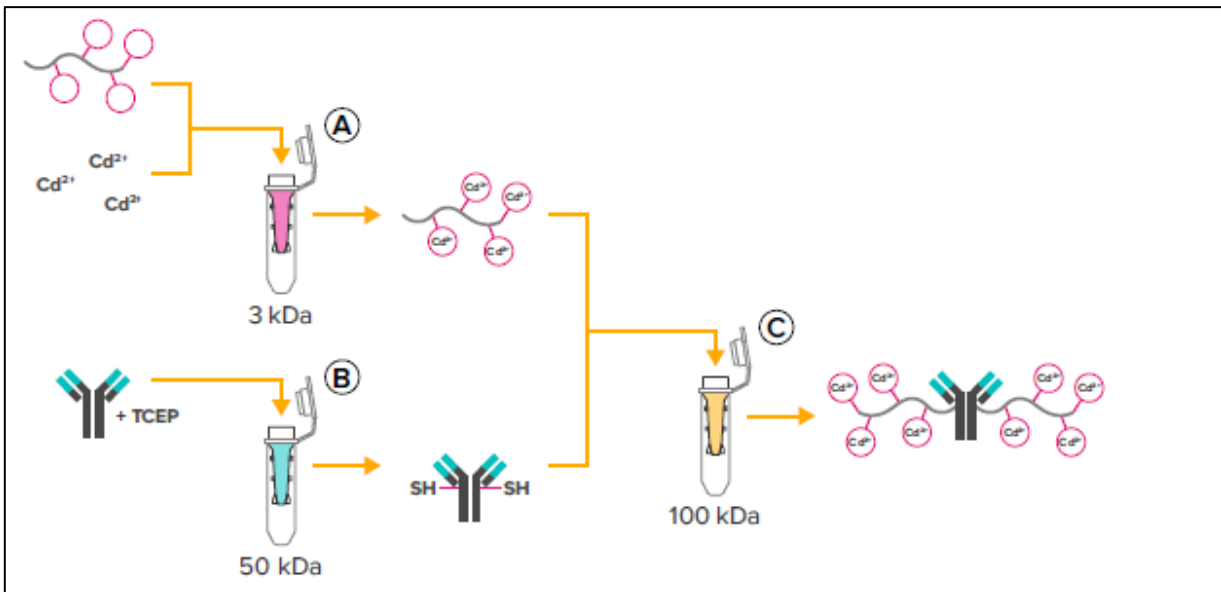


Figura 11. Resumen gráfico de Conjugación de anticuerpo con Cadmio (Cd). Fuente: Maxpar Antibody Labell User Guide

- Conjugación con Platino

Para la conjugación de anticuerpos con platino, se pipetea la cantidad requerida de anticuerpo en una unidad de filtración de 50 kDa etiquetada, y si el volumen excede

los 500 μL , se centrifuga a 12,000 x g durante 10 minutos para concentrar el anticuerpo, repitiendo según sea necesario hasta cargar todo el anticuerpo. Se lleva el volumen total a 400 μL con buffer R y se centrifuga la unidad de filtración de anticuerpos a 12,000 x g durante 10 minutos, descartando el flujo. Se añaden 400 μL de buffer R y se centrifuga nuevamente a 12,000 x g durante 10 minutos, descartando el flujo. Se diluye 0.5M TCEP añadiendo 992 μL de buffer R a 8 μL de 0.5M TCEP en un tubo nuevo. Se añaden 100 μL de TCEP diluido a cada unidad de filtración de anticuerpos, se mezcla brevemente por vortex y se incuba a 37°C durante 30 minutos. Luego, se añaden 300 μL de buffer C, se centrifuga a 12,000 x g durante 10 minutos y se descarta el flujo. Se añaden 400 μL de buffer C a la unidad de filtración de anticuerpos y se centrifuga nuevamente a 12,000 x g durante 10 minutos, descartando el flujo. Se resuspende el anticuerpo en 960 μL de buffer C, se transfieren todos los contenidos a un tubo limpio de 1.5 mL, y se añaden 20 μL de isótopo de Pt en DMSO a la solución de anticuerpo, incubando durante 60-90 minutos en un baño de agua a 37°C. Luego, se pipetea 450 μL de solución en una unidad de filtración de 30 kDa limpia y se centrifuga a 17,500 x g durante 10 minutos, repitiendo hasta concentrar todo el anticuerpo. Se añaden hasta 400 μL de buffer W y se centrifuga a 17,500 x g durante 10 minutos, descartando el flujo. Este paso se repite tres veces más con 400 μL de buffer W, centrifugando a 17,500 x g por 10 minutos y descartando el flujo. Se añaden 50 μL de Candor Buffer, pipeteando para mezclar y enjuagar las paredes del filtro, posteriormente se invierte la columna en un tubo de recolección nuevo y se centrifuga a 1000 x g durante dos minutos. Se añaden otros 50 μL de Candor Buffer, se pipetea para mezclar y enjuagar las paredes del filtro, se invierte la columna en el mismo tubo de recolección y se centrifuga a 1000 x g durante dos minutos, obteniendo un volumen de aproximadamente 120 μL . Se mide el anticuerpo y se diluye a la concentración deseada en Solución de Estabilización de Anticuerpos Candor. Finalmente, se etiquetan los tubos y se almacenan a 4°C.

- Procesamiento de muestras para citometría de masas.

Los remanentes de aspirado de médula ósea empleados para diagnóstico fueron almacenados a -80°C hasta su uso. Posterior a la identificación de las muestras de

interés, estas fueron recuperadas de su criopreservación y resuspendidas en medio RPMI suplementado con 10% de SFB y 1% de antibiótico. Posteriormente fueron teñidas con Cisplatina (198Pt) en medio RPMI libre de suero para la tinción de viabilidad. A continuación, se llevó a cabo la fijación de las muestras con Fix I Buffer. Para evitar la unión no específica de los anticuerpos, las muestras fueron incubadas con Human TruStain FcX, Con las células resuspendidas en una concentración de 1-3 millones de células por tubo, se agregó el cocktail superficial compuesto por 28 anticuerpos (CD19, CD3, CD56, CD11c, PD-1, CD57, IgHs, CD38, CD127, CD45, CD123, CD16, CD58, CD14, CD66c, CD34, CD24, CD33, CXCR7, CXCR3, PD-L1, CD20, CD61, CD10, HLA-DR, CD13, CXCR4, CD8) resuspendidos en Cell Staining Buffer. Posteriormente se llevó a cabo la lisis de los eritrocitos de las muestras con BD FACS Lysing Solution. Se llevó a cabo una segunda fijación y se agregó el cocktail de 7 anticuerpos intracelulares (Cortactina, Ki-67, IgHi, CD179a, CD179b, TLR8, IDO1). Se dejaron durante la noche resuspendidas en metanol a -80°C para la permeabilización de las células. Al día siguiente se llevó a cabo la tinción intracelular y de proteínas fosforiladas (Helios, pCREB, pS6, p21, pZAP70, pNF- κ B, TdT, p4EB-P1). Al finalizar el proceso tinción las células fueron resuspendidas con Ir191, Ir193 para la identificación de ADN. Fueron resuspendidas en Cell Acquisition Solution con perlas de calibración al 10% y finalmente adquiridas en el citómetro de masas CyTOF Helios previamente estandarizado y con los parámetros de calidad aprobados.

- Conteo celular y viabilidad

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

- Análisis de archivos de citometría de masas

El análisis de los archivos provenientes de las muestras adquiridas por citometría de masas se llevó a cabo en los programas FCS ExpressTM 7 Research Edition y FlowJoTM

v10.10. El algoritmo empleado para la identificación de poblaciones se muestra en la Figura 12 y se divide en 3 partes: limpieza de la muestra para la identificación de las señales correspondientes a células vivas, la identificación de la vía de maduración de las células B en la búsqueda de las células tumorales, y la fenotipificación del componente inmunológico.

Además de la identificación de las poblaciones celulares, se hizo la evaluación funcional de las células a través de la expresión de las proteínas fosforiladas dentro del panel y otros marcadores de regulación microambiental e inmunológica.

7.8. Análisis de datos

El análisis estadístico se generó con el software GraphPad Prism 10.0.2 para Windows.

7.9. Diseño estadístico

7.9.1. Hipótesis estadística

Las huellas microambiental, tumoral e inmunológica serán distintas entre los pacientes con EMR detectable y no detectable.

7.9.2. Pruebas estadísticas

Para las pruebas estadísticas de este proyecto se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. El riesgo relativo (RR) y el intervalo de confianza del 95% (IC) se calcularon con la puntuación asintótica de Koopman. La prueba de Pearson se utilizó para determinar las correlaciones entre las firmas. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

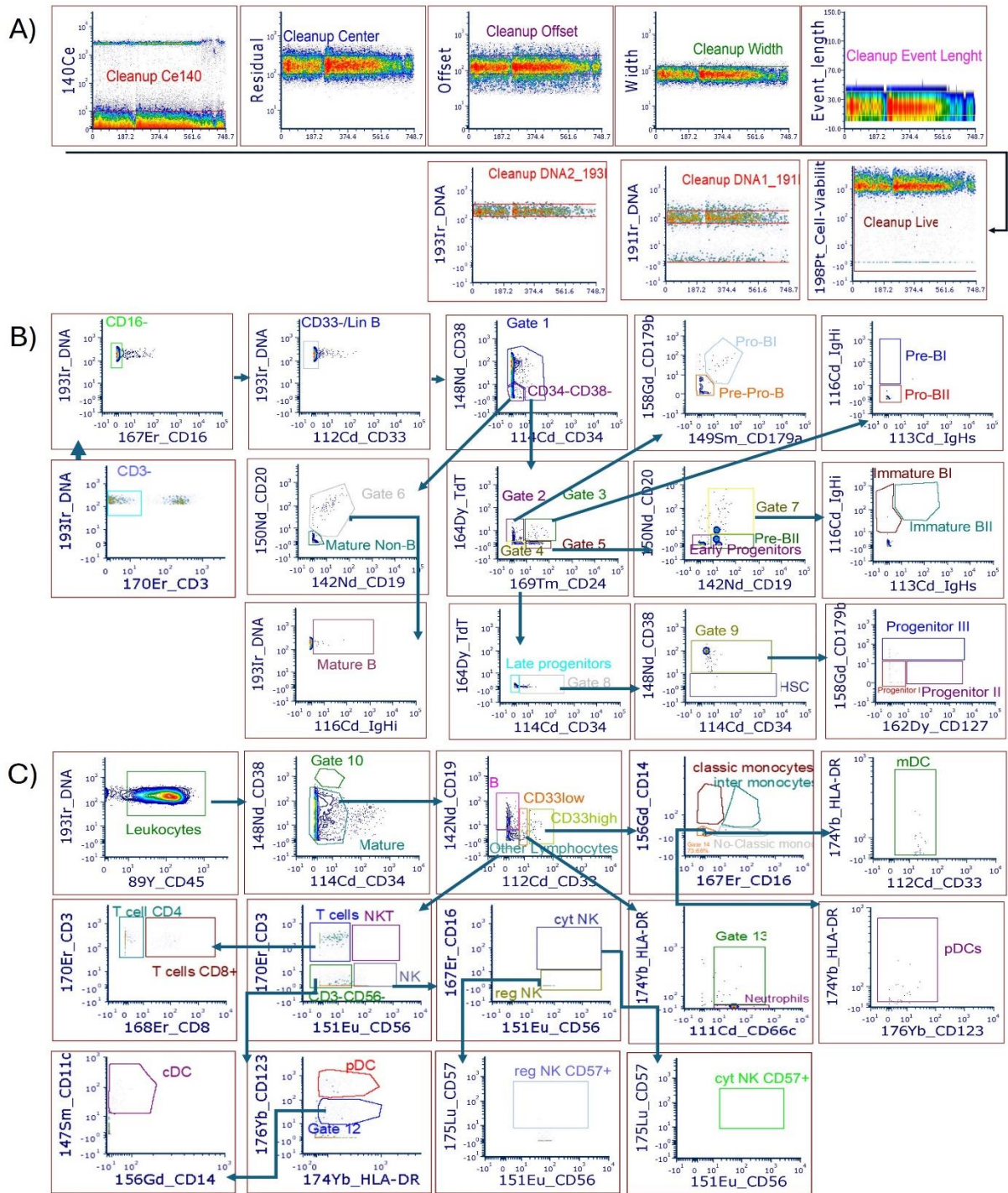


Figura 12. Algoritmo de análisis para la identificación de poblaciones celulares. Para poder llevar a cabo la apropiada identificación de las células de interés, se debe realizar la limpieza de los eventos (A) a través de los parámetros Ce140, Residual, Offset, Width, Event Length, 198 Pt (viabilidad celular) y 191/193 Ir (intercaladores de ADN). Una vez limpia la población de eventos correspondientes a “células vivas”, se pueden identificar las distintas poblaciones en la vía de maduración de las células B (B), así como las distintas poblaciones inmunológicas que acompañan el tumor (C). Con esta estrategia de análisis se pueden identificar hasta 35 poblaciones celulares distintas

8. Resultados

Comportamiento epidemiológico de la leucemia en la región de Puebla, Oaxaca y Tlaxcala

La cohorte considerada en este proyecto incluye a pacientes con inmunofenotipo diagnóstico de leucemia aguda por citometría de flujo, que además fueron seguidos en el tiempo con evaluación de EMR, con un total de 159 pacientes provenientes de 5 hospitales de los estados de Puebla, Oaxaca y Tlaxcala. Al dividir los casos por rango de edad (**Figura 13-A**) se observa que la mayor frecuencia de casos se encuentra en el rango de 10-14 años, sin embargo, pareciera que la frecuencia se mantiene en los otros grupos con excepción del rango de 15-18 años, donde la frecuencia es menos de la décima parte. Esto contrasta con lo reportado previamente a nivel mundial, donde suele observarse un pico en el rango de 0-4 años (Bernaldez-Rios et al., 2008). El sexo masculino fue ligeramente más frecuente con 51.57% de los casos (**Figura 13-B**) y la LLA-B represento el 78.2% (**Figura 13-C**), siendo la de mayor prevalencia, tal como se reporta en el resto del mundo (He et al., 2024). En la subestratificación de los tipos de leucemia se observan las siguientes frecuencias: 40.25% de LLA-ProB, 26.42% de LLA-ProB-PreB, 11.95% de LLA-PreB. La LMA es la tercera más frecuente con 16.98% de los casos. El 3.14% corresponde a LLA-T. Durante este periodo (Marzo 2022 a Junio 2023) solamente hubo 1 caso de Leucemia Aguda de Fenotipo Mixto (LAFM) y otro caso de Neoplasia Blástica de Células Dendríticas Plasmocitoides (NBCDP) que corresponden al 0.63% de casos, respectivamente. La frecuencia de los subtipos de leucemia acorde a la edad muestra un aumento de LLA-B conforme aumenta la edad hasta el grupo de 10-14 años, donde la mayoría de los subtipos tiene su pico de incidencia, con excepción de las LLA-ProB-PreB que muestran un comportamiento inversamente proporcional al incremento de edad (**Figura 13-D**). Es importante mencionar que los casos reportados representan en gran medida la epidemiología de estos 3 estados dado que se reciben las muestras de casi todos los casos con sospecha de leucemia de los hospitales PRONAI, que son los principales centros de atención para los pacientes pediátricos con leucemia en esta región.

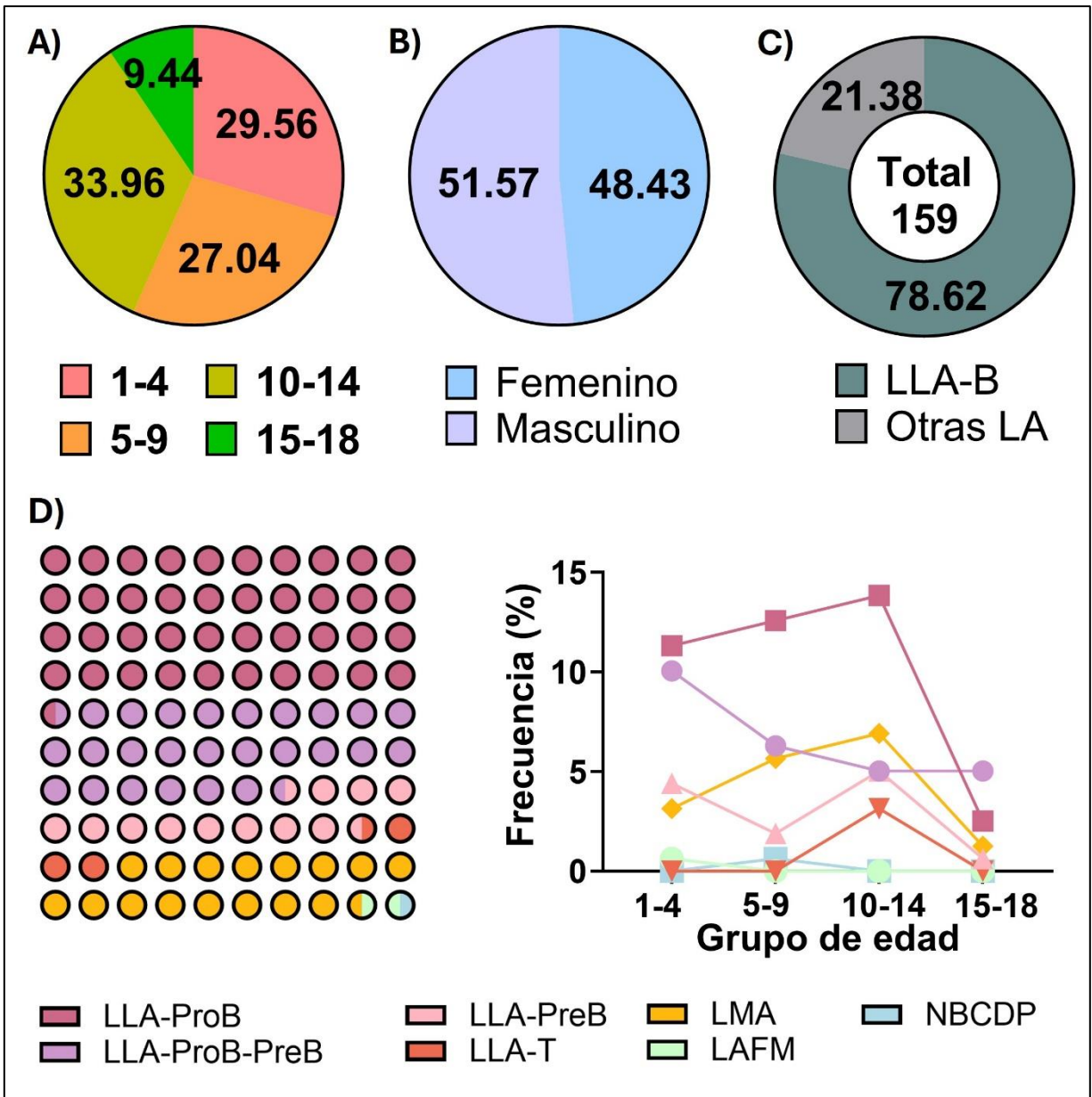


Figura 13. Epidemiología de la leucemia en población pediátrica de Puebla, Oaxaca y Tlaxcala. Distribución de casos de acuerdo a grupos de edad (A), sexo (B), LLA-B vs otras LA (C), subtipos de LA y subtipos de LA por grupos de edad (D). LLA, Leucemia Linfoblástica Aguda; LMA, Leucemia Mieloide Aguda; LAFM, Leucemia Aguda de Fenotipo Mixto; NBCDP, Neoplasia Blástica de Células Dendríticas Plasmocitoides . * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. La figura D muestra la distribución de frecuencia de las leucemias en el 100% de la cohorte, donde cada bola es equivalente a 1%. n casos de LA=159.

La edad incrementa el riesgo relativo de Enfermedad Residual

Se realizó el cálculo de Riesgo Relativo (RR) a EMR en la búsqueda de identificar grupos con mayor susceptibilidad a eventos adversos (**Figura 14**).

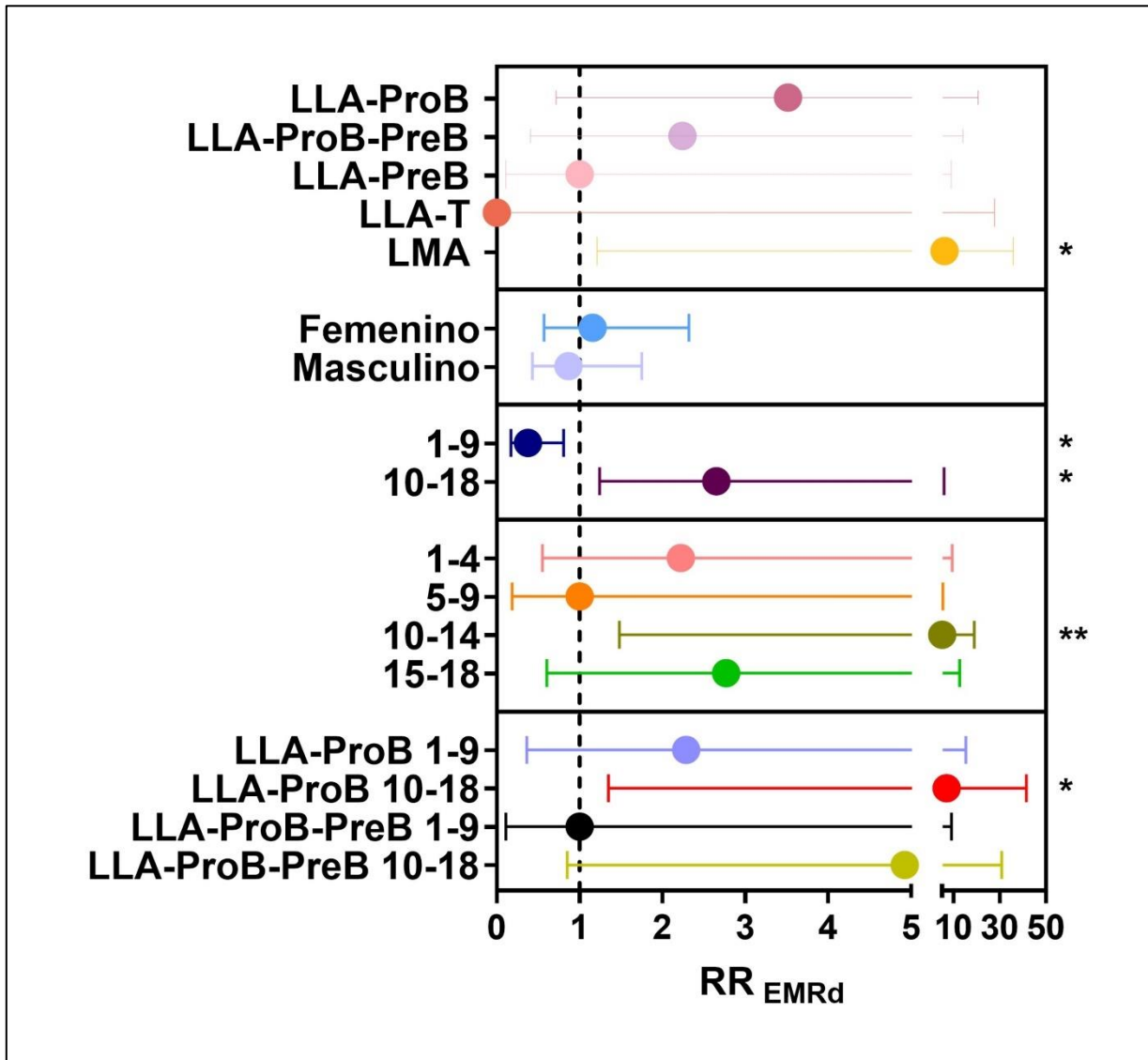


Figura 14. Riesgo relativo (RR) de Enfermedad Medible Residual detectable (RR_{EMRd}). Los valores de RR se calcularon por clasificación de inmunofenotipo (cada grupo vs PreB-LLA), sexo (hombres vs mujeres), grupo de edad I (cada grupo de edad vs grupo de 5-9 años) grupo de edad II (1-9 vs 10-18 años), y por clasificación en cada grupo de edad (cada grupo vs el grupo ProB-PreB-LLA de 1-9 años). LLA, Leucemia Linfoblástica Aguda; LMA, Leucemia Mieloide Aguda; EMR, Enfermedad Medible Residual; EMRd, EMR Detectable. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. El gráfico de RR muestra el valor de RR \pm intervalos de confianza del 95%.

El cálculo de RR_{EMRd} se basó en las variables de subtipo de LA, edad, sexo y la combinación de subtipo de LA con edad. El mayor RR por subtipo de leucemia lo tuvo la LMA con un incremento de riesgo de 6.067, seguida de la LLA-ProB con 3.514. El sexo no representó un incremento de RR de uno sobre otro. Por otro lado, para la edad se realizaron 2 clasificaciones. En la primera se consideraron 2 grupos, de 1-9 años y de 10-18, teniendo este último un RR de 2.649 mayor que el 1-9 años. En la segunda consideraron los 4 grupos previamente mencionados (1-4, 5-9, 10-14 y 15-18), siendo el grupo de 10-14 años significativamente el de mayor RR. Cuando se comparó el RR de los subtipos de leucemia más frecuentes acorde a los dos grupos de edad de la primera clasificación, se observó que tanto la LLA-ProB como la LLA-ProB-PreB en el grupo de 10-18 años presentan un incremento de RR de hasta veces más riesgo que sus contrapartes de edad. En conjunto esto demuestra que los adolescentes de 10-18 años tienen mayor RR de presentar EMRd, lo que en la clínica representa una falla del tratamiento, que tiene como consecuencia la intensificación de este y un incremento en el riesgo de recaída.

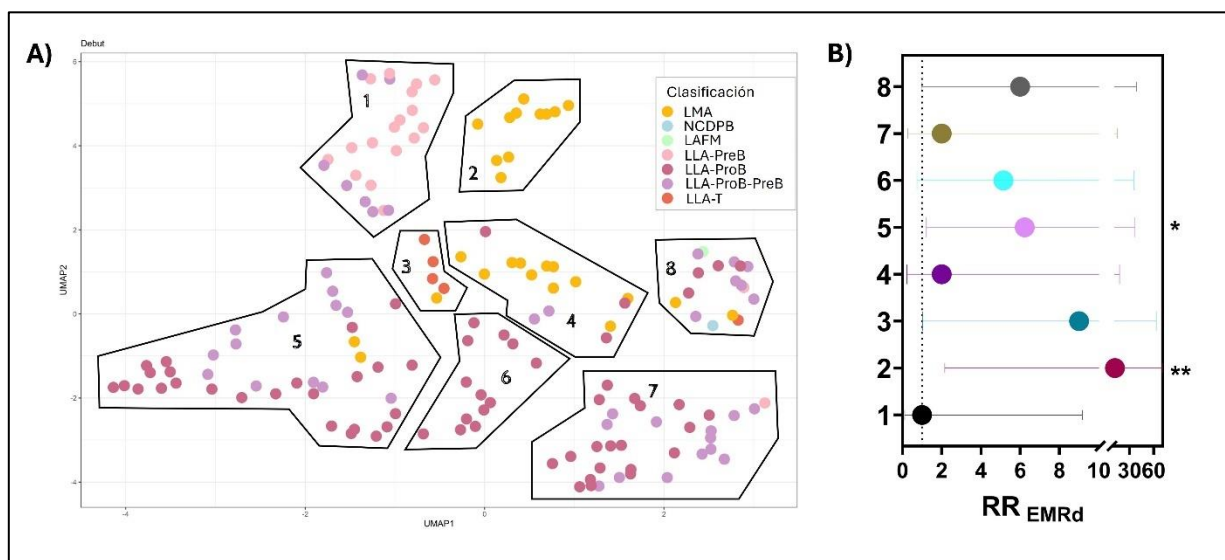


Figura 15. Búsqueda de perfiles leucémicos con valor pronóstico a través de UMAP. Clusterización no supervisada de los 159 casos de LA a través de UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection). A) Identificación de 8 clusters de LA a partir de la edad, frecuencias celulares de poblaciones hematopoyéticas normales y leucémicas, y niveles de expresión de marcadores de inmunofenotipo basados en la intensidad de fluorescencia. B) Riesgo relativo de EMR detectable (RR_{EMRd}) de los 8 clusters UMAP (cada grupo vs grupo 1). UMAP, Uniform Manifold Approximation and Projection; RR, Riesgo Relativo; EMR, Enfermedad Medible Residual; EMRd EMR Detectable. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. El gráfico de RR muestra el valor de $RR \pm$ intervalos de confianza del 95%.

La categorización basada en el algoritmo UMAP permite la identificación de un subgrupo de mal pronóstico en las leucemias ProB.

A través del uso del algoritmo de reducción de dimensionalidad UMAP, el cual se basó en la generación de clústeres basados en los factores edad, expresión de proteínas de las células leucémicas provenientes de los marcadores evaluados con la estrategia EUROFLOW y las frecuencias de poblaciones hematopoyéticas patológicas y residuales detectadas al diagnóstico, se identificó la presencia de 8 clústeres distintos entre sí (**Figura 15-A**). Después de la formación de clústeres se hizo un análisis de RR_{EMRd} (**Figura 15-B**). El primer clúster está formado en su mayoría por casos de LLA-PreB y algunos ProB-PreB. Este clúster presentó los menores casos de EMRd y por esta razón fue usado como referencia para el RR de los demás grupos. El clúster 2 se formó completamente con casos de LMA que también se ubicaron en el grupo 4, a pesar de esto el clúster 2 presentó mayor RR de todos los clústeres (12.00). El grupo 3 contenía principalmente casos de LLA-T y un caso de LMA y un valor de RR de 9.00, aunque sin significancia estadística. Los grupos 5, 6 y 7 fueron los clústeres donde se agruparon principalmente los casos de ProB y ProB-PreB. Es de particular interés el hecho de que a pesar de tener los mismos fenotipos de leucemia, el grupo 5 tenía un mayor riesgo estadísticamente significativo, con un aumento de 6.231 veces en comparación con el aumento de 2 veces en el grupo 7 y de 5.143 del grupo 6. El clúster 8 fue conformado por casos de todos los subtipos de leucemia y de manera importante fue el grupo con la menor frecuencia de blastos y la mayor frecuencia de linfocitos B, linfocitos T y células NK.

Perfil de nicho supresor caracteriza a las leucemias ProB y ProB-PreB

A través de la evaluación del nivel de expresión de marcadores evaluados en las CEM por citometría de flujo, se observó un perfil fenotípico diferencial entre los subtipos de LLA-B. Por medio de la expresión positiva de CD105, CD73, CD90 y negativa de CD45 para identificar a las CEM y el posterior análisis de los otros marcadores del panel diseñado, se observó en las CEM ProB y ProB-PreB una tendencia a perfil supresor, caracterizado por la expresión de CXCL11, Galectina-9 (LGALS9), CD39 e indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO1), a diferencia de las PreB (**Figura 16-A**).

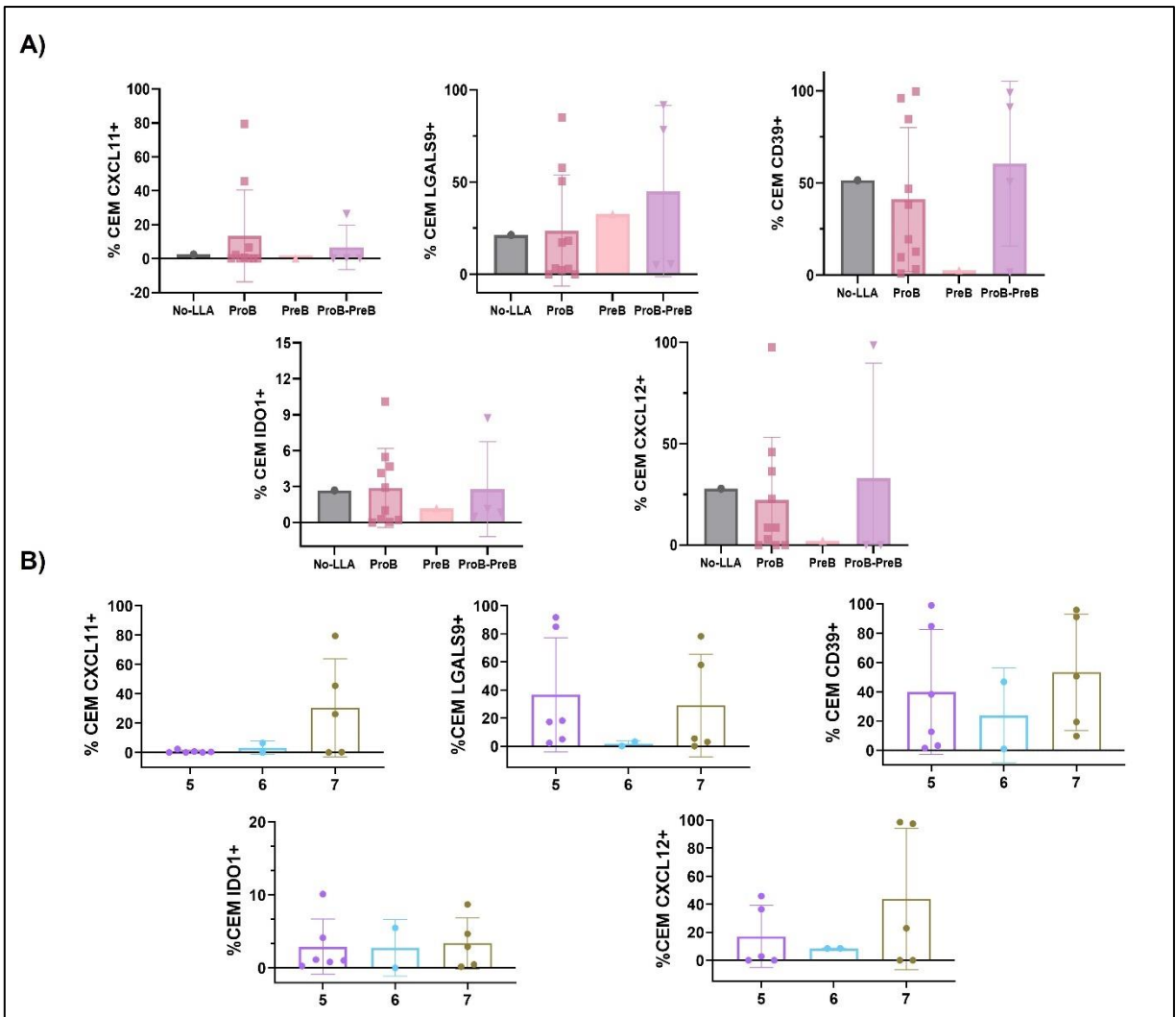


Figura 16. Perfiles microambientales de las CEM de pacientes pediátricos con leucemia. A) Evaluación fenotípica de las CEM estratificadas por subtipos de LLA-B y CEM no leucémicas. No LLA = 1, ProB = 10, PreB = 1, ProB-PreB = 4. B) Porcentaje de CEM que expresan CXCL11, LGALS9, CD39, IDO1 y CXCL12 en los clústeres 5 (n=6), 6 (n=2) y 7 (n=5) según la subclasificación UMAP para los subtipos ProB, ProB-PreB y PreB. LLA-B, leucemia linfoblástica aguda de precursor de células B; CEM, células estromales mesenquimales; CXCL, ligando de quimiocina (motivo C-X-C); LGALS9, galectina 9; IDO, indoleamina 2,3-dioxigenasa. Los gráficos de barras muestran la media \pm desviación estándar.

Para correlacionar la caracterización fenotípica de las CEM con perfiles de riesgo, se buscó el perfil estromal mesenquimal de los grupos representados en el análisis UMAP (**Figura 16-B**). Mientras que CXCL11 fue aparentemente un marcador para el grupo 7, LGALS9 y CD39 mostraron la menor expresión en el grupo 6. En contraste, los grupos 5 y 7 exhibieron altos porcentajes de CEM positivas para estos marcadores,

sugiriendo que pueden promover condiciones supresoras en algunas ProB y ProB-PreB-ALL.

La huella tumoral, microambiental y de contexto inmunológico genera un perfil de riesgo para pacientes pediátricos

Dado que la LLA-B es la más frecuente y el objetivo de este proyecto, nos enfocamos en los clústeres 5-7 para la evaluación de un primer perfil preliminar de Nichescore.

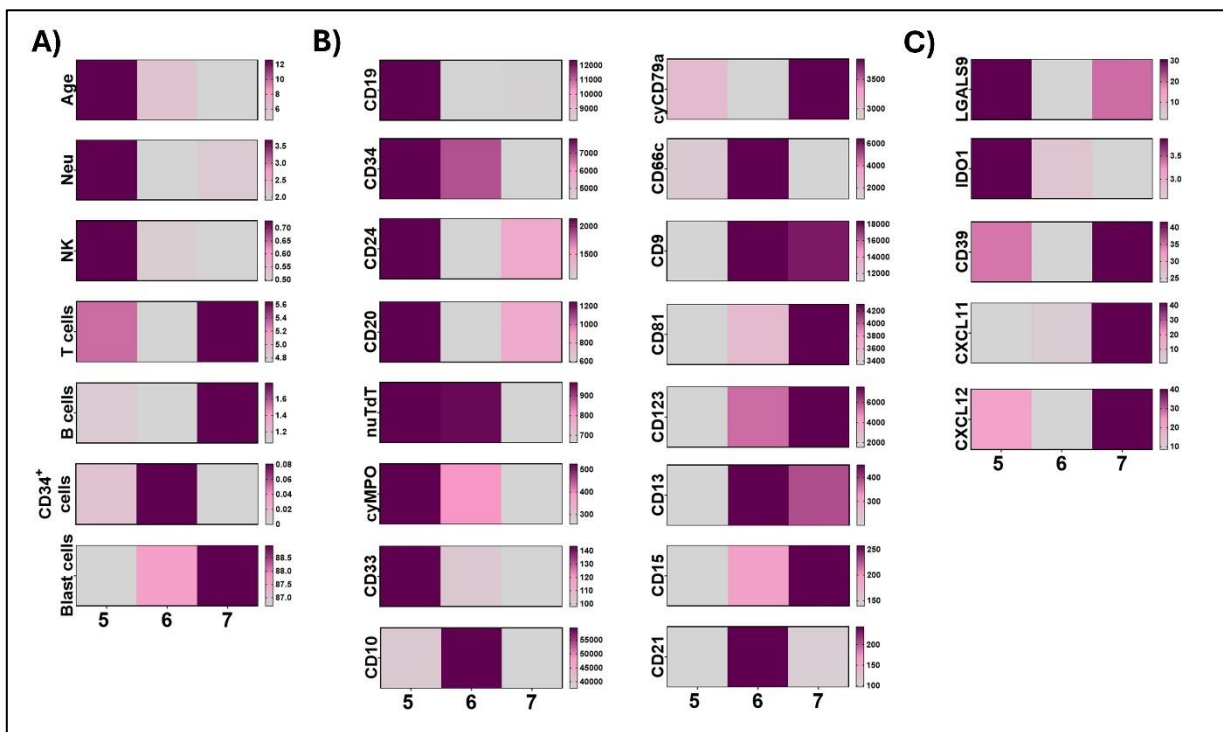


Figura 17. Huella tumoral, inmunológica y microambiental de la LLA-ProB. Mapas de calor basados en el inmunofenotipo por citometría de flujo y el fenotipo de las CEM, considerando el contexto inmunológico (A), la identidad tumoral (B) y el fenotipo estromal mesenquimal (C) dentro de los clústeres 5 a 7 del UMAP. Se muestran las medias de edad, frecuencia de poblaciones celulares hematopoyéticas, IMF de los marcadores de células tumorales y el porcentaje de CEM que expresan marcadores. UMAP, Uniform Manifold Approximation and Projection; NK, Natural Killer; IMF, Intensidad Media de Fluorescencia; nuTdT, Transferasa Desoxinucleotidil Terminal nuclear; MPO, Mieloperoxidasa; CXCL, Quimiocina (motivo C-X-C) ligando; IDO1, Indoleamina-pirrol 2,3-dioxigenasa; cy-, citoplasmático; sm-, membrana superficial; CD, Clúster de diferenciación.

El grupo 5, con el RR más alto entre estos clústeres, fue caracterizado por la tasa más alta de MRD. Este grupo estuvo conformado predominantemente por pacientes mayores de 10 años, mostrando una tendencia a un aumento de la frecuencia de neutrófilos y células NK y una menor carga de blastos, en comparación con los valores de los grupos 6 y 7 (**Figura 17-A**). Al analizar el inmunofenotipo de las células tumorales dentro de este grupo, se registró una tendencia al alza en los niveles de expresión de CD19, CD34, CD24, CD20, nuTdT, cyMPO y CD33 (**Figura 17B**). Por el contrario, hubo una tendencia a la baja en la expresión de los marcadores CD9, CD81, CD123, CD13, CD15 y CD21. En cuanto al perfil microambiental, los casos del grupo 5 mostraron una tendencia hacia una mayor expresión de LGALS9 e IDO, junto con una menor expresión de CXCL11 en sus CEM, en comparación con sus contrapartes de los grupos 6 y 7 (**Figura 17C**).

Estratificación retrospectiva del nicho estromal mesenquimal al diagnóstico acorde a la EMR de los pacientes.

Con la evaluación fenotípica de las CEM que fueron aisladas de aspirados de médula ósea, se seleccionaron aquellas en las que se había tenido la muestra de seguimiento de los pacientes con la evaluación de EMR (n=7), estratificando de esta manera los pacientes entre EMRd y EMRnd (**Figura 18**). Los resultados, sin significancia estadística, muestran una tendencia de perfil inmunosupresor en los pacientes con EMRnd, por la expresión de LGALS9, PD-1, IDO1 y CD39, así como una tendencia a una mayor expresión de las quimiocinas CXCL8 y CXCL10.

En cuanto a las CEM de pacientes con EMRd (n=2), se observó un incremento en la expresión de CXCL11, FLT3 y FGF2, aunque con un error estándar de la media (SEM) considerable en el caso de CXCL11 y FGF2, que podría deberse a que un paciente corresponde a LLA-ProB y el otro a LLA-PreB, siendo el primero el de mayor expresión de estos marcadores.

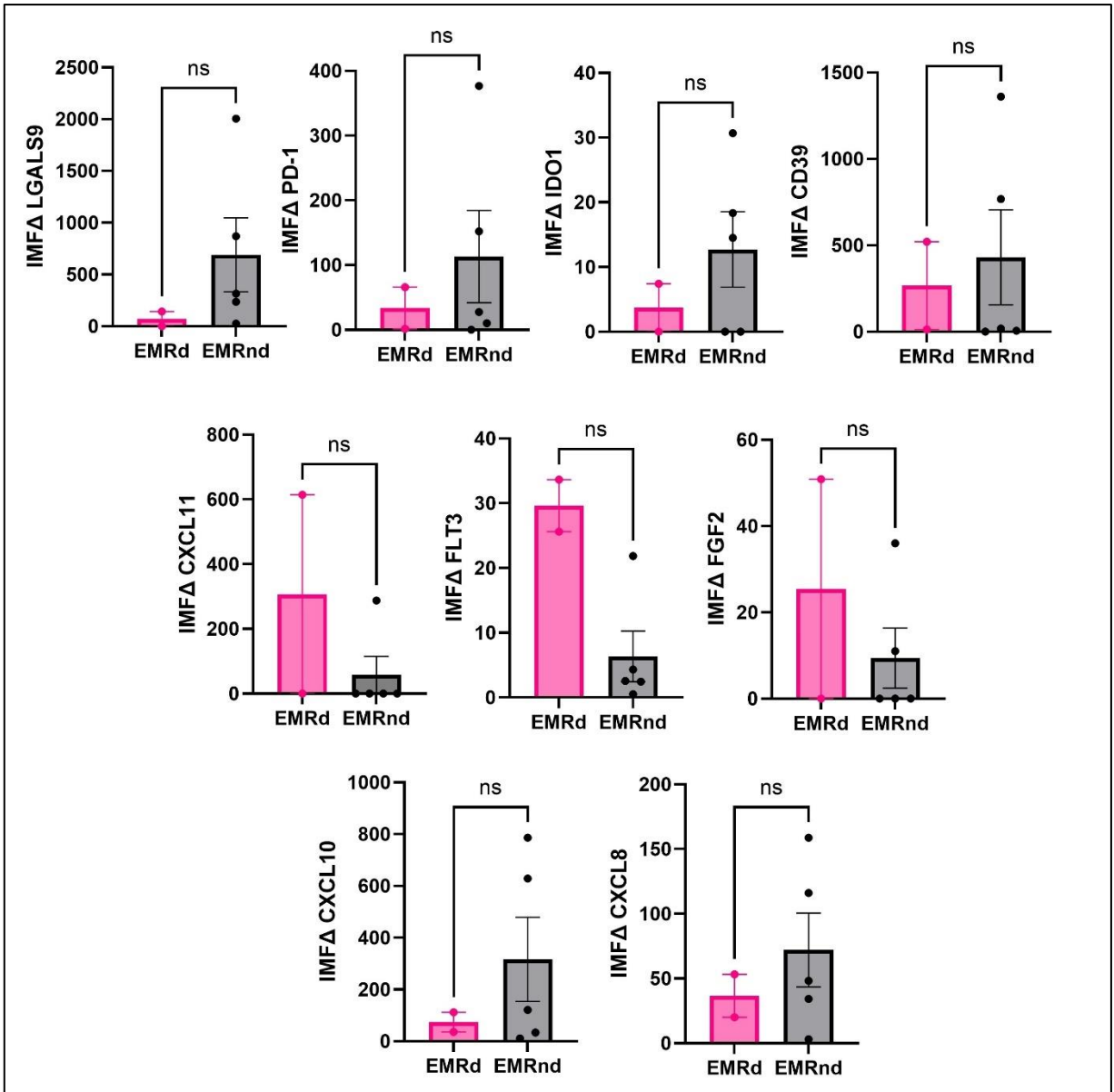


Figura 18. Fenotipo Estromal Mesenquimal por estratificación de riesgo. Comparación de la Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) de varios marcadores inmunológicos en Células Estromales Mesenquimales (CEM) al debut de la enfermedad estratificados acorde a su seguimiento clínico citométrico (EMRd vs EMRnd). Los marcadores evaluados incluyen LGALS9, PD-1, IDO1, CD39, CXCL11, FLT3, FGF2, CXCL10 y CXCL8. EMR, Enfermedad Medible Residual; EMRd EMR Detectable; EMRnd, EMR No Detectable; LGALS9, Galectina-9; PD-1, Receptor de Muerte Programada 1; IDO1, Indoleamina 2,3-dioxigenasa 1, CD, Clúster de Diferenciación, CXCL, Ligando de quimiocina (motivo C-X-C) ; FLT3, Tirosina Cinasa 3 tipo fms; FGF2, Factor de crecimiento fibroblástico 2. No se observaron diferencias significativas (ns) en la IMF de estos marcadores entre los dos grupos. Las barras representan la media \pm error estándar de la media (SEM).

Evaluación del perfil microambiental en el contexto tumoral por citometría de masas

Una vez que se contó con todos los anticuerpos del panel de 43 marcadores, se llevó a cabo su establecimiento y fueron evaluadas 7 muestras de aspirado de médula ósea, que se distribuyen en una muestra no leucémica (CTRL), una muestra de LLA-PreB (LLA_1) y cinco muestras LLA-ProB. La evaluación de los perfiles se puede ver desde tres perspectivas: adhesión y migración celular (**Figura 19-A**), inflamación y activación celular (**Figura 19-B**) e inmunosupresión (**Figura 19-C**).

Dentro de las moléculas de adhesión y migración celular, CD66c, un marcador de aberrancia en LLA, estuvo presente en cuatro de las cinco muestras de LLA-ProB, previamente observado en la prueba de inmunofenotipo diagnóstico de estos pacientes, aún cuando se expresa normalmente en los granulocitos, lo que concuerda con el porcentaje de células CD66c+ observadas en la muestra no leucémica.

CXCR3, una molécula de gran relevancia tanto en la normalidad como en la patogenia, estuvo presente en más del 80% de las células de los 7 pacientes. Cuatro de las seis muestras de leucemia presentaron mayores porcentajes de estas células, en comparación con el control. Por su parte, CXCR4 se observó principalmente en las muestras de LLA-ProB donde se observan los porcentajes más altos, con excepción de la muestra ProB negativa a CD66c. Particularmente, los pacientes LLA_5 y LLA_6 (leucemias ProB) presentaron altos porcentajes de células positivas a CXCR7, mientras que el paciente LLA_3 (leucemia ProB) presentó un alto porcentaje de Cortactina (CTTN), a diferencia de aquellos pacientes con leucemia PreB donde el porcentaje de CTTN positivas fue incluso menor que el CTRL.

Las moléculas de inflamación y activación celular, pNF- κ B, pCREB y pS6 tuvieron altos niveles en los pacientes LLA_3, LLA_5 y LLA_6. El paciente LLA_2 (LLA-PreB) presentó un mayor porcentaje de linfocitos T (CD3+) y células Helios+ en comparación con los otros pacientes, así como también un alto porcentaje de células pS6 y pCREB.

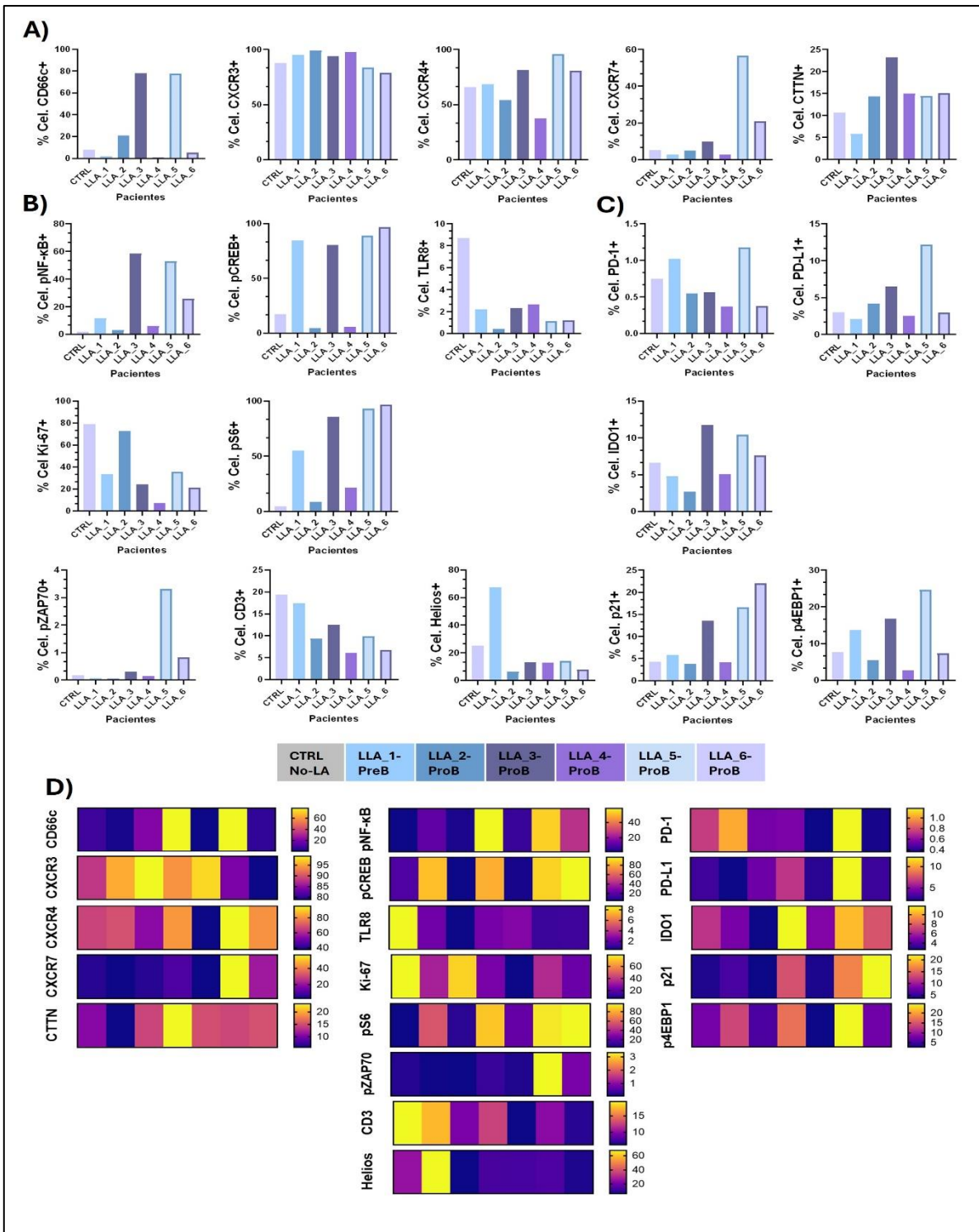


Figura 19. Contexto microambiental leucémico por citometría de masas. Evaluación del contexto microambiental en pacientes pediátricos (n=7), considerando adhesión y migración celular (A), inflamación y activación (B) e inmunosupresión (C). El paciente control fue citométricamente incompatible para LLA, LLA-1 es un paciente con LLA-preB y los pacientes LLA-2 – LLA-6 presentaron LLA-ProB. D) Mapa de calor con los perfiles microambientales de los pacientes. CTRL, Control; LLA, Leucemia Linfoblástica Aguda. Las barras y el mapa de calor representan frecuencia celular de cada paciente.

La No-LA tuvo los más bajos porcentajes en la mayoría de los marcadores, sin embargo, para CD3+, Ki-67 y TLR8 tuvo las frecuencias más altas. Este paciente citométricamente fue incompatible con LA al tener un fenotipo sin anormalidades neoplásicas aparentes. Su muestra llegó al laboratorio para su análisis por sospecha de esta. Clínicamente es un paciente del sexo masculino de 1 año 1 mes, que llegó al hospital con cuadro clínico de astenia, adinamia, pancitopenia y 10% de células blásticas (células inmaduras) en sangre periférica. El perfil de su contexto microambiental podría ser compatible con una infección que generó la activación de vías inflamatorias por medio de TLR8 y la consecuente proliferación aguda de células del sistema inmune. Helios, es un factor de transcripción crucial en la regulación del sistema inmune, particularmente de los LT reguladores (T regs), ayudando en mantener su diferenciación y estabilidad a través de la regulación de varios genes de estas células como IL-2 y FOXP3.

Con relación a los marcadores relacionados con inmunosupresión, se observó que el paciente con LLA_5 tuvo el mayor porcentaje de las células positivas a PD-1, PD-L1, IDO1, p21 y p4EBP1, seguido del paciente LLA_3 en la expresión de IDO, p21 y p4EBP1. Ambos pacientes corresponden a LLA-ProB con alta expresión de CD66c, y sus perfiles de contexto microambiental leucémico se observan a modo mapa de calor en la **Figura 19-D**.

La aberrancia CD66c impacta en la estratificación del nicho estromal mesenquimal.

Análisis paralelos de nuestro grupo han mostrado que en la LLA se observan tres comportamientos con respecto a CD66c: una expresión positiva alta (CD66c^{hi}), una expresión positiva baja (CD66c^{low}), y una expresión negativa (CD66c⁻). Además, CD66c es una de las aberrancias más frecuentemente reportadas en las leucemias evaluadas en el PRONAI (manuscrito en preparación).

En las CEM evaluadas se llevó a cabo la estratificación de las mismas acorde a la presencia o ausencia de CD66c en las células tumorales del paciente (**Figura 20-A**).

Los pacientes con expresión aberrante de CD66c en el tumor (n=11) presentaron mayores niveles de IMF estadísticamente significativas, en comparación con las CEM cuyos blastos fueron CD66c- (n=7), para la quimiocina CXCL10 y para IL-1 β ; también CXCL8 presenta esta tendencia aunque sin significancia estadística. Galectina-9 (LGALS9) muestra la misma expresión en ambos grupos. Posteriormente, se analizó si los perfiles de las CEM CD66c+ se subestratificaban basados en el nivel de expresión de la molécula aberrante (**Figura 20-B**). Si bien no hubo diferencias significativas, se pudo observar que CXCL10 y CXCL8 mostraban mayor expresión en el grupo CD66c+^{hi}, caso contrario a CXCL12, CXCL11 y FLT3 donde la mayor expresión se vio en el grupo CD66c+^{low}.

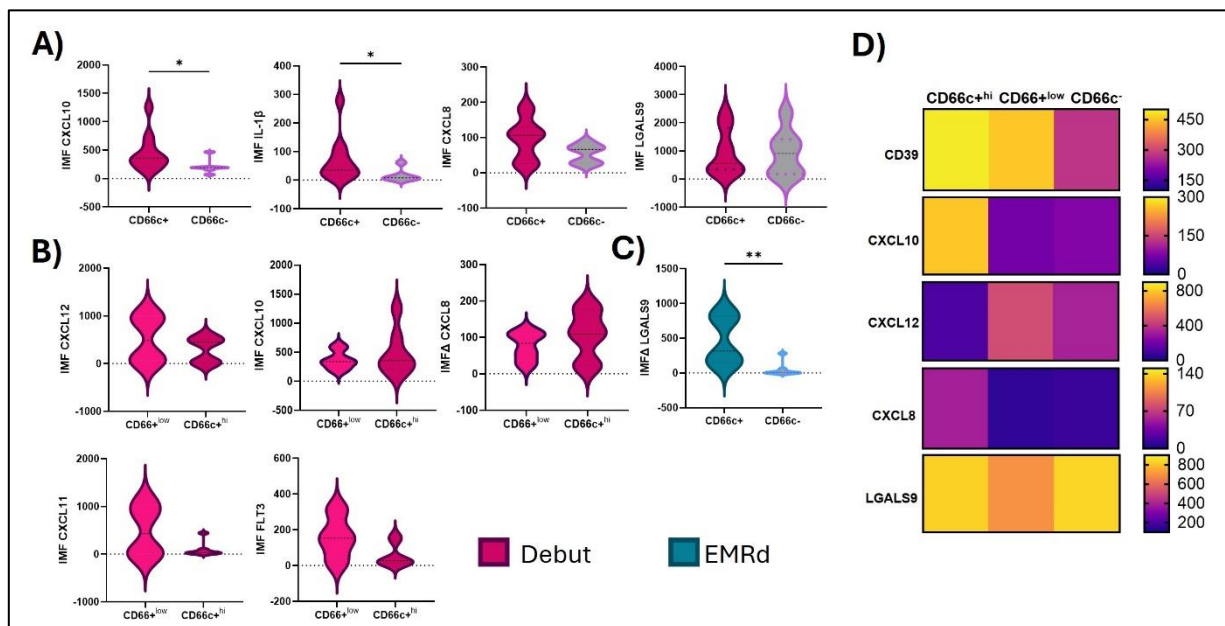


Figura 20. Impacto de la aberrancia de CD66c en el nicho estromal. Evaluación de perfiles inflamatorios y supresores en células estromales mesenquimales (CEM) derivadas de pacientes con leucemia linfoblástica aguda. A) Evaluación fenotípica de CEM obtenidas al diagnóstico de la enfermedad (n=18) con (+) o sin (-) blastos con expresión aberrante de CD66c. B) Fenotipo de CEM con expresión aberrante de CD66c al diagnóstico, estratificadas por su nivel de expresión (CD66c+^{hi}=7, CD66c+^{low}=4). C) Evaluación fenotípica de CEM obtenidas al seguimiento de la enfermedad (n=16) con (+) o sin (-) blastos con expresión aberrante de CD66c. D) Perfil microambiental del nicho estromal basado en la expresión de CD39, CXCL10, CXCL12, CXCL8 y LGALS9 en MSC al diagnóstico de la enfermedad y de acuerdo con los niveles de CD66c. CEM, células estromales mesenquimales; CXCL, ligando de quimiocina (motivo C-X-C); LGALS9, galectina 9; IDO, Indoleamina 2,3-dioxigenasa; FLT3, IMF, Intensidad Media de Fluorescencia; Δ , Delta. * p<0.05, ** p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001. IMF Δ obtenida de la sustracción de la IMF de la tinción menos la IMF de la autofluorescencia de la muestra. Gráficos muestran diagramas de violín y gráficos de caja y bigotes. El mapa de calor muestra medias de IMF Δ .

Con la finalidad de determinar si los perfiles en las CEM cambiaban con la evolución de la enfermedad, se realizó el fenotipo de CEM aisladas de muestras del seguimiento de la enfermedad (EMR) en las que se encontró carga tumoral (EMRd). Los resultados fueron estratificados acorde a CD66c (**Figura 20-C**).

Si bien LGALS9 no tuvo diferencias al debut, en la EMR el nicho estromal tiene significativamente mayor expresión en el grupo CD66c+. Finalmente, se hizo un perfil de las moléculas CD39, CXCL10, CXCL12, CXCL8 y LGALS9 del nicho estromal al debut de los pacientes, estratificados por la expresión de CD66c (**Figura 20-D**), donde se observa que CD39, CXCL10, LGALS9 y en menor medida CXCL8, se expresan principalmente en los nichos de los pacientes CD66c^{hi}.

La estratificación del Contexto microambiental leucémico de LLA-ProB por la aberrancia CD66c con citometría de masas muestra su relación con poblaciones reguladoras.

La evaluación previa de perfiles del microambiente leucémico a partir de moléculas de adhesión y migración celular (**Figura 21-A**), inflamación y activación celular (**Figura 21-B**) e inmunosupresión (**Figura 21-C**) fue estratificada acorde a los niveles de expresión de CD66c en los pacientes ProB con expresión positiva de esta molécula.

El grupo de CD66c^{hi} presentó significativamente mayores porcentajes de células Helios+ en comparación con su contraparte. Interesantemente, el porcentaje de células positivas a Helios concuerda con el de las células CD3+ (marcador de LT). De igual forma, este grupo también presentó las frecuencias más altas de PD-1, PD-L1, IDO1 y p4EBP1.

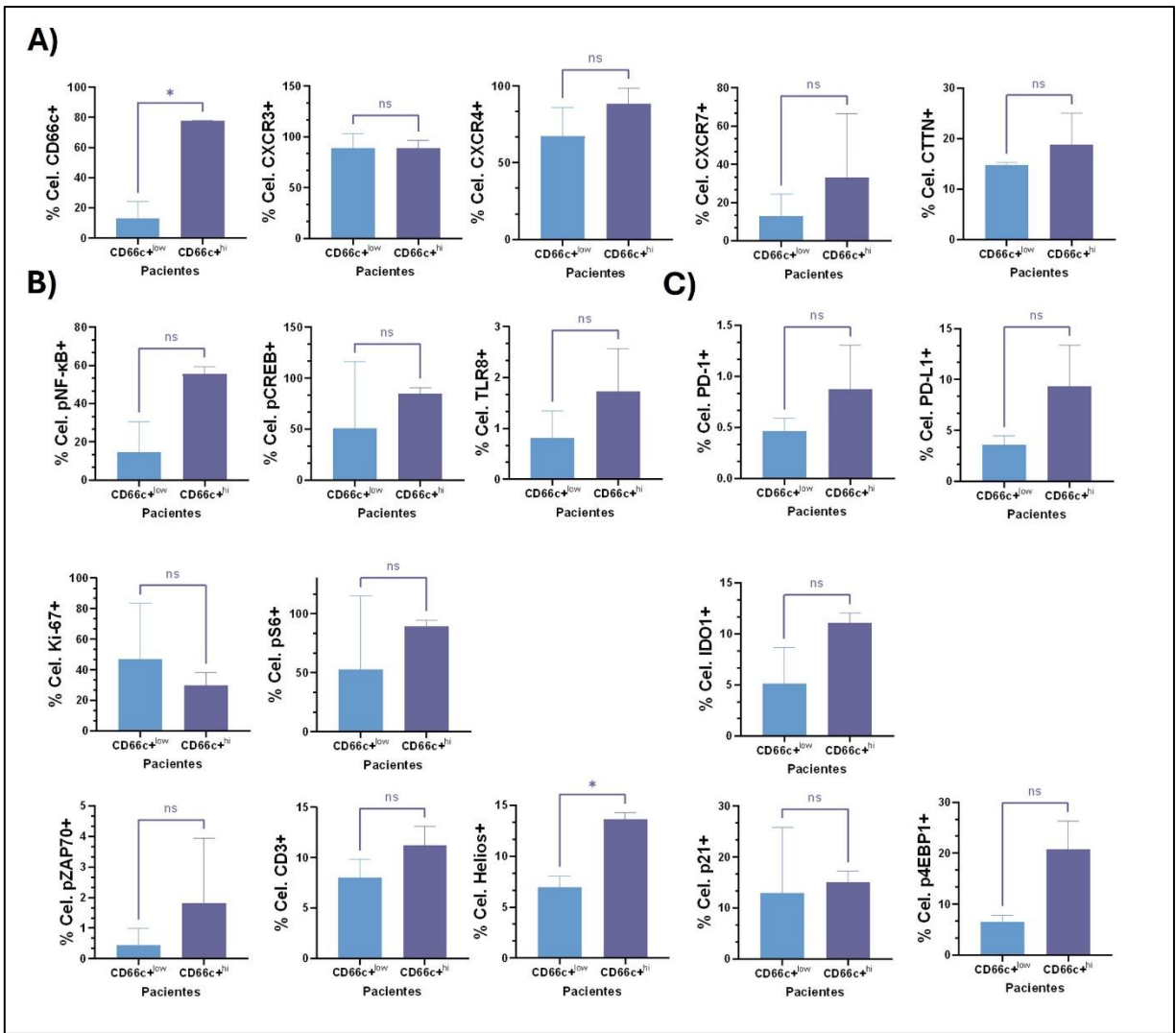


Figura 21. Estratificación del Contexto microambiental leucémico de LLA-ProB por la aberrancia CD66c con citometría de masas. Evaluación del contexto microambiental en LLA-ProB con expresión aberrante de CD66c (n=4), considerando adhesión y migración celular (A), inflamación y activación (B) e inmunosupresión (C). ns, no significativo, * p<0.05, ** p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001. Las barras muestran la media ± desviación estándar.

CD66c como posible marcador de recaída

Haciendo uso de algoritmos de reducción de dimensionalidad no lineal (tSNE) visualizaron diversas poblaciones celulares en la médula ósea de los pacientes leucémicos y la médula ósea no leucémica (**Figura 22-A**).

Notablemente, se observó la expresión de moléculas de adhesión y migración celular en la gran mayoría de las células de MO leucémica a diferencia de la contraparte sana.

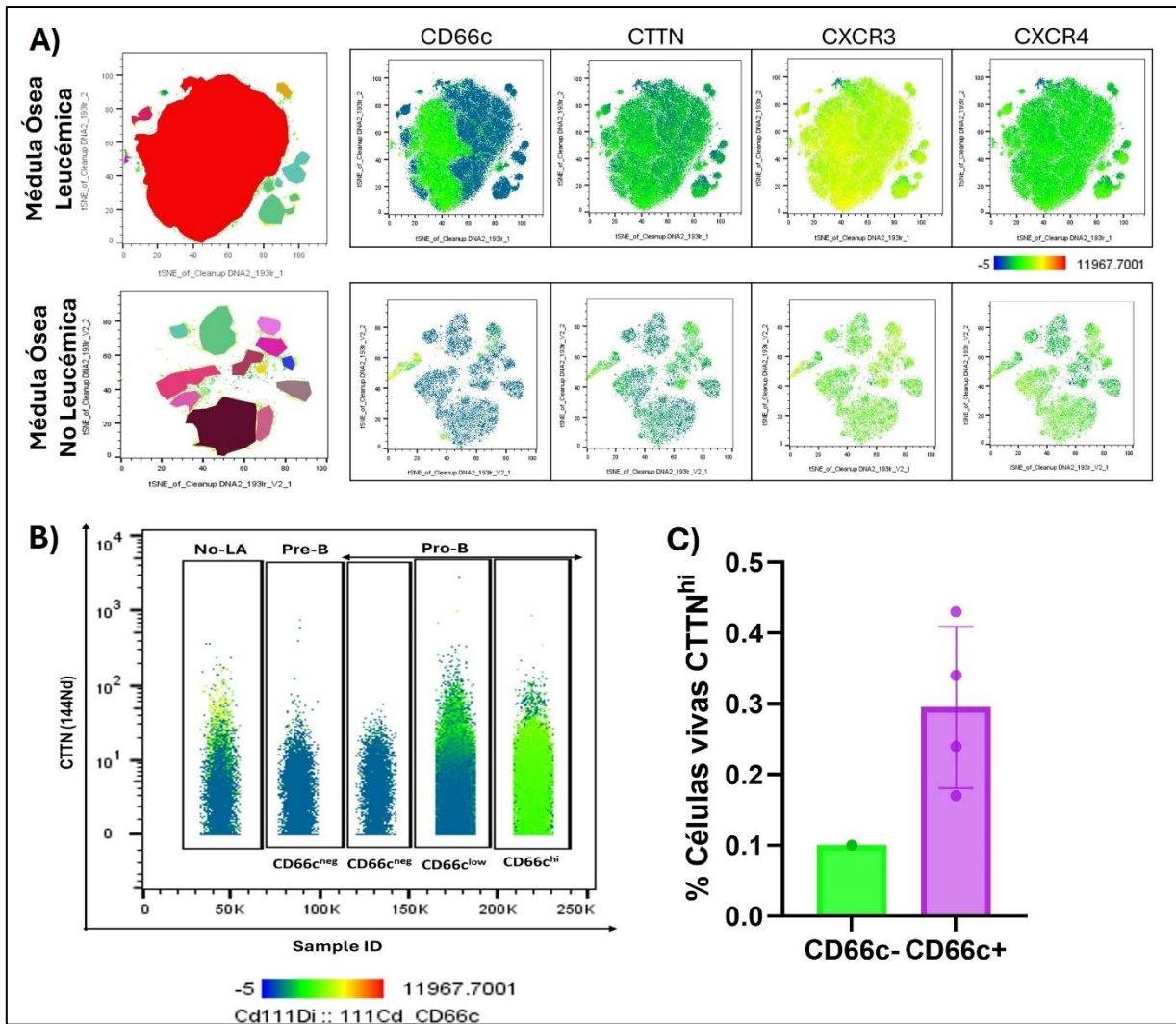


Figura 22. Evaluación de CD66c y su posible asociación con Cortactina. Se investigaron muestras de médula ósea para perfiles integrativos de leucemia mediante citometría de masas. A) Comparación gráfica de algoritmos de reducción de dimensionalidad no lineal (tSNE) de aspirados de médula ósea leucémica y no leucémica analizados por CyTOF. Las células blásticas están etiquetadas en rojo, mientras que otras poblaciones de células inmunitarias están en diferentes colores. Los niveles de expresión de CD66c, Cortactina (CTTN), CXCR3 y CXCR4 se muestran como mapas de calor en los tSNE según la barra de colores. B) Coexpresión de CTTN (eje y) y CD66c (mapa de calor) en muestras de médula ósea de LLA. No-LLA (n=1), LLA- PreB (n=1), LLA ProB- CD66c negativo (n=1) y LLA ProB CD66c positivo (hi/low) (n=4). C) Frecuencia celular de altos niveles de expresión de Cortactina (CTTN^{hi}) entre las LLA-ProB con (+) y sin (-) CD66c. Las barras muestran la media \pm desviación estándar.

Dado que resultados previos de nuestro grupo de investigación mostraron que una alta expresión de CTTN en pacientes con LLA-B está asociada con la migración transendotelial y la recaída en la médula ósea (Velázquez-Avila et al., 2019), se realizó una evaluación más detallada de CTTN

A través de citometría de masas se realizó la evaluación en las siete muestras de los niveles de de expresión de CTTN, juntando los dos pacientes de LLA-ProB CD66c+hi y los dos ProB CD66c+low. Se confirmó que las leucemias ProB son las que más expresan CTTN (**Figura 22-B**); particularmente, aquellas con expresión aberrante de CD66c (**Figura 22-C**).

9. Discusión

En el trabajo de investigación previo a este proyecto (Zamora-Herrera, 2020) se propuso, por los resultados obtenidos, un acercamiento personalizado al estadio de la enfermedad de cada paciente, enfocándose en el microambiente tumoral y su efecto en las células de la respuesta inmune, que abriría nuevas áreas de oportunidad en la búsqueda de terapias, además de permitir la clasificación de los pacientes acorde a los marcadores evaluados. Este nuevo acercamiento enfocado en el nicho y el microambiente tumoral consideraría el contexto tumoral, inmunológico y estromal mesenquimal, dando origen a la propuesta de un “Nichescore”. Este trabajo de tesis representa el primer acercamiento para generar perfiles de predicción de riesgo en la población oncológica pediátrica de nuestro país.

La EMR es una importante herramienta para la toma de decisiones terapéuticas, identificando los casos que requieren intensificación del tratamiento, sin embargo, no provee de información sobre los efectos de la terapia en el microambiente de la MO y su posible relación con la reemergencia de la enfermedad (Oliveira et al., 2022), además de ser imperfectas, dado que más del 50% de recaídas ocurre en pacientes que no fueron clasificados como de alto riesgo, y por otro lado un considerable porcentaje de pacientes muere debido a toxicidad del tratamiento (Sarno & Davis, 2018). Se ha sugerido que la generación de perfiles de CEM pueden ser poderosas herramientas pronósticas, en conjunto con la evaluación de EMR para pacientes con LLA-B. Además de esto, México presenta una alta incidencia de recaídas en poblaciones vulnerables, lo que denota la necesidad imperante de un perfil pronóstico integral en los pacientes que debutan con la enfermedad y mejorar la estratificación de riesgo, lo que impacta positivamente en la supervivencia libre de enfermedad la cual está dada por un tratamiento adecuado de la enfermedad acorde a la estratificación de riesgo del paciente e identificando factores de recaída (Juárez-Avendaño et al., 2020).

Los resultados de este proyecto muestran una alta incidencia en casi todos los grupos de edad, con excepción del grupo de 15-18 años, y la frecuencia más alta en el grupo de 10-14 años, contrastando con lo reportado en nuestro país y a nivel mundial (*Acute*

Lymphoblastic Leukaemia (ALL) Incidence Statistics | Cancer Research UK, n.d.). Con el 81.76% de todos los casos, las leucemias linfoblásticas agudas fueron las leucemias más frecuentes en la cohorte evaluada, y dentro de los subtipos de LLA, las de linaje B fueron las más frecuentes con el 96.15% de los casos.

Con la evaluación de RR se identificó que los pacientes con LMA, así como los pacientes con LLA-ProB presentaban los RR más altos. El segundo subtipo de LLA-B con mayor riesgo fue la LLA-ProB-PreB. Estos dos subtipos de leucemia se caracterizan por la expresión de CD34 que juega un papel fundamental en facilitar la unión de las células progenitoras a los componentes del microambiente estromal, apoyando su crecimiento y diferenciación (Garg et al., 2021). La alta expresión de CD34 está asociada con una pobre respuesta a la terapia y un perfil de expresión génica alterado que se asemeja al de células madre cancerosas migratorias (Modvig et al., 2022). Los análisis de clusterización y de RR, muestran por primera vez en nuestro país una subestratificación de los pacientes con leucemia ProB, donde los casos correspondientes a esta leucemia, a pesar de tener el mismo fenotipo se dividieron en tres grupos con distintos niveles de riesgo para desarrollar eventos desfavorables en el transcurso de la enfermedad, lo que pone en manifiesto que se debe buscar la estratificación de los pacientes más allá del tumor (Romo-Rodríguez et al., 2024).

El microambiente tumoral es crucial para el desarrollo del cáncer, en cada una de sus etapas de evolución (Lasfar et al., 2019; Lasry et al., 2022b), por lo que es necesario comprender la dinámica entre células tumorales y su microambiente, lo que permitirá proporcionar información más detallada sobre los ecosistemas tumorales y predecir la respuesta y aplicabilidad de la inmunoterapia (Yang et al., 2022). En el cáncer, la inflamación es sumamente importante. La adaptabilidad del nicho de MO al estrés sugiere que pueden existir nichos premalignos que apoyen la expansión de clones con ventajas de crecimiento. Las CEM de MO pueden tener funciones tanto inflamatorias como antiinflamatorias. Las CEM derivadas de un donante saludable pueden suprimir la proliferación de células T y la citotoxicidad de células NK mediante la expresión de

PD-L1, IL-10, IDO1 y TGF β lo que demuestra que la función de las CEM depende de los componentes del microambiente (Kudo-Saito, 2015; Saldanha-Araujo et al., 2011).

La producción de adenosina aumenta durante la inflamación por la acción secuencial de las ectoenzimas CD39 y CD73, que limitan la respuesta inmune. CD39 se une al ATP y lo convierte en AMP, incrementando la producción de adenosina a través de CD73, que hidroliza AMP en adenosina. La coexpresión de ambas ectoenzimas es alta en los tumores humanos. Los nichos de MO reclutan células Treg mediante la actividad de CD39. Aunque CD73 es un marcador importante en la superficie celular de las CEM, se sabe poco sobre su papel en la regulación de estas células. CD73 participa en la evasión inmune del tumor al inhibir la activación, expansión clonal y homing de células T específicas del tumor, dificultando la eliminación de células tumorales. Así, CD73 contribuye a la supresión inmune inducida por el tumor al expresarse en células estromales o tumorales (Antonioli et al., 2016; Moesta et al., 2020).

Galectina-9 (LGALS9) está expresada diferencialmente en los tejidos asociados al sistema inmunes, teniendo diversos papeles, en los que se incluye la regulación de la adhesión celular, migración, polaridad, quimotaxis, proliferación, apoptosis y diferenciación (Pena et al., 2014). Las galectinas también tienen un papel muy importante en la MO y el microambiente durante la hematopoyesis. LGALS9 ha sido asociada tanto a la supresión tumoral, como a invasión y progresión tumoral (Ahmed et al., 2023). En un estudio de pacientes con mieloma múltiple se observó que el valor pronóstico de LGALS9 podía estar asociado a la expresión de PD-L1 en pacientes recién diagnosticados con esta enfermedad, pues los pacientes con una alta expresión de PD-L1 tenían tiempos de supervivencia global (OS) de 14 y 43 meses estratificados por la expresión de positiva y negativa de LGALS9, respectivamente. Sin embargo, en el grupo de baja expresión de PD-L1, los pacientes con alta expresión de LGALS9 mostraban una tendencia a mejor supervivencia global (B. H. Lee et al., 2021). Tim-3 es el receptor de unión a LGALS9 más conocido. En condiciones fisiológicas, la unión entre Tim-3 y LGALS9 inducen agotamiento o apoptosis en los LT efectores. En la LMA se ha reportado que los blastos a través de la proteína cinasa C (PKC)/mTOR activan un bucle autócrino que induce altos niveles de secreción de LGALS9 y la

liberación de Tim-3 soluble, llevando a una reducción de la vigilancia inmunológica y a la progresión de la enfermedad (Lv et al., 2023). De manera interesante se encontró que los estromas de los pacientes al debut de la enfermedad tienen mayor expresión de LGALS9 en aquellos que en el seguimiento de su enfermedad no tuvieron presencia de blastos (EMRnd). Es importante mencionar que en los estromas evaluados también se hizo evaluación de PD-L1 sin observar la expresión de esta molécula.

Las células estromales mesenquimales secretanIDO constitutivamente y su secreción incrementa por la estimulación de IFN- γ (que también es secretada por las CEM ante ciertos estímulos (Prockop & Youn Oh, 2012); la depleción constante de triptófano por medio de esta enzima, conlleva a la inhibición de la respuesta de los LT, generación de Tregs (Negi & Griffin, 2020), además de estimular la secreción de IL-4 (Keating, 2008; Ren et al., 2008; Weiss & Dahlke, 2019).

Los resultados mostrados en las figuras 13-17 en conjunto sugieren un ecosistema tumoral diferente en los niños que muestran un mayor riesgo de recaída. Los resultados mostrados en esas figuras han sido publicados en Romo-Rodríguez & Zamora Herrera et al., 2024 (Romo-Rodríguez et al., 2024) proponiendo una subclasificación de riesgo para pacientes con LLA-B.

El compromiso de PD-1 con su ligando, PD-L1, conlleva a la regulación a la baja de la función de los LT efectoras. El eje PD-1/PD-L1 promueve el escape inmunológico en algunas malignidades hematológicas (Ai et al., 2020; Curran et al., 2017). 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. PD-L1 también se expresa en células no hematopoyéticas, como células estromales (Ai et al., 2020). Si bien no se observó expresión de PD-L1, su contraparte PD-1, se encontró más expresado en los pacientes con EMRnd.

Las quimiocinas inducen quimiotaxis, promueven la diferenciación y multiplicación de leucocitos y causan la extravasación de tejidos. En la oncogénesis, las quimioquinas y sus receptores están involucrados en el apoyo al desarrollo tumoral y la diseminación metastásica mediante tres mecanismos complementarios diferentes: la atracción de células cancerosas a sitios de diseminación metastásica, la movilización de leucocitos

derivados de la médula ósea desde la médula ósea hacia la sangre y el apoyo al crecimiento tumoral a través de un bucle autocrino.

CXCL8, también conocida como Interleucina-8 (IL-8), es la quimioquina más importante para el reclutamiento de neutrófilos en humanos (Behrens, 2020) a través de la interacción CXCR2-CXCL8. En el contexto del cáncer, CXCL8 es producida por múltiples tipos de células en el MAT, incluidas las células estromales y las células tumorales. Muchos estudios han demostrado que CXCL8 puede promover la proliferación celular e inhibir la apoptosis en múltiples tipos de cáncer, incluidos el cáncer de mama, próstata, pulmón y colon. Dos estudios realizados en cáncer colorrectal y adenocarcinoma ductal pancreático indicaron que las células madre mesenquimales y los fibroblastos asociados al cáncer (CAFs) podrían promover que las células cancerosas secreten CXCL8, mejorando así su capacidad de proliferación e invasión. CXCL8 puede reclutar macrófagos asociados al tumor (TAMs), células supresoras derivadas de mieloides (MDSCs) y neutrófilos al MAT, lo que resulta en una disminución de la respuesta inmune antitumoral de las células inmunes citotóxicas (Xiong et al., 2022). Por su parte, bajo condiciones proinflamatorias, CXCL10 es secretada por una variedad de células, como leucocitos, neutrófilos activados, eosinófilos, monocitos, células epiteliales, células endoteliales, células estromales y queratinocitos. Curiosamente, el aumento de la expresión de CXCL10 en el sitio tumoral se ha correlacionado con un mejor pronóstico (Karin & Razon, 2018). Contrariamente a las acciones limitantes del tumor, CXCL10 también puede exhibir capacidad promotora del tumor. Se ha propuesto que las quimioquinas CXC y sus receptores, particularmente CXCR3 y sus ligandos como CXCL10, pueden estar involucrados en la progresión y metástasis del tumor a través de la sobreexpresión de CXCR3 en las células tumorales en comparación con las células inmunocompetentes infiltrantes, lo que resulta en una sobre respuesta a las quimioquinas expresadas tanto por tumores como por células inflamatorias (M. Liu et al., 2011). Ahora se sabe que las células estromales del microambiente dentro de la médula ósea, a través de interacciones directas célula a célula y mediante la liberación de factores solubles que actúan sobre el linaje linfóide, contribuyen a la patogénesis de la LLA y a la quimiorresistencia. Entre estos mediadores se incluye CXCL10. La evaluación de

CXCL10 en quimioquinas solubles de la médula ósea al momento del diagnóstico frente al día 15 después de la inducción en pacientes con LLA-B demuestra niveles significativamente más altos al momento del diagnóstico (Aref et al., 2023). Los resultados mostrados de este proyecto muestran una expresión incrementada de CXCL8 y CXCL10 en los pacientes con evolución favorable, por lo que podrían ser marcadores de buen pronóstico.

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) (Metzemaekers et al., 2018; Nazari et al., 2020; Ryuma Tokunaga et al., 2018). De igual manera se puede unir a CXCR7 (R. Tokunaga et al., 2018), lo cual está asociado a invasividad y reduce la apoptosis de células tumorales. Es importante mencionar que los modelos murinos deficientes de CXCR3 manifiestan un incremento en la producción de IL-4 (Ryuma Tokunaga et al., 2018). Además de ser expresada en leucocitos, páncreas, hígado, entre otros (Nazari et al., 2020), también ha sido descrita su presencia en CEM (Ren et al., 2008), lo cual ha sido comprobado en estudios previos de nuestro laboratorio (Balandrán et al., 2021). CXCL11 es una quimiocina clave en las respuestas inmunes e inflamatorias, promoviendo el reclutamiento y activación de diversas subpoblaciones de leucocitos. Se ha reportado que IL-1 β , IFN- γ e IFN- β aumentan la producción de CXCL11 (Feng et al., 2014). Si bien en un primer acercamiento la ausencia de CXCL11 parecía asociada a un mayor riesgo a desarrollar eventos desfavorables al no encontrarse porcentaje de esta quimiocina en el clúster 5 (clúster de mayor RR entre las LLA-ProB), el análisis de los estromas estratificados por el seguimiento de su enfermedad mostró un incremento de la expresión de esta quimiocina en el grupo de EMRd.

FLT3 (Fms-like tyrosine kinase 3) es un receptor de tirosina quinasa tipo III que juega un papel crucial en la regulación del desarrollo y la diferenciación de las células hematopoyéticas. (Gary Gilliland & Griffin, 2002) Este receptor se expresa principalmente en células progenitoras hematopoyéticas y en algunas células maduras del sistema inmunológico, como monocitos y células dendríticas. FLT3 es activado por

la unión de su ligando (FL), lo que desencadena una cascada de señalización intracelular que promueve la proliferación, supervivencia y diferenciación de las células hematopoyéticas (Levis, 2017). En el contexto de la leucemia, las mutaciones en el gen FLT3 son una de las alteraciones genéticas más comunes observadas en la LMA. Estas mutaciones resultan en una activación constitutiva del receptor, que conduce a una proliferación descontrolada y supervivencia de las células leucémicas, contribuyendo así a la patogénesis de la enfermedad. Además de su papel en la leucemia, FLT3 puede tener funciones en otras células no leucémicas, incluyendo células estromales del microambiente hematopoyético (Balandrán et al., 2017). Estas células estromales proporcionan soporte estructural y regulador para las células hematopoyéticas, y la expresión de FLT3 en ellas podría influir en la homeostasis y el desarrollo hematopoyético. En este proyecto FLT3 estuvo más expresado en el grupo de EMRd y dada su relevancia en la hematopoyesis y el mantenimiento de la troncalidad (Oubari et al., 2015) podría estar implicado en perfiles de mal pronóstico en su posible rol de mantenimiento de las células iniciadoras de la leucemia. En otras investigaciones se ha asociado que la sobreexpresión de FLT3 correlaciona con baja supervivencia libre de enfermedad en LLA.

En conjunto observamos dos posibles nichos en nuestros pacientes por su perfil estromal mesenquimal. El primero identificado por la expresión de moléculas de inmunosupresión como CD39, LGALS9, IDO1 y PD-1, así como por las quimiocinas CXCL8 y CXCL10, que en conjunto podrían ser un perfil de buen pronóstico por ser el distintivo del grupo de EMR no detectable. La presencia de moléculas inmunosupresoras e inflamatorias nos podría estar hablando de un nicho de transición entre ambos estados. Por otro lado, el perfil del grupo de EMR detectable, se caracterizó por la expresión de CXCL11, FGF2 y FLT3, sin embargo, no expresan ninguna de las otras moléculas evaluadas, lo que pareciera ser un nicho silente, ideal para que en el habiten las células iniciadoras de la leucemia sin ser vistas por la respuesta inmune, que soporta las propiedades de troncalidad de la misma.

De manera remarcable, la firma de los nichos previamente mencionados se repite ante la estratificación por CD66c. Nuestro grupo de investigación identificó que dentro de

las LLA-ProB, podemos identificar 2 niveles de expresión de CD66c, la expresión CD66c homogénea y con alta (CD66c+hi) y las células que expresan CD66c heterogéneamente y baja (CD66c+low) y que estos niveles de CD66c pueden tener una relación con el RR, donde los pacientes CD66c+low presentan mayor RR EMRd. Coincidentemente, los estromas de los pacientes CD66c+low presentan el perfil del nicho EMRd, y los de pacientes CD66c+hi con el perfil de los EMRnd, lo que posiblemente confirma la asociación de estos perfiles con la estratificación de riesgos.

CEACAM6/CD66c es parte de la familia CEA de proteínas de adhesión celular que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas. CEACAM6 se expresa normalmente en la superficie de células mieloides (CD66c), incluyendo granulocitos, macrófagos y monocitos; células epiteliales del colon, neumocitos, epitelio de los bronquiolos, conductos pancreáticos, epitelio de las amígdalas, glándulas sudoríparas, piel y folículos pilosos, epitelio escamoso del esófago, cervix y lengua (Johnson & Mahadevan, 2015). La familia CEACAM puede influir y modular las respuestas inmunes asociadas con infecciones, inflamación y cáncer (Hasselbalch et al., 2011).

La sobreexpresión desregulada de CD66c es oncogénica y se asocia con resistencia a la anoikis y un fenotipo invasivo mediado por una señalización excesiva de TGF β , AKT, FAK y SRC en malignidades humanas. Modula la progresión del cáncer a través de la destrucción tisular, diferenciación celular aberrante, anti apoptosis, crecimiento celular y resistencia a los agentes terapéuticos (Behrens, 2020; Johnson & Mahadevan, 2015). Las proteínas CEACAMS actúan como moléculas de adhesión intercelular a través del anclaje de glicofosfatidilinositol (GPI) a la superficie celular o dominios transmembrana. CD66c media la unión homotípica con otros miembros de la familia CEA y la unión heterotípica con receptores de integrina (Johnson & Mahadevan, 2015).

CD66c se descubrió inicialmente en células proliferantes de adenomas y pólipos hiperplásicos en comparación con el tejido colónico benigno (Johnson & Mahadevan, 2015). La sobreexpresión de CD66c puede correlacionarse con una peor supervivencia global (OS) y supervivencia libre de enfermedad para algunos tipos de cáncer, como el cáncer de colon y el adenocarcinoma ductal pancreático (PDA)

(Pandey et al., 2019). CD66c afecta al MAT a través de sus interacciones estrechas con las integrinas. La unión cruzada mediada por anticuerpos de CD66c activa a los neutrófilos y promueve su adhesión a la matriz extracelular (MEC). La unión cruzada resulta en un aumento significativo de la adhesión a la fibronectina y la vitronectina. La alta expresión de CD66c muestra una tendencia hacia una peor supervivencia en los cánceres de mama con sobreexpresión de HER2 (Johnson & Mahadevan, 2015).

En un estudio realizado para evaluar CD66c en PDA, después de la estratificación de las muestras según la alta y baja expresión de CD66c, se demostró una tasa más alta de baja actividad citolítica de las células T, asociando la alta expresión de CD66c con la supresión inmune (Pandey et al., 2019). En la enfermedad inflamatoria del colon y el mieloma múltiple, se sabe que la expresión de CD66c activa un subconjunto de células T reguladoras CD8+ supresoras del sistema inmune.

En el cáncer gástrico (GC) se ha informado un doble papel de CD66c. Una investigación destinada a investigar el papel de CD66c en la predicción de la OS para GC muestra que la alta expresión de CD66c en la etapa temprana del GC se asocia con una mejor OS, pero en la etapa avanzada del GC, la alta expresión de CD66c se asocia con una peor OS (Zang et al., 2017).

La alta expresión de los genes CEACAM6 y 8 en pacientes con mielofibrosis podría estar involucrada en la resistencia a la apoptosis, la disminución de la adherencia de los progenitores al estroma de la médula ósea con la movilización final de CD34+ desde la médula ósea y su siembra en el bazo, hígado y otros sitios (Hasselbalch et al., 2011). Las células de mieloma múltiple que expresan CD66c pueden inhibir la reactividad y citotoxicidad de las células T CD8+ específicas del mieloma (Steiner et al., 2019).

Anteriormente, se informó que el 79.5% de las biopsias de médula ósea de LLA-B expresaban CD66c a través de citometría de flujo, sin expresión relevante en otros subtipos. La relevancia clínica de la expresión de CD66c en relación con resultados adversos y el estado de biomarcador predictivo relacionado con la resistencia al tratamiento aún no se ha descrito en LLA-B (Johnson & Mahadevan, 2015).

Las citoquinas proinflamatorias inducen y mantienen la expresión de CEACAM3 y CEACAM6 en células epiteliales intestinales (EICs). Esto se midió tratando a las EICs con un cóctel de citoquinas que incluye IL-1 β , impactando no solo en la expresión de proteínas CEACAM, sino también en la inducción de IL-8 (Saiz-Gonzalo et al., 2021).

La presencia de anticuerpos monoclonales terapéuticos, conjugados o no, que se dirigen a CD66c, ofrece vías terapéuticas prometedoras que se espera impulsen numerosos esfuerzos preclínicos y clínicos durante la próxima década (Blumenthal et al., 2007; Johnson & Mahadevan, 2015).

Al evaluar los perfiles microambientales por citometría de masas, podemos corroborar que los pacientes CD66c+hi presentan células con moléculas tanto inflamatorias como inmunosupresoras. Mientras que las CD66c+low nuevamente muestran un perfil en su mayoría silente. De manera importante, los pacientes CD66c+hi muestran significativamente más expresión de Helios que su contraparte. Helios es un marcador específico que se utiliza para identificar las células T reguladoras (Treg). Pertenecce a la familia Ikaros, desempeñando un papel crucial en la regulación del desarrollo y función de las células inmunitarias.

10. Conclusiones

Este proyecto pone, en manifiesto por primera vez, la utilidad y factibilidad de generar perfiles pronósticos a partir de la caracterización del microambiente tumoral en el nicho leucémico, incluyendo el análisis del contexto inmunológico y la contribución de las CEM, asociándolo con el riesgo de EMR detectable en pacientes pediátricos con LLA en México. Los resultados analizados nos permiten identificar dos huellas microambientales dependiendo del riesgo de los pacientes, uno aparentemente de transición con la expresión de moléculas inflamatorias e inmunosupresoras que se asocia con una evolución favorable, y un segundo nicho de mayor riesgo a presentar EMR detectable, que aparentemente es silente y tiene propiedades de mantenimiento de la troncalidad y por lo tanto de las Células Iniciadores de la leucemia.

Con este primer acercamiento se podrá trabajar en el desarrollo de un algoritmo basado en la inteligencia artificial para la predicción de desenlaces desfavorables de la enfermedad.

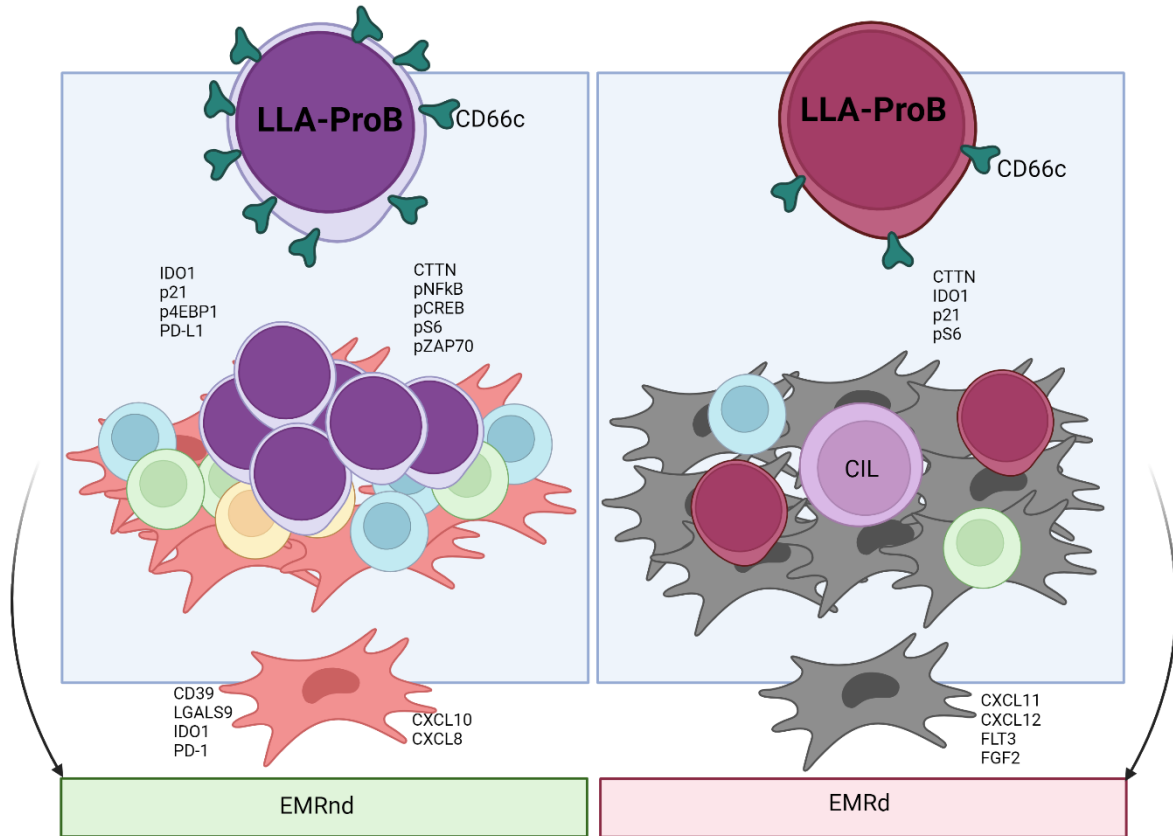


Figura 23. Modelo concluyente

11. Bibliografía

- Acute lymphoblastic leukaemia (ALL) incidence statistics* | Cancer Research UK. (n.d.). Retrieved May 20, 2024, from <https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/leukaemia-all/incidence>
- Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., & Nalbant, A. (2017). Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(2), 163–176. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1128876>
- Ahmed, H. A., Nafady, A., Ahmed, E. H., Hassan, E. E. N., Soliman, W. G. M., Elbadry, M. I., & Allam, A. A. (2023). CXC chemokine ligand 13 and galectin-9 plasma levels collaboratively provide prediction of disease activity and progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia. *Annals of Hematology*, 781–792. <https://doi.org/10.1007/s00277-023-05540-8>
- Ai, L., Xu, A., & Xu, J. (2020). Roles of PD-1/PD-L1 Pathway: Signaling, Cancer, and Beyond. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1248). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-3266-5_3
- Antonioli, L., Yegutkin, G. G., Pacher, P., Blandizzi, C., & Haskó, G. (2016). Anti-CD73 in Cancer Immunotherapy: Awakening New Opportunities. *Trends in Cancer*, 2(2), 95–109. <https://doi.org/10.1016/J.TRECAN.2016.01.003>
- Aponte, P. M., & Caicedo, A. (2017). Stemness in cancer: Stem cells, cancer stem cells, and their microenvironment. *Stem Cells International*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/5619472>
- Arriaga-Pizano, L., Ramírez-Ramírez, D., Prieto-Chávez, J., Pelayo, R., & Ruiz-Argüelles, A. (2019). Reporte de la primera reunión nacional de consenso para la inmunofenotipificación de leucemias agudas. *Gaceta Médica de México*, 155(1), 20–29. <https://doi.org/10.24875/GMM18004418>
- Baccin, C., Al-Sabah, J., Velten, L., Helbling, P. M., Grünschläger, F., Hernández-Malmierca, P., Nombela-Arrieta, C., Steinmetz, L. M., Trumpp, A., & Haas, S. (2020). Combined single-cell and spatial transcriptomics reveal the molecular, cellular and spatial bone marrow niche organization. *Nature Cell Biology*, 22(1), 38–48. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0439-6>
- Balandrán, J. C., Dávila-Velderrain, J., Sandoval-Cabrera, A., Zamora-Herrera, G., Terán-Cerqueda, V., García-Stivalet, L. A., Limón-Flores, J. A., Armenta-Castro, E., Rodríguez-Martínez, A., Leon-Chavez, B. A., Vallejo-Ruiz, V., Hassane, D. C., Pérez-Tapia, S. M., Ortiz-Navarrete, V., Guzman, M. L., & Pelayo, R. (2021). Patient-Derived Bone Marrow Spheroids Reveal Leukemia-Initiating Cells Supported by Mesenchymal Hypoxic Niches in Pediatric B-ALL. *Frontiers in Immunology*, 12(October), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.746492>
- Balandrán, J. C., Lasry, A., & Aifantis, I. (2023). The Role of Inflammation in the Initiation and Progression of Myeloid Neoplasms. *Blood Cancer Discovery*, 4(4), 254–266. <https://doi.org/10.1158/2643-3230.BCD-22-0176>

- Balandrán, J. C., Purizaca, J., Enciso, J., Dozal, D., Sandoval, A., Jiménez-Hernández, E., Alemán-Lazarini, L., Perez-Koldenkova, V., del Prado, H. Q. N., de los Ríos, J. R., Mayani, H., Ortiz-Navarrete, V., Guzman, M. L., & Pelayo, R. (2017). Pro-inflammatory-related loss of CXCL12 niche promotes acute lymphoblastic leukemic progression at the expense of normal lymphopoiesis. *Frontiers in Immunology*, 7(JAN). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00666>
- Balandrán, J. C., Vadillo, E., Dozal, D., Reyes-López, A., Sandoval-Cabrera, A., Laffont-Ortiz, M. D., Prieto-Chávez, J. L., Vilchis-Ordoñez, A., Quintela-Nuñez del Prado, H., Mayani, H., Núñez-Enríquez, J. C., Mejía-Aranguré, J. M., López-Martínez, B., Jiménez-Hernández, E., & Pelayo, R. (2016). Analysis of Normal Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Contents in Childhood Acute Leukemia Bone Marrow. *Archives of Medical Research*, 47(8), 629–643. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2016.12.004>
- Behrens, I.-K. (2020). *The role of human CEACAMs for the interaction of Helicobacter pylori with neutrophils* [Munich University]. https://edoc.ub.uni-muenchen.de/26606/1/Behrens_Ina-Kristin.pdf
- Bendall, S. C., Nolan, G. P., Roederer, M., & Chattopadhyay, P. K. (2012). A deep profiler's guide to cytometry. *Trends in Immunology*, 33(7), 323–332. <https://doi.org/10.1016/j.it.2012.02.010>
- Bendall, S. C., Simonds, E. F., Qiu, P., Amir, E. D., Krutzik, P. O., Finck, R., Bruggner, R. V., Melamed, R., Trejo, A., Ornatsky, O. I., Balderas, R. S., Plevritis, S. K., Sachs, K., Pe, D., Tanner, S. D., & Nolan, G. P. (2011). *Single-Cell Mass Cytometry of Differential a Human Hematopoietic Continuum. June 2014*. <https://doi.org/10.1126/science.1198704>
- Bernaldez-Rios, R., Ortega-Alvarez, M. C., Perez-Saldivar, M. L., Alatorre-Medina, N. E., Del Campo-Martinez, M. de los A., Rodriguez-Zepeda, M. del C., Montero-Ponce, I., Franco-Ornelas, S., Fernandez-Castillo, G., Nuñez-Villegas, N. N., Taboada-Flores, M. A., Flores-Lujano, J., Argüelles-Sanchez, M. E., Juarez-Ocaña, S., Fajardo-Gutierrez, A., & Mejia-Arangure, J. M. (2008). The Age Incidence of Childhood B-cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia in Mexico City. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, 30(3), 199–203. <https://doi.org/10.1097/MPH.0b013e318162bcdc>
- Bhaskar, N. (2021). Bone Marrow Aspiration and Biopsy in Critical Pediatric Patients: A Pathologist's Perspective. *Cureus*, 13(8). <https://doi.org/10.7759/cureus.17423>
- Blumenthal, R. D., Leon, E., Hansen, H. J., & Goldenberg, D. M. (2007). Expression patterns of CEACAM5 and CEACAM6 in primary and metastatic cancers. *BMC Cancer*, 7, 8809–8817. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-7-2>
- CeNSIA. (2019). *Cáncer Infantil en México Te presentamos datos epidemiológicos del Cáncer en la. 1–10*. <https://www.gob.mx/salud%7Ccensia/articulos/cancer-infantil-en-mexico-130956>
- Cevallos-Barrera, E. (2006). *Fundamentos de Oncología*.

- Chávez-González, M. A., Chimal-Monroy, J., Flores-Figueroa, E., & Lamas, M. (2017). *Células Troncales, biología y aplicaciones en biomedicina*.
- Chiaretti, S., Zini, G., & Bassan, R. (2014). Diagnosis and subclassification of acute lymphoblastic leukemia. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 6(1). <https://doi.org/10.4084/mjhid.2014.073>
- Chiarini, F., Lonetti, A., Evangelisti, C., Buontempo, F., Orsini, E., Evangelisti, C., Cappellini, A., Neri, L. M., McCubrey, J. A., & Martelli, A. M. (2016). Advances in understanding the acute lymphoblastic leukemia bone marrow microenvironment: From biology to therapeutic targeting. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1863(3), 449–463. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.08.015>
- Comazzetto, S., Shen, B., & Morrison, S. J. (2022). *Niches that regulate stem cells and hematopoiesis in adult bone marrow*. 56(13), 1848–1860. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.05.018>. Niches
- Consejo Técnico del IMSS aprueba primer Laboratorio de Cáncer Infantil en Latinoamérica | Sitio Web “Acercando el IMSS al Ciudadano.” (n.d.). Retrieved May 10, 2024, from <https://www.imss.gob.mx/prensa/archivo/202404/205>
- Cordeiro, A., Saraiva, M., & Salomé, M. (2020). Seminars in Cell & Developmental Biology The bone marrow hematopoietic niche and its adaptation to infection. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, December 2019, 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.05.014>
- Cordeiro Gomes, A., Hara, T., Lim, V. Y., Herndler-Brandstetter, D., Nevius, E., Sugiyama, T., Tani-ichi, S., Schlenner, S., Richie, E., Rodewald, H. R., Flavell, R. A., Nagasawa, T., Ikuta, K., & Pereira, J. P. (2016). Hematopoietic Stem Cell Niches Produce Lineage-Instructive Signals to Control Multipotent Progenitor Differentiation. *Immunity*, 45(6), 1219–1231. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.11.004>
- Crane, G. M., Jeffery, E., & Morrison, S. J. (2017). Adult haematopoietic stem cell niches. *Nature Publishing Group*. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.53>
- Curran, E. K., Godfrey, J., & Kline, J. (2017). Mechanisms of Immune Tolerance in Leukemia and Lymphoma. *Trends in Immunology*, 38(7), 513–525. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.04.004>
- Dai, Q., Zhang, G., Yang, H., Wang, Y., Ye, L., Peng, L., Shi, R., Guo, S., He, J., & Jiang, Y. (2021). Clinical features and outcome of pediatric acute lymphoblastic leukemia with low peripheral blood blast cell count at diagnosis. *Medicine (United States)*, 100(4). <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000024518>
- De Rooij, B., Polak, R., Van Den Berk, L. C. J., Stalpers, F., Pieters, R., & Den Boer, M. L. (2017). Acute lymphoblastic leukemia cells create a leukemic niche without affecting the CXCR4/CXCL12 axis. In *Haematologica*. <https://doi.org/10.3324/haematol.2016.159517>
- Di Zeo-Sánchez, D. E., Sánchez-Núñez, P., Stephens, C., & Lucena, M. I. (2021).

- Characterizing highly cited papers in mass cytometry through h-classics. *Biology*, 10(2), 1–25. <https://doi.org/10.3390/biology10020104>
- Ding, D., & Shyu, W. (2011). *Mesenchymal Stem Cells*. 20, 5–14. <https://doi.org/10.3727/096368910X>
- Ding, L., & Morrison, S. J. (2013). Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature*, 495(7440), 231–235. <https://doi.org/10.1038/nature11885>
- Dominici, M., Blanc, K. Le, Mueller, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J., & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells . The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Dostert, G., Mesure, B., Menu, P., & Velot, É. (2017). How Do Mesenchymal Stem Cells Influence or Are Influenced by Microenvironment through Extracellular Vesicles Communication? *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 5(February), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00006>
- Duan, R., Li, X., Zeng, D., Chen, X., Shen, B., Zhu, D., Zhu, L., Yu, Y., & Wang, D. (2021). Tumor Microenvironment Status Predicts the Efficacy of Postoperative Chemotherapy or Radiochemotherapy in Resected Gastric Cancer. *Frontiers in Immunology*, 11(January), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.609337>
- Duarte, D., Hawkins, E. D., & Lo Celso, C. (2018). The interplay of leukemia cells and the bone marrow microenvironment. *Blood*, 131(14), 1507–1511. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-12-784132>
- Dunn, G. P., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2004). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*, 21(2), 137–148. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.07.017>
- Elder, A., Bomken, S., Wilson, I., Blair, H. J., Cockell, S., Ponthan, F., Dormon, K., Pal, D., Heidenreich, O., & Vormoor, J. (2017). Abundant and equipotent founder cells establish and maintain acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia*, 31(12), 2577–2586. <https://doi.org/10.1038/leu.2017.140>
- Enciso, J., Mayani, H., Mendoza, L., & Pelayo, R. (2016). Modeling the pro-inflammatory tumor microenvironment in acute lymphoblastic leukemia predicts a breakdown of hematopoietic-mesenchymal communication networks. *Frontiers in Physiology*, 7(AUG), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00349>
- Enciso, J., Mendoza, L., Álvarez-Buylla, E. R., & Pelayo, R. (2020). Dynamical modeling predicts an inflammation-inducible CXCR7+ B cell precursor with potential implications in lymphoid blockage pathologies. *PeerJ*, 8, 1–30. <https://doi.org/10.7717/peerj.9902>
- Entrena, A., Varas, A., Vázquez, M., Melen, G. J., Fernández-Sevilla, L. M., García-Castro, J., Ramírez, M., Zapata, A. G., & Vicente, Á. (2015). Mesenchymal stem

cells derived from low risk acute lymphoblastic leukemia patients promote NK cell antitumor activity. *Cancer Letters*, 363(2), 156–165. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.04.012>

Feng, Y., Yu, H. M., Shang, D. S., Fang, W. G., He, Z. Y., & Chen, Y. H. (2014). The involvement of CXCL11 in bone marrow-derived mesenchymal stem cell migration through human brain microvascular endothelial cells. *Neurochemical Research*, 39(4), 700–706. <https://doi.org/10.1007/s11064-014-1257-7>

Flores-figueroa, E., & Pelayo, R. (2009). Hematopoyesis *Cancerología 2. Laboratorio de Hematopoyesis y Células Troncales, Unidad de Investigación Médica En Enfermedades Oncológicas. Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.*, 2, 95–107.

Flores-Lujano, J., Allende-López, A., Duarte-Rodríguez, D. A., Alarcón-Ruiz, E., López-Carrillo, L., Shamah-Levy, T., Cebrián, M. E., Baños-Lara, M. del R., Casique-Aguirre, D., Elizarrarás-Rivas, J., López-Aquino, J. A., Garrido-Hernández, M. Á., Olvera-Caraza, D., Terán-Cerqueda, V., Martínez-José, K. B., Aristil-Chery, P. M., Alvarez-Rodríguez, E., Herrera-Olivares, W., Ruíz-Arguelles, G. J., ... Núñez-Enriquez, J. C. (2024). Epidemiology of childhood acute leukemias in marginalized populations of the central-south region of Mexico: results from a population-based registry. *Frontiers in Oncology*, 14(February), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fonc.2024.1304263>

Fribourg, M., Cioni, M., Ghiggeri, G. M., Cantarelli, C., Leventhal, J. S., Budge, K., Bin, S., Riella, L. V., Colucci, M., Vivarelli, M., Angeletti, A., Perin, L., & Cravedi, P. (2021). CyTOF-Enabled Analysis Identifies Class-Switched B Cells as the Main Lymphocyte Subset Associated With Disease Relapse in Children With Idiopathic Nephrotic Syndrome. *Frontiers in Immunology*, 12(September), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.726428>

Fridman, W. H. (2020). The tumor microenvironment: Prognostic and theranostic impact. Recent advances and trends. *Seminars in Immunology*, 48, 101416. <https://doi.org/10.1016/J.SMIM.2020.101416>

Friebel, E., Kapolou, K., Unger, S., Núñez, N. G., Utz, S., Rushing, E. J., Regli, L., Weller, M., Greter, M., Tugues, S., Neidert, M. C., & Becher, B. (2020). Single-Cell Mapping of Human Brain Cancer Reveals Tumor-Specific Instruction of Tissue-Invasive Leukocytes. *Cell*, 181(7), 1626-1642.e20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.055>

Gadalla, R., Noamani, B., MacLeod, B. L., Dickson, R. J., Guo, M., Xu, W., Lukhele, S., Elsaesser, H. J., Razak, A. R. A., Hirano, N., McGaha, T. L., Wang, B., Butler, M., Guidos, C. J., Ohashi, P. S., Siu, L. L., & Brooks, D. G. (2019). Validation of CyTOF against flow cytometry for immunological studies and monitoring of human cancer clinical trials. *Frontiers in Oncology*, 9(MAY), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00415>

Garg, N., Gupta, R., & Kotru, M. (2021). CD34 is not Expressed by Blasts in a Third of B-ALL Patients and its Negativity is associated with Aberrant Marker Expression: A Retrospective Analysis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 22(3), 919–

925. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2021.22.3.919>

- Gary Gilliland, D., & Griffin, J. D. (2002). The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood*, *100*(5), 1532–1542. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-02-0492>
- Givan, A. L. (2001). Principles of flow cytometry: An overview. *Methods in Cell Biology*, *63*(63), 19–50. [https://doi.org/10.1016/s0091-679x\(01\)63006-1](https://doi.org/10.1016/s0091-679x(01)63006-1)
- Gómez-Almaguer, D., Marcos-Ramírez, E. R., Montaña-Figueroa, E. H., Ruiz-Argüelles, G. J., Best-Aguilera, C. R., López-Sánchez, M. del C., Barrera-Chairez, E., López-Arrollo, J. L., Ramos-Peñafiel, C. O., León-Peña, A., González-López, E. E., Rivas-García, P. E., Tellez-Hinojosa, C. A., Gómez-De León, A., & Jaime-Pérez, J. C. (2017). Acute Leukemia Characteristics are Different Around the World: the Mexican Perspective. *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia*, *17*(1), 46–51. <https://doi.org/10.1016/j.clml.2016.09.003>
- Good, Z., Sarno, J., Jager, A., Samusik, N., Aghaeepour, N., Simonds, E. F., White, L., Lacayo, N. J., Fantl, W. J., Fazio, G., Gaipa, G., Biondi, A., Tibshirani, R., Bendall, S. C., Nolan, G. P., & Davis, K. L. (2018). Single-cell developmental classification of B cell precursor acute lymphoblastic leukemia at diagnosis reveals predictors of relapse. *Nature Medicine*, *24*(4), 474–483. <https://doi.org/10.1038/nm.4505>
- Greaves, M. (2018). A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Nature Reviews Cancer*. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0015-6>
- Guzman, M. L., & Allan, J. N. (2014). Concise review: Leukemia stem cells in personalized medicine. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*. <https://doi.org/10.1002/stem.1597>
- Hasselbalch, H. C., Skov, V., Larsen, T. S., Thomassen, M., Riley, C. H., Jensen, M. K., Bjerrum, O. W., & Kruse, T. A. (2011). High expression of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule (CEACAM) 6 and 8 in primary myelofibrosis. *Leukemia Research*, *35*(10), 1330–1334. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2011.03.013>
- He, J., Munir, F., Catueno, S., Connors, J. S., Gibson, A., Robusto, L., McCall, D., Nunez, C., Roth, M., Tewari, P., Garces, S., Cuglievan, B., & Garcia, M. B. (2024). Biological Markers of High-Risk Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancers*, *16*(5), 1–16. <https://doi.org/10.3390/cancers16050858>
- Hernández-Barrientos, D., Pelayo, R., & Mayani, H. (2023). The hematopoietic microenvironment: a network of niches for the development of all blood cell lineages. *Journal of Leukocyte Biology*, *114*(5), 404–420. <https://doi.org/10.1093/jleuko/qiad075>
- Hirata, Y., Furuhashi, K., Ishii, H., Li, H. W., Pinho, S., Ding, L., Robson, S. C., Frenette, P. S., & Fujisaki, J. (2018). CD150 high Bone Marrow Tregs Maintain Hematopoietic Stem Cell Quiescence and Immune Privilege via Adenosine. *Cell Stem Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.01.017>
- Hohtari, H., Brück, O., Blom, S., Turkki, R., Sinisalo, M., Kovanen, P. E., Kallioniemi,

- O., Pellinen, T., Porkka, K., & Mustjoki, S. (2019). Immune cell constitution in bone marrow microenvironment predicts outcome in adult ALL. *Leukemia*, 33(7), 1570–1582. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0360-1>
- Huang, P., Xu, L., Jin, M., Li, L., Ke, Y., Zhang, M., Zhang, K., Lu, K., & Huang, G. (2022). Construction and Validation of a Tumor Microenvironment-Based Scoring System to Evaluate Prognosis and Response to Immune Checkpoint Inhibitor Therapy in Lung Adenocarcinoma Patients. *Genes*, 13(6), 1–21. <https://doi.org/10.3390/genes13060951>
- IARC. (2022). *Cancer Today*. <http://gco.iarc.who.int/today>
- Ingangi, V., Minopoli, M., Ragone, C., Motti, M. L., & Carriero, M. V. (2019). Role of microenvironment on the fate of disseminating cancer stem cells. *Frontiers in Oncology*, 9(FEB), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00082>
- Iyer, A., Hamers, A. A. J., & Pillai, A. B. (2022). CyTOF® for the Masses. *Frontiers in Immunology*, 13(April), 14–17. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.815828>
- Jaime-Pérez, J. C., & Gómez-Almaguer, D. (2009). *Hematología. La sangre y sus enfermedades*.
- Johnson, B., & Mahadevan, D. (2015). Emerging Role and Targeting of Carcinoembryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule 6 (CEACAM6) in Human Malignancies. *Clinical Cancer Drugs*, 2(2), 100–111. <https://doi.org/10.2174/2212697x02666150602215823>
- Juárez-Avendaño, G., Luna-Silva, N. C., Chargoy-Vivaldo, E., Juárez-Martínez, L. A., Martínez-Rangel, M. N., Zárate-Ortiz, N., Martínez-Valencia, E., López-Martínez, B., Pelayo, R., & Balandrán, J. C. (2020). Poor Prognosis Biomolecular Factors Are Highly Frequent in Childhood Acute Leukemias From Oaxaca, Mexico. *Technology in Cancer Research and Treatment*, 19(512), 1–10. <https://doi.org/10.1177/1533033820928436>
- Juárez-Avendaño, G., Méndez-Ramírez, N., Luna-Silva, N. C., Cruz-Hernández, V. A., Gómez-Almaguer, D., Pelayo, R., & Balandrán, J. C. (2021). Molecular and cellular markers for measurable residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Boletín Medico Del Hospital Infantil de Mexico*, 78(3), 159–170. <https://doi.org/10.24875/BMHIM.20000155>
- Karin, N., & Razon, H. (2018). Chemokines beyond chemo-attraction: CXCL10 and its significant role in cancer and autoimmunity. *Cytokine*, 109(January), 24–28. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.02.012>
- Keating, A. (2008). How Do Mesenchymal Stromal Cells Suppress T Cells? *Cell Stem Cell*, 2(2), 106–108. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.01.007>
- Keating, A. (2012). Mesenchymal stromal cells: New directions. *Cell Stem Cell*, 10(6), 709–716. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.05.015>
- Krstic, J., Herrmann, M., Gadjanski, I., & Mojsilovic, S. (2017). Editorial: Microenvironment-derived stem cell plasticity. *Frontiers in Cell and Developmental*

Biology, 5(SEP), 1–2. <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00082>

Kudo-Saito, C. (2015). Cancer-associated mesenchymal stem cells aggravate tumor progression. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 3(APR), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fcell.2015.00023>

Laboratorio de Citómica para el Cáncer Infantil – Conahcyt. (n.d.). Retrieved May 10, 2024, from <https://conahcyt.mx/pronaces/pronaces-salud/leucemia-infantil/proyectos/leucemia-infantil-proyecto-2/>

Lasfar, A., Balan, M., Cohen-solal, K. A., & Zloza, A. (2019). *Editorial: Tumor Microenvironment and Resistance to Current Therapies*. 9(November), 1–3. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01131>

Lasry, A., Nadorp, B., Fornerod, M., Nicolet, D., Wu, H., Walker, C. J., Sun, Z., Witkowski, M. T., Tikhonova, A. N., Guillaumot-Ruano, M., Cayanan, G., Yeaton, A., Robbins, G., Obeng, E. A., Tsirigos, A., Stone, R. M., Byrd, J. C., Pounds, S., Carroll, W. L., ... Aifantis, I. (2022a). An inflammatory state remodels the immune microenvironment and improves risk stratification in acute myeloid leukemia. In *Nature Cancer*. Springer US. <https://doi.org/10.1038/s43018-022-00480-0>

Lasry, A., Nadorp, B., Fornerod, M., Nicolet, D., Wu, H., Walker, C. J., Sun, Z., Witkowski, M. T., Tikhonova, A. N., Guillaumot-Ruano, M., Cayanan, G., Yeaton, A., Robbins, G., Obeng, E. A., Tsirigos, A., Stone, R. M., Byrd, J. C., Pounds, S., Carroll, W. L., ... Aifantis, I. (2022b). An inflammatory state remodels the immune microenvironment and improves risk stratification in acute myeloid leukemia. *Nature Cancer* 2022 4:1, 4(1), 27–42. <https://doi.org/10.1038/s43018-022-00480-0>

le Viseur, C., Hotfilder, M., Bomken, S., Wilson, K., Röttgers, S., Schrauder, A. A. A., Rosemann, A., Irving, J., Stam, R. W., Shultz, L. D., Harbott, J., Jürgens, H., Schrappe, M., Pieters, R., Vormoor, J., Röttgers, S., Schrauder, A. A. A., Rosemann, A., Irving, J., ... Vormoor, J. (2008). In Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia, Blasts at Different Stages of Immunophenotypic Maturation Have Stem Cell Properties. *Cancer Cell*, 14(1), 47–58. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.05.015>

Lee, B. H., Park, Y., Kim, J. H., Kang, K. W., Lee, S. J., Kim, S. J., & Kim, B. S. (2021). Prognostic Value of Galectin-9 Relates to Programmed Death-Ligand 1 in Patients With Multiple Myeloma. *Frontiers in Oncology*, 11(June), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.669817>

Lee, G. Y., Jeong, S. Y., Lee, H. R., & Oh, I. H. (2019). Age-related differences in the bone marrow stem cell niche generate specialized microenvironments for the distinct regulation of normal hematopoietic and leukemia stem cells. *Scientific Reports*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36999-5>

Levis, M. (2017). FLT3 dancing on the stem cell. *Journal of Experimental Medicine*, 214(7), 1857–1859. <https://doi.org/10.1084/jem.20171056>

Li, N., & Hua, J. (2017). *Interactions between mesenchymal stem cells and the immune*

system. 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2473-5>

- Lima, D. S., Lemes, R. P. G., & Matos, D. M. (2018). Immunosuppressive monocytes (CD14+/HLA-DRIow/-) increase in childhood precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia after induction chemotherapy. *Medical Oncology (Northwood, London, England)*, 35(3), 36. <https://doi.org/10.1007/s12032-018-1092-9>
- Liu, J., Gao, J., Liang, Z., Gao, C., Niu, Q., Wu, F., & Zhang, L. (2022). Mesenchymal stem cells and their microenvironment. *Stem Cell Research and Therapy*, 13(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13287-022-02985-y>
- Liu, M., Guo, S., & Stiles, J. K. (2011). The emerging role of CXCL10 in cancer. *Oncology Letters*, 2(4), 583–589. <https://doi.org/10.3892/ol.2011.300>
- Lourdes Mora-García, M., García-Rocha, R., Morales-Ramírez, O., Montesinos, J. J., Weiss-Steider, B., Hernández-Montes, J., Ávila-Ibarra, L. R., Don-López, C. A., Velasco-Velázquez, M. A., Gutiérrez-Serrano, V., & Monroy-García, A. (2016). Mesenchymal stromal cells derived from cervical cancer produce high amounts of adenosine to suppress cytotoxic T lymphocyte functions. *Journal of Translational Medicine*, 14(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-1057-8>
- Lucas, D. (2021). Structural organization of the bone marrow and its role in hematopoiesis. *Current Opinion in Hematology*, 28(1), 36–42. <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000621>
- Lussier, D. M., Schreiber, R. D., & Louis, S. (2016). TUMOR IMMUNOLOGY Cancer Immun-surveillance : Immunoediting. In *Encyclopedia of Immunobiology* (Vol. 4). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374279-7.17001-8>
- Lv, Y., Ma, X., Ma, Y., Du, Y., & Feng, J. (2023). A new emerging target in cancer immunotherapy: Galectin-9 (LGALS9). *Genes and Diseases*, 10(6), 2366–2382. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2022.05.020>
- Mateus, J., Lasso, P., González, J. M., Puerta, C. J., & Cuéllar, A. (2013). 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*, 33(4), 660–672. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v33i4.1709>
- McElroy, A. K., Akondy, R. S., McIlwain, D. R., Chen, H., Bjornson-Hooper, Z., Mukherjee, N., Mehta, A. K., Nolan, G., Nichol, S. T., & Spiropoulou, C. F. (2020). Immunologic timeline of Ebola virus disease and recovery in humans. *JCI Insight*, 5(10). <https://doi.org/10.1172/JCI.INSIGHT.137260>
- Mejía-Aranguré, J. M. (Ed.). (2016). *Etiology of Acute Leukemias in Children*. Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-05798-9_3
- Metzemaekers, M., Vanheule, V., Janssens, R., Struyf, S., & Proost, P. (2018). Overview of the mechanisms that may contribute to the non-redundant activities of interferon-inducible CXC chemokine receptor 3 ligands. *Frontiers in Immunology*, 8(JAN). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01970>

- Mhaidly, R., & Mechta-Grigoriou, F. (2020). Fibroblast heterogeneity in tumor micro-environment: Role in immunosuppression and new therapies. *Seminars in Immunology*, 48, 101417. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2020.101417>
- Mistry, A. M., Greenplate, A. R., Ihrie, R. A., & Irish, J. M. (2019). Beyond the message: advantages of snapshot proteomics with single-cell mass cytometry in solid tumors. *FEBS Journal*, 286(8), 1523–1539. <https://doi.org/10.1111/febs.14730>
- Mitsialis, V., Wall, S., Liu, P., Ordovas-Montanes, J., Parmet, T., Vukovic, M., Spencer, D., Field, M., McCourt, C., Toothaker, J., Bousvaros, A., Ballal, S., Bonilla, S., Fawaz, R., Fishman, L. N., Flores, A., Fox, V., Grover, A. S., Higuchi, L., ... Konnikova, L. (2020). Single-Cell Analyses of Colon and Blood Reveal Distinct Immune Cell Signatures of Ulcerative Colitis and Crohn's Disease. *Gastroenterology*, 159(2), 591-608.e10. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.04.074>
- Modvig, S., Wernersson, R., Øbro, N. F., Olsen, L. R., Christensen, C., Rosthøj, S., Degn, M., Jürgensen, G. W., Madsen, H. O., Albertsen, B. K., Wehner, P. S., Rosthøj, S., Lilljebjörn, H., Fioretos, T., Schmiegelow, K., & Marquart, H. V. (2022). High CD34 surface expression in BCP-ALL predicts poor induction therapy response and is associated with altered expression of genes related to cell migration and adhesion. *Molecular Oncology*, 16(10), 2015–2030. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.13207>
- Moesta, A. K., Li, X. Y., & Smyth, M. J. (2020). Targeting CD39 in cancer. *Nature Reviews Immunology*, 20(12), 739–755. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0376-4>
- Montesinos, J. J., Mora-García, M. D. L., Mayani, H., Flores-Figueroa, E., García-Rocha, R., Fajardo-Orduña, G. R., Castro-Manreza, M. E., Weiss-Steider, B., & Monroy-García, A. (2013). In vitro evidence of the presence of mesenchymal stromal cells in cervical cancer and their role in protecting cancer cells from cytotoxic T cell activity. *Stem Cells and Development*, 22(18), 2508–2519. <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0084>
- Muñoz-Aguirre, P., Huerta-Gutierrez, R., Zamora, S., Mohar, A., Vega-Vega, L., Hernández-Ávila, J. E., Morales-Carmona, E., Zapata-Tarres, M., Bautista-Arredondo, S., Perez-Cuevas, R., Rivera-Luna, R., Reich, M. R., & Lajous, M. (2021). Acute Lymphoblastic Leukaemia Survival in Children Covered by Seguro Popular in Mexico: A National Comprehensive Analysis 2005–2017. *Health Systems and Reform*, 7(1). <https://doi.org/10.1080/23288604.2021.1914897>
- Muñoz-Aguirre, P., Zapata-Tarrés, M., Espinosa-Tamez, P., Sánchez-Blas, H., Brochier, M., & Lamadrid-Figueroa, H. (2022). Childhood acute lymphoblastic leukemia in Mexico: mortality trend analysis, 1998-2018. *Salud Publica de Mexico*, 64(1), 26–34. <https://doi.org/10.21149/13210>
- Muñoz-Aguirre P, Huerta-Gutierrez, ‡, Zamora, ‡, Vega-Vega L, Je, H.-Á., Morales-Carmona E, Zapata-Tarres M, Bautista-Arredondo S, 10, P.-C. R., Rivera-Luna R, & Mr, R. (2020). Health coverage for people without social security in Mexico: a

- retrospective cohort to assess childhood acute lymphoblastic leukaemia survival. *MedRxiv*, 2020.07.09.20149302. <https://doi.org/10.1101/2020.07.09.20149302>
- Muñoz-Pérez, M. J., Casco, S., & Soto-Vega, E. (2017). Distribución del cáncer infantil en el Estado de Puebla. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 16(3), 162–166. <https://doi.org/10.24875/j.gamo.M17000066>
- Nagasawa, T. (2015). CXCL12/SDF-1 and CXCR4. *Frontiers in Immunology*, 6(JUN), 10–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00301>
- Nazari, A., Ahmadi, Z., Hassanshahi, G., Abbasifard, M., Taghipour, Z., Falahati-Pour, S. K., & Khorramdelazad, H. (2020). Effective treatments for bladder cancer affecting CXCL9/CXCL10/CXCL11/ CXCR3 axis: A review. *Oman Medical Journal*, 35(2). <https://doi.org/10.5001/omj.2020.21>
- Negi, N., & Griffin, M. D. (2020). Effects of mesenchymal stromal cells on regulatory T cells: Current understanding and clinical relevance. *Stem Cells*, 38(5), 596–605. <https://doi.org/10.1002/stem.3151>
- Nie, C., Qin, H., & Zhang, L. (2022). Identification and validation of a prognostic signature related to hypoxic tumor microenvironment in cervical cancer. *PLoS ONE*, 17(6 June), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269462>
- Nombela-Arrieta, C., Pivarnik, G., Winkel, B., Canty, K. J., Harley, B., Mahoney, J. E., Park, S. Y., Lu, J., Protopopov, A., & Silberstein, L. E. (2013). Quantitative imaging of haematopoietic stem and progenitor cell localization and hypoxic status in the bone marrow microenvironment. *Nature Cell Biology*, 15(5), 533–543. <https://doi.org/10.1038/ncb2730>
- Núñez-Enríquez, J. C., Romo-Rodríguez, R., Gaspar-Mendoza, P., Zamora-Herrera, G., Torres-Pineda, L., Amador-Cardoso, J., López-Blanco, J. A., Alfaro-Hernández, L., López-García, L., Rosas-Cruz, A., Alberto-Aguilar, D. R., Trejo-Pichardo, C. O., Ramírez-Ramírez, D., Cruz-Maza, A., Flores-Lujano, J., Luna-Silva, N., Martínez-Martell, A., Martínez-Jose, K., Ramírez-Ramírez, A., ... Pelayo, R. (2024). Implementation of a roadmap for the comprehensive diagnosis, follow-up, and research of childhood leukemias in vulnerable regions of Mexico: results from the PRONAI Strategy. *Frontiers in Oncology*, 14(April), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fonc.2024.1304690>
- Oliveira, E., Costa, E. S., Ciudad, J., Gaipa, G., Sedek, Ł., Barrena, S., Szczepanski, T., Buracchi, C., Silvestri, D., Siqueira, P. F. R., Mello, F. V., Torres, R. C., Oliveira, L. M. R., Fay-Neves, I. V. C., Sonneveld, E., van der Velden, V. H. J., Mejstrikova, E., Ribera, J. M., Conter, V., ... Orfao, A. (2022). Bone Marrow Stromal Cell Regeneration Profile in Treated B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia Patients: Association with MRD Status and Patient Outcome. *Cancers*, 14(13). <https://doi.org/10.3390/cancers14133088>
- Oubari, F., Amirizade, N., Mohammadpour, H., Nakhlestani, M., & Zarif, M. N. (2015). The important role of FLT3-L in ex vivo expansion of hematopoietic stem cells following co-culture with mesenchymal stem cells. *Cell Journal*, 17(2), 201–210.

<https://doi.org/10.22074/cellj.2016.3715>

- Pal, D., Blair, H. J., Elder, A., Dormon, K., Rennie, K. J., Coleman, D. J. L., Weiland, J., Rankin, K. S., Filby, A., Heidenreich, O., & Vormoor, J. (2016). Long-term in vitro maintenance of clonal abundance and leukaemia-initiating potential in acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia*, 30(8), 1691–1700. <https://doi.org/10.1038/leu.2016.79>
- Pandey, R., Zhou, M., Islam, S., Chen, B., Barker, N. K., Langlais, P., Srivastava, A., Luo, M., Cooke, L. S., Weterings, E., & Mahadevan, D. (2019). Carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 6 (CEACAM6) in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDA): An integrative analysis of a novel therapeutic target. *Scientific Reports*, 9(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54545-9>
- Pel, M. Van, Fibbe, W. E., & Schepers, K. (2015). *The human and murine hematopoietic stem cell niches: are they comparable?* 55–64. <https://doi.org/10.1111/nyas.12994>
- Pelayo, R., Balandrán, J. C., & Ruiz-Argüelles, A. (2018). *Ontogenia de la inmunidad. La Medicina Es Así.* <https://www.asieslamedicina.org.mx/ontogenia-de-la-inmunidad/>
- Pelayo, R., Dorantes-Acosta, E., Vadillo, E., & Fuentes-P, E. (2012). From HSC to B-Lymphoid Cells in Normal and Malignant Hematopoiesis. *Advances in Hematopoietic Stem Cell Research*. <https://doi.org/10.5772/32213>
- Pena, C., Mirandola, L., Figueroa, J. A., Hosiriluck, N., Suvorava, N., Trotter, K., Reidy, A., Rakhshanda, R., Payne, D., Jenkins, M., Grizzi, F., Littlefield, L., Chiriva-Internati, M., & Cobos, E. (2014). Galectins as therapeutic targets for hematological malignancies: A hopeful sweetness. *Annals of Translational Medicine*, 2(9), 1–7. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2014.09.14>
- Pinho, S., & Frenette, P. S. (2019). Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(5), 303–320. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0103-9>
- Poggi, A., Varesano, S., & Zocchi, M. R. (2018). How to hit mesenchymal stromal cells and make the tumor microenvironment immunostimulant rather than immunosuppressive. *Frontiers in Immunology*, 9(FEB), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00262>
- Portale, F., Cricrì, G., Bresolin, S., Lupi, M., Gaspari, S., Silvestri, D., Russo, B., Marino, N., Ubezio, P., Pagni, F., Vergani, P., Te Kronnie, G., Valsecchi, M. G., Locatelli, F., Rizzari, C., Biondi, A., Dander, E., & D'Amico, G. (2019). ActivinA: a new leukemia-promoting factor conferring migratory advantage to B-cell precursor-acute lymphoblastic leukemic cells. *Haematologica*, 104(3), 533–545. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.188664>
- Prockop, D. J., & Youn Oh, J. (2012). Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): Role as guardians of inflammation. *Molecular Therapy*, 20(1), 14–20. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.211>

- Purizaca, J., Meza, I., & Pelayo, R. (2012). *Early Lymphoid Development and Microenvironmental Cues in B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia*. 43. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2012.03.005>
- Quiroz, E., Aldoss, I., Pullarkat, V., Rego, E., Marcucci, G., & Douer, D. (2019). The emerging story of acute lymphoblastic leukemia among the Latin American population – biological and clinical implications. *Blood Reviews*, 33, 98–105. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2018.08.002>
- Raaijmakers, M. H. G. P. (2011). Niche contributions to oncogenesis: Emerging concepts and implications for the hematopoietic system. *Haematologica*, 96(7), 1041–1048. <https://doi.org/10.3324/haematol.2010.028035>
- Ramírez-Ramírez, D., Padilla-Castañeda, S., Galán-Enríquez, C. S., Vadillo, E., Prieto-Chávez, J. L., Jiménez-Hernández, E., Vilchis-Ordóñez, A., Sandoval, A., Baladrán, J. C., Pérez-Tapia, S. M., Ortiz-Navarrete, V., & Pelayo, R. (2019). CRTAM + NK cells endowed with suppressor properties arise in leukemic bone marrow. *Journal of Leukocyte Biology*, 105(5), 999–1013. <https://doi.org/10.1002/JLB.MA0618-231R>
- Rehe, K., Wilson, K., Bomken, S., Williamson, D., Irving, J., den Boer, M. L., Stanulla, M., Schrappe, M., Hall, A. G., Heidenreich, O., Vormoor, J., Ebinger, S., Özdemir, E. Z., Ziegenhain, C., Tiedt, S., Castro Alves, C., Grunert, M., Dworzak, M., Lutz, C., ... Vormoor, J. (2013). Acute B lymphoblastic leukaemia-propagating cells are present at high frequency in diverse lymphoblast populations. *EMBO Molecular Medicine*, 5(1), 38–51. <https://doi.org/10.1002/emmm.201201703>
- Ren, G., Zhang, L., Zhao, X., Xu, G., Zhang, Y., Roberts, A. I., Zhao, R. C., & Shi, Y. (2008). Mesenchymal Stem Cell-Mediated Immunosuppression Occurs via Concerted Action of Chemokines and Nitric Oxide. *Cell Stem Cell*, 2(2), 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.11.014>
- Rivera-Luna, R., Velasco-Hidalgo, L., Zapata-Tarrés, M., Cárdenas-Cardos, R., & Aguilar-Ortiz, M. R. (2017). Current outlook of childhood cancer epidemiology in a middle-income country under a public health insurance program. *Pediatric Hematology and Oncology*, 34(1), 43–50. <https://doi.org/10.1080/08880018.2016.1276236>
- Romo-Rodríguez, R., Zamora-Herrera, G., López-Blanco, J. A., López-García, L., Rosas-Cruz, A., Alfaro-Hernández, L., Trejo-Pichardo, C. O., Alberto-Aguilar, D. R., Casique-Aguirre, D., Vilchis-Ordóñez, A., Solís-Poblano, J. C., García-Stivalet, L. A., Terán-Cerqueda, V., Luna-Silva, N. C., Garrido-Hernández, M. Á., Cano-Cuapio, L. S., Ayala-Contreras, K., Domínguez, F., del Campo-Martínez, M. de los Á., ... Pelayo, R. (2024). Subclassification of B-acute lymphoblastic leukemia according to age, immunophenotype and microenvironment, predicts MRD risk in Mexican children from vulnerable regions. *Frontiers in Oncology*, 13(January), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1304662>
- Sai, B., Dai, Y., Fan, S., Wang, F., Wang, L., Li, Z., Tang, J., Wang, L., Zhang, X., Zheng, L., Chen, F., Li, G., & Xiang, J. (2019). 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 and Disease*, 10(12), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2149-1>
- Saiz-Gonzalo, G., Hanrahan, N., Rossini, V., Singh, R., Ahern, M., Kelleher, M., Hill, S., O'Sullivan, R., Fanning, A., Walsh, P. T., Hussey, S., Shanahan, F., Nally, K., O'Driscoll, C. M., & Melgar, S. (2021). Regulation of CEACAM Family Members by IBD-Associated Triggers in Intestinal Epithelial Cells, Their Correlation to Inflammation and Relevance to IBD Pathogenesis. *Frontiers in Immunology*, 12(July), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.655960>
- Saldanha-Araujo, F., Ferreira, F. I. S., Palma, P. V., Araujo, A. G., Queiroz, R. H. C., Covas, D. T., Zago, M. A., & Panepucci, R. A. (2011). Mesenchymal stromal cells up-regulate CD39 and increase adenosine production to suppress activated T-lymphocytes. *Stem Cell Research*, 7(1), 66–74. <https://doi.org/10.1016/J.SCR.2011.04.001>
- Salud – Conahcyt. (n.d.). Retrieved February 7, 2024, from <https://conahcyt.mx/pronaces/pronaces-salud/>
- Sarno, J., & Davis, K. L. (2018). Single-cell mass cytometry and machine learning predict relapse in childhood leukemia. *Molecular and Cellular Oncology*, 5(5), 1–3. <https://doi.org/10.1080/23723556.2018.1472057>
- Shinohara, S., Takahashi, Y., Komuro, H., Matsui, T., Sugita, Y., Demachi-Okamura, A., Muraoka, D., Takahara, H., Nakada, T., Sakakura, N., Masago, K., Miyai, M., Nishida, R., Shomura, S., Shigematsu, Y., Hatooka, S., Sasano, H., Watanabe, F., Adachi, K., ... Matsushita, H. (2022). New evaluation of the tumor immune microenvironment of non-small cell lung cancer and its association with prognosis. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 10(4), 1–14. <https://doi.org/10.1136/jitc-2021-003765>
- Steiner, N., Hajek, R., Nachbaur, D., Borjan, B., Sevcikova, S., Göbel, G., & Gunsilius, E. (2019). Levels of CEACAM6 in peripheral blood are elevated in patients with plasma cell disorders: A potential new diagnostic marker and a new therapeutic target? *Disease Markers*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/1806034>
- Su-Yau, M., & Mullins, J. M. (2010). Conjugation of Fluorochromes to Antibodies. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 588, Issue 9, pp. 63–66). <https://doi.org/10.1007/978-1-59745-324-0>
- Sugiyama, T., & Nagasawa, T. (2012). Bone Marrow Niches for Hematopoietic Stem Cells and Immune Cells. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 11(3), 201–206. [internal-pdf://87.203.121.227/IADT-11-201.pdf%0Ahttps://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22452607](https://doi.org/10.1089/ars.2017.7419)
- Szade, K., Gulati, G. S., Chan, C. K. F., Kao, K. S., Miyanishi, M., Marjon, K. D., Sinha, R., George, B. M., Chen, J. Y., & Weissman, I. L. (2018). Where Hematopoietic Stem Cells Live: The Bone Marrow Niche. *Antioxidants and Redox Signaling*, 29(2), 191–204. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7419>

- Terreros, E., DeLeón, R., Sánchez, E., Aguilar, L., Guzmán, L., & Martínez, C. (2009). Guía de Práctica Clínica de Diagnóstico y Tratamiento de Leucemia Linfoblástica Aguda, México. *Cenetec*, 1–42. http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/142_GPC_LEUCEMIA_LINFOBLASTICA/Imss_ER.pdf
- Theunissen, P., Mejstrikova, E., Sedek, L., Van Der Sluijs-Gelling, A. J., Gaipa, G., Bartels, M., Sobral da Costa, E., Kotrová, M., Novakova, M., Sonneveld, E., Buracchi, C., Bonaccorso, P., Oliveira, E., Te Marvelde, J. G., Szczepanski, T., Lhermitte, L., Hrusak, O., Lecrevisse, Q., Grigore, G. E., ... Van Der Velden, V. H. J. (2017). Standardized flow cytometry for highly sensitive MRD measurements in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 129(3), 347–357. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-07-726307>
- Tokunaga, R., Zhang, W., Naseem, M., Puccini, A., Berger, M. D., Soni, S., McSkane, M., Baba, H., & Lenz, H. J. (2018). Target for Novel Cancer Therapy. *Cancer Treatment Reviews*, 63, 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2017.11.007>
- Tokunaga, Ryuma, Zhang, W., Naseem, M., Puccini, A., Berger, M. D., Soni, S., McSkane, M., Baba, H., & Lenz, H. J. (2018). CXCL9, CXCL10, CXCL11/CXCR3 axis for immune activation – A target for novel cancer therapy. *Cancer Treatment Reviews*, 63, 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2017.11.007>
- Tumor Microenvironment. (2020). In A. Birbrair (Ed.), *Advances in Experimental Medicine and Biology* (1st ed., Vol. 1259). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-43093-1>
- Ullah, I., Subbarao, R. B., & Rho, G. J. (2015). Human mesenchymal stem cells - Current trends and future prospective. *Bioscience Reports*, 35. <https://doi.org/10.1042/BSR20150025>
- Van Dongen, J. J. M., Lhermitte, L., Böttcher, S., Almeida, J., Van Der Velden, V. H. J., Flores-Montero, J., Rawstron, A., Asnafi, V., Lécresse, Q., Lucio, P., Mejstrikova, E., Szczepanski, T., Kalina, T., De Tute, R., Brüggemann, M., Sedek, L., Cullen, M., Langerak, A. W., Mendonça, A., ... Orfao, A. (2012). EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*, 26(9), 1908–1975. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.120>
- Velázquez-Avila, M., Balandrán, J. C., Ramírez-Ramírez, D., Velázquez-Avila, M., Sandoval, A., Felipe-López, A., Nava, P., Alvarado-Moreno, J. A., Dozal, D., Prieto-Chávez, J. L., Schaks, M., Rottner, K., Dorantes-Acosta, E., López-Martínez, B., Schnoor, M., & Pelayo, R. (2019). High cortactin expression in B-cell acute lymphoblastic leukemia is associated with increased transendothelial migration and bone marrow relapse. *Leukemia*, 33(6), 1337–1348. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0333-4>
- Vilchis-Ordoñez, A., Contreras-Quiroz, A., Vadillo, E., Dorantes-Acosta, E., Reyes-López, A., Quintela-Nuñez Del Prado, H. M., Venegas-Vázquez, J., Mayani, H., Ortiz-Navarrete, V., López-Martínez, B., & Pelayo, R. (2015). Bone marrow cells

- in acute lymphoblastic leukemia create a proinflammatory microenvironment influencing normal hematopoietic differentiation fates. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/386165>
- Vilchis-Ordoñez, A., Ramírez-Ramírez, D., & Pelayo, R. (2021). The triad inflammation-microenvironment-tumor initiating cells in leukemia progression. *Current Opinion in Physiology*, 19, 211–218. <https://doi.org/10.1016/j.cophys.2020.10.010>
- Villegas Valverde, C. A., Torres López, G., Morejón Morales, A., & Arango Prado, M. del C. (2019). Diseño de un panel de citometría de flujo para muestras de sangre, ascitis y tejido ovárico. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 35(4), 1–19.
- Weiss, A. R. R., & Dahlke, M. H. (2019). Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells (MSCs): Mechanisms of action of living, apoptotic, and dead MSCs. *Frontiers in Immunology*, 10(JUN), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01191>
- Wolock, S. L., Krishnan, I., Tenen, D. E., Matkins, V., Camacho, V., Patel, S., Agarwal, P., Bhatia, R., Tenen, D. G., Klein, A. M., & Welner, R. S. (2019). Mapping Distinct Bone Marrow Niche Populations and Their Differentiation Paths. *Cell Reports*, 28(2), 302-311.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.06.031>
- Xiong, X., Liao, X., Qiu, S., Xu, H., Zhang, S., Wang, S., Ai, J., & Yang, L. (2022). CXCL8 in Tumor Biology and Its Implications for Clinical Translation. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9(March), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.723846>
- Xu, L., Liu, Y., Sun, Y., Wang, B., Xiong, Y., Lin, W., Wei, Q., Wang, H., He, W., Wang, B., & Li, G. (2017). 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 Research and Therapy*, 8(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0716-x>
- Yang, A., Wu, M., Ni, M., Zhang, L., Li, M., Wei, P., Yang, Y., Xiao, W., & An, X. (2022). A risk scoring system based on tumor microenvironment cells to predict prognosis and immune activity in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer*, 29(3), 468–477. <https://doi.org/10.1007/s12282-021-01326-w>
- Yuan, J., & Wang, J. (2022). *A new prognostic model related to tumor microenvironment in colon adenocarcinoma.*
- Zamora-Herrera, G. (2020). *Papel Inmunomodulador de las Células Estromales Mesenquimales en la Leucemia Linfoblástica Aguda* [Benemérita Universidad Autónoma de Puebla]. <https://repositorioinstitucional.buap.mx/items/5aee4b37-693b-4dee-9624-43fba77ab5e4>
- Zang, M., Hu, L., Cao, S., Fan, Z., Pang, L., Li, J., Su, L., Li, C., Liu, W., Gu, Q., Zhu, Z., Yan, M., & Liu, B. (2017). Dual role of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 expression in predicting the overall survival of gastric cancer patients. *Scientific Reports*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11482-9>

- Zapata-Tarrés, M., Balandrán, J. C., Rivera-Luna, R., & Pelayo, R. (2021). Childhood Acute Leukemias in Developing Nations: Successes and Challenges. *Current Oncology Reports*, 23(5). <https://doi.org/10.1007/s11912-021-01043-9>
- Zhang, P., Zhang, C., Li, J., Han, J., Liu, X., & Yang, H. (2019). *The physical microenvironment of hematopoietic stem cells and its emerging roles in engineering applications*. 7, 1–13.
- Zhu, Y. P., Eggert, T., Araujo, D. J., Vijayanand, P., Ottensmeier, C. H., & Hedrick, C. C. (2020). CyTOF mass cytometry reveals phenotypically distinct human blood neutrophil populations differentially correlated with melanoma stage. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 8(2). <https://doi.org/10.1136/jitc-2019-000473>

12. Anexos

12.1. 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:	"Uso del Nichescore para la Generación de Perfiles Predictores en Leucemia Linfoblástica Aguda Pediátrica por Citometría de Masas"
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 haber leído y habiéndome 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

Testigo 1

Nombre, dirección, relación y firma

Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento

Testigo 2

Nombre, dirección, relación y firma



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

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

Nombre del estudio: **"Uso del Nichescore para la Generación de Perfiles Predictores en Leucemia Linfoblástica Aguda Pediátrica por Citometría de Masas"**.

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 cuadrado 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: _____