



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Desarrollo de un Modelo Dinámico de Regulación Intercelular en la
Médula Ósea de la Leucemia Linfoblástica Aguda

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Q.F.B. Jennifer Enciso García

TUTOR PRINCIPAL:

Dra. Rosana Pelayo Camacho

Laboratorio de Linfopoyesis, UIMEO, CMN SXXI, IMSS.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dr. Luis Mendoza Sierra

Instituto de Investigaciones Biomédicas Básicas

Dr. Iván Velasco Velázquez

Instituto de Fisiología Celular

México, D.F., Octubre 2015.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

“Everything must be made as simple as possible.
But not simpler.”

— Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Este trabajo se llevó a cabo bajo la tutoría de la Dra. Rosana Pelayo en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas del Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI y en colaboración con el Dr. Luis Mendoza del Laboratorio de Biología Computacional (CompBioLab) del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Extiendo un atento agradecimiento a ambas Instituciones por las facilidades otorgadas para su desarrollo.

A la Dra. Rosana Pelayo por su incondicional apoyo, ideas y amplio conocimiento aportados a mi persona y a este proyecto.

Al Dr. Luis Mendoza por su paciencia y conocimiento compartido en el área de biología computacional.

Al Dr. Iván Velasco por las aportaciones provistas a este proyecto y el valioso tiempo destinado durante las discusiones semestrales.

A la Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca recibida para estudios de Maestría (368286).

Al Instituto Mexicano del Seguro Social por la beca otorgada por el Programa de Formación de Investigadores (99096739).

Al Programa para el Desarrollo Profesional en Investigación Internacional de Estudiantes de Posgrado (PRODESI) del IMSS, por el apoyo para una estancia académica en el laboratorio del Prof. Denis Thieffry del Institut de Biologie de l'Ecole Normale Supérieure durante el periodo de Mayo – Junio del presente año.

Al Programa de Maestría en Ciencias Bioquímicas de la UNAM y al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) por el apoyo proporcionado para la participación en el Congreso Anual de la International Society of Experimental Hematology (ISEH).

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Ros, infinitamente gracias por la oportunidad de pertenecer a este gran grupo de investigación, por haber confiado en mí y por ser el perfecto modelo de un *mentor* y ejemplo a seguir. Gracias también por el apoyo a mi formación en esta área desconocida para mí hace dos años y por compartir el camino de aprendizaje conmigo.

A los miembros del laboratorio de Linfopoyesis. Gracias Lalo, por tu paciencia al transmitirme el conocimiento, por las discusiones científicas y pláticas no científicas, eres una parte muy importante del crecimiento profesional y personal que he tenido durante estos años. JC, Dalia, Juss, Martha, Gabo, Armando: gracias por su tiempo para discutir las mil dudas que me surgían todo el tiempo, por su desorden, por sus risas y su maravillosa compañía.

A los miembros del CompBioLab, por ser un conjunto tan heterogéneo y rico de conocimientos, gracias a ello he podido aprender un poco de cada uno de ustedes. Gracias por ser tan brillantes y por las tardes de alitas con largas charlas. Teté, porque tu compañía fue un rescate emocional durante mis días de estancia. Akram y Marish por su amistad y consejos, fueron un fuerte soporte en días difíciles.

A Lore y Toño, que a distancia siempre han estado al pendiente de mí y mis progresos. Gracias por su amistad incondicional, sepan que los respeto mucho como personas y amigos.

A Josué, por continuar recorriendo este camino a mi lado. Agradezco todos esos detalles tuyos que me recuerdan día a día que siempre es posible tomarnos de la mano y seguir adelante.

A las dos mejores mujeres que pudo darme la vida por hermana y madre. Gracias a las dos, por admirar mis cualidades acompañadas con un montón de efectos secundarios. Por seguir riendo de mis chistes, preocuparse por mis tropiezos, ser mis confidentes y sobre todo porque ambas son mi gran inspiración. Las amo.

A mi padre, por tu presencia tan latente en mi carácter y mi sed de aprendizaje, te lo debo todo.

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	iv
ABREVIATURAS	v
RESUMEN	vii
ABSTRACT	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1 Sistema hematopoyético	3
I.1.1 Microambiente y nichos hematopoyéticos	5
I.1.1.1 Nicho endosteal u osteoblástico	6
I.1.1.2 Nicho vascular	7
I.1.1.3 Nicho reticular o perivascular	8
I.1.2 Eje CXCL12/CXCR4	10
I.1.3 Leucemia linfoblástica aguda (LLA)	12
I.2 Biología computacional	15
I.2.1 Modelos Booleanos	16
I.2.2 Biología computacional en el estudio de la hematopoyesis	19
II. JUSTIFICACIÓN	21
III. HIPÓTESIS	22
IV. OBJETIVOS	22
IV.1 Objetivo general	22
IV.2 Objetivos particulares	22
V. METODOLOGÍA	24
V.1 Construcción de la red de señalización MSC-HSPC	24
V.2 Desarrollo de las reglas lógicas	25
V.3 Simulaciones computacionales	26
V.3.1 Evaluación de confiabilidad del modelo	26
V.3.2 Evaluación de estabilidad	26
V.3.3 Análisis de estados de transición	27
V.3.4 Simulación de mutantes	27
VI. RESULTADOS	28
VI.1 Propuesta de modelo de interacción intercelular HSPC-MSC	28
VI.2 Obtención de atractores y comparación con los patrones de expresión reportados en la literatura para el tipo silvestre, en presencia y ausencia de Cx43	41
VI.3 Análisis del modelo en presencia de una señal pro-inflamatoria	44
VI.4 Análisis de mutantes	46
VII. DISCUSIÓN	53
VIII. CONCLUSIÓN	57
IX. BIBLIOGRAFÍA	59
ANEXOS	70
Anexo 1. Artículo de revisión: Normal vs. Malignant hematopoiesis: the complexity of acute leukemia through systems biology	70
Anexo 2. Atractores generados por la función <i>getMutants()</i> para la red HSPC-MSC.	76
Anexo 3. Gráficas de análisis de transición adicionales	95
Anexo 4. Funciones programadas en R para análisis de simulaciones	98

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Jerarquía hematopoyética en humanos	4
Figura 2. Principales interacciones entre las células troncales y progenitores hematopoyéticos (HSPC) con los distintos componentes celulares de los nichos hematopoyéticos	9
Figura 3. Expresión de elementos de señalización en MSC y HSPC de MO normal y leucémica: observaciones experimentales del laboratorio de Linfopoyesis	14
Figura 4. Construcción y simulación de un modelo Booleano	18
Figura 5. Red de señalización HSPC-MSK	39
Figura 6. Activación promedio para nodos intracelulares de HSPC, MSC y nodos involucrados en la comunicación intercelular y microambiental.....	45
Figura 7. Activación promedio para red mutante con ganancia de función en el nodo representativo de NFκB en HSPC	95
Figura 8. Activación promedio para red mutante con ganancia de función en el nodo representativo de NFκB en MSC	96
Figura 9. Activación promedio para red mutante con ganancia de función en el nodo representativo de NFκB en MSC e inhibición de VCAM-1 en el paso de tiempo 700 y 1400	97
Figura 10. Perturbación de señales actuando en colaboración para la regulación de la decisión del destino celular de HSPC en el nicho mesenquimal	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Interacciones de las principales vías de señalización involucradas en la expresión de VLA-4 y CXCR4 por HSPC, y la respuesta a sus ligandos VCAM-1 y CXCL12, respectivamente.	30
Tabla 2. Interacciones de las principales vías de señalización que participan en la expresión de VCAM-1 y CXCL12 por MSC.	36
Tabla 3. Reglas lógicas generadas para el modelo HSPC-MSK	40
Tabla 4. Atractores obtenidos de la simulación asíncrona de la red HSPC-MSK	42
Tabla 5. Cuenca de atracción de los atractores de punto fijo y de los atractores complejos obtenida con base en una simulación partiendo de 500,000 estados iniciales a la red	42
Tabla 6. Comparación de los resultados de simulación con mutantes del modelo HSPC-MSK con reportes experimentales.	47

ABREVIATURAS

ATM: Ataxia telangiectasia mutado

BCR: Receptor de células B

CAR: Célula reticular altamente secretora de CXCL12 (*'CXCL12 abundant reticular'*)

CDCélulas dendríticas

CMP: Células progenitoras mieloides comunes (*'Common myeloid progenitors'*)

Cx43: Conexina 43

G-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos

GMP: Células progenitoras de granulocitos y monocitos (*'Granulocyte-monocyte progenitors'*)

GPX-1: Glutación peroxidasa 1

GSK3 β : Glucógeno cinasa sintasa-3

HIF: Factor inducido por hipoxia (*'Hypoxia induced factor'*)

HPC: Célula progenitora hematopoyética (*'Hematopoietic progenitor cell'*)

HSC: Célula troncal hematopoyética (*'Hematopoietic stem cell'*)

HSPC: Células troncales y progenitoras hematopoyéticas (*'Hematopoietic stem and progenitor cells'*)

HSPC: Células troncales y progenitores hematopoyéticos (*'Hematopoietic stem and progenitor cells'*)

IP3: inositol-1,4,5-trifosfato

LLA-B: Leucemia linfoblástica aguda de precursores de células B

LLA: Leucemia linfoblástica aguda

LT-HSC: Célula troncal hematopoyética reconstituyente a largo plazo (*'Long term - hematopoietic stem cell'*)

LT-HSC: Células troncales hematopoyéticas reconstituyentes a largo plazo (*'Long term-Hemapotoyetic stem cells'*)

ITLR: ligando de TLR

MAPK: proteincinasas activadas por mitógenos

MB: Modelo Booleano

MDP: Células progenitoras de macrófagos y células dendríticas (*'Macrophage and dendritic cell progenitors'*)

MEP: Células progenitoras de eritrocitos y megacariocitos (*'Megakaryocyte-erythroid progenitors'*)

MLP: Células progenitoras multilineales (*'Multilineal progenitors'*)

MO: Médula ósea

MPP: Células progenitoras multipotenciales (*'Multipotential progenitors'*)

MSC: Célula estromal mesenquimal (*'Mesenchymal stromal cell'*)

PI3K: Fosfatidilinositol-3-cinasa

ROS: Especies reactivas de oxígeno (*'Reactive oxygen species'*)

SDF: Factor derivado del estroma (*'Stromal derived factor'*) o CXCL-12

SNO: Células osteoblásticas en forma de huso N-cadherina⁺ (*'Spindle-shaped N-cadherin⁺ osteoblastic cells'*)

SOD: Superóxido dismutasa

SP: Sangre periférica

ST-HSC: Célula troncal hematopoyética reconstituyente a corto plazo (*'Short term - hematopoietic stem cell'*)

ST-HSC: Células troncales hematopoyéticas reconstituyentes a corto plazo (*'Short term-Hematopoietic stem cells'*)

VCAM: Molécula de adhesión vascular (*'Vascular cell adhesion molecule'*)

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular (*'Vascular endothelial growth factor'*)

VLA: Antígeno de activación tardía (*'Very late antigen'*)

RESUMEN

Las decisiones de destino celular durante la diferenciación hematopoyética son dependientes de factores intrínsecos y señales extrínsecas provenientes del microambiente de la médula ósea (MO) en la cual residen. La alteración en la composición y funcionalidad de los nichos hematopoyéticos ha sido propuesta como un contribuyente en la progresión de la leucemia linfoblástica aguda (LLA). Ciertos hallazgos de nuestro laboratorio han sugerido la presencia de señales pro-inflamatorias que resultan en el abatimiento de la hematopoyesis normal al tiempo que contribuyen al mantenimiento de las células precursoras de leucemia a través de la perturbación del eje CXCR4/CXCL12.

Mediante la construcción de un modelo Booleano-dinámico, involucrando las principales vías de comunicación entre las células troncales y progenitoras hematopoyéticas (HSPC) y las células estromales mesenquimales (MSC) en la MO, formalizamos dichas observaciones experimentales, así como la predicción de una inestabilidad en los ejes CXCR4/CXCL12 y VLA4/VCAM1 tras perturbaciones microambientales dadas por la señalización temporal de TLR. El modelo Booleano propuesto relaciona a los ejes CXCL12/CXCR4, Cx43 y VCAM1/VLA4 a través de varias vías involucradas en proliferación y diferenciación celulares, y de especial interés, con vías que participan en respuestas pro-inflamatorias (como Gfi-1, β -catenin y NF- κ B).

La simulación computacional del modelo HSPC-MSC genera dos estados estables representando el mantenimiento del contacto entre HSPC con MSC o la ausencia de interacción entre ambos tipos celulares. El análisis de estados de transición en presencia del estímulo de TLR4 emula las observaciones experimentales sobre la activación de vías de proliferación y la regulación negativa de los ejes involucrados en el mantenimiento de las HSPC en el nicho mesenquimal.

Aunque las escasas simulaciones realizadas con mutaciones individuales han sugerido que los elementos e interacciones actuales son insuficientes para la predicción de los destinos de las HSPC, nuestros resultados predicen la co-regulación de eje CXCL12/CXCR4 con señales microambientales adicionales. La expresión anormal de NF κ B en las células hematopoyéticas

inducidas por factores intrínsecos o extrínsecos, puede contribuir a un microambiente tumoral en el cual un asa de retroalimentación negativa sobre los ejes CXCR4/CXCL12 y VLA4/VCAM1 permite el mantenimiento de las células malignas en proliferación.

La comprensión integral de las redes biológicas que operan en la dinámica de la ALL podría beneficiarse de la interacción entre los modelos matemáticos y las estrategias experimentales, proporcionando nuevas hipótesis comprobables. El modelo construido de HSPC-MSK representa un enfoque computacional fuerte y novedoso para la investigación de la regulación de HSPC por elementos microambientales.

ABSTRACT

Cell fate decisions throughout the hematopoietic differentiation pathway depend on intrinsic factors and extrinsic signals provided by the bone marrow microenvironment where they reside. Abnormalities in composition and function of hematopoietic niches have been proposed as key contributors of acute lymphoblastic leukemia (ALL) progression. Previous findings from our group suggest the emergence of pro-inflammatory cues that may be detrimental to normal hematopoiesis while contributing to a CXCR4/CXCL12 disruption-related maintenance of ALL precursor cells.

By developing and simulating a dynamic Boolean system modeling the signaling networks between hematopoietic stem and progenitor cells (HSPC) and mesenchymal stromal cells (MSC) in the bone marrow, we formalized our experimental observations as well as the prediction of an instability in the CXCR4/CXCL12 and VLA4/VCAM1 axis following microenvironmental perturbation due to temporal signaling from TLR ligation.

The proposed Boolean model interconnects the CXCL12/CXCR4, Cx43 and VCAM1/VLA4 axis through different pathways that are involved in cellular proliferation and differentiation, and of special interest, with pathways participating in pro-inflammatory responses (i.e. Gfi-1, β -catenin or NF- κ B). Furthermore, the computational simulation of the HSPC-MSC model drives to two stable states representing either, HSPC contacting MSC, or the absence of contact between them. The transition state analysis under TLR4 stimulation, mimics the experimental proliferation & activation pathways, resulting in down regulation of the axis involved in maintenance of HSPC within the mesenchymal niche.

Although the few computational simulations conducted with single mutations suggested that the current elements and interactions are insufficient for prediction of HSPC fates, our results predict the co-regulation of CXCR4/CXCL12 axis with additional microenvironmental cues. Abnormal expression of NF κ B in hematopoietic cells induced by intrinsic or extrinsic factors, may contribute to a tumor microenvironment where a negative feedback loop over CXCR4/CXCL12 & VLA4/VCAM1 axis allows maintenance of malignant cells.

A more integrative understanding of biological networks in ALL dynamics could benefit from the interplay between mathematical modeling and experimental strategies and provide new testable hypothesis. Our actual HSPC-MSK model represent a strong and novel computational approach for the investigation of HSPC fate regulation by microenvironmental elements.

I. INTRODUCCIÓN

Las células maduras que integran el tejido sanguíneo se encuentran en constante reabastecimiento a partir de la diferenciación de las células troncales hematopoyéticas (HSC). Las decisiones de destino de las HSC son dependientes de factores intrínsecos –genéticos y epigenéticos- y señales extrínsecas liberadas por el microambiente hematopoyético en la médula ósea (MO) en el cual ellas residen (Blank et al. 2008). Dicho microambiente consiste de una estructura tridimensional altamente organizada de distintos tipos celulares, adipocitos, osteoblastos y fibroblastos, factores de crecimiento, citocinas, quimiocinas y múltiples componentes de matriz extracelular (Sugiyama & Nagasawa 2012), que proveen nichos especializados que óptimamente balancean las señales que controlan la auto-regulación, proliferación, diferenciación y migración de las HSC (Sugiyama & Nagasawa 2012; Purizaca et al. 2012). Una de las interacciones más estudiadas en los nichos hematopoyéticos es mediada por el eje CXCL12/CXCR4. CXCL12 (anteriormente conocida como SDF-1a) es una quimiocina secretada por distintos tipos celulares (Tzeng et al. 2011), y en la MO principalmente por las células tipo CAR (CXCL12-abundant reticular cells) y las células osteoblásticas (Sugiyama et al. 2006; Tokoyoda et al. 2004; Kohara et al. 2007; Noda et al. 2011). La señalización de CXCL12 es clave para el mantenimiento de la quiescencia, proliferación, migración y ‘homing’ celular en la MO (Sugiyama et al. 2006). La delección de los genes *Cxr4* y *Cxcl12* en ratón resulta en un fenotipo letal caracterizado por la falta de homeostasis de progenitores hematopoyéticos y la deficiencia en la linfopoyesis de células B y mieloides (Tzeng et al. 2011; Nagasawa et al. 1996; Ma et al. 1998), mientras que la mutación condicional del gen *Cxcl12* promueve el incremento de células progenitoras hematopoyéticas (HPC) en la MO, sangre periférica (SP) e hígado, a expensas de la población de HSC reconstituyente a largo plazo (Tzeng et al. 2011).

La alteración de los nichos hematopoyéticos ha sido propuesta como un factor contribuyente del origen y/o mantenimiento de patologías hematológicas, entre las que se encuentra la leucemia linfoblástica aguda (LLA) (Ayala et al. 2009; Raaijmakers 2011; MacLean et al. 2013; Burger & Kipps 2006; Purizaca et al. 2013). Esta enfermedad constituye el cáncer más frecuente en la infancia a nivel mundial, y representa un problema serio de salud pública en nuestro país. Durante muchos años se propusieron las infecciones recurrentes en los pacientes pediátricos como probable factor etiológico de leucemia. Sin embargo, el único factor ambiental que ha sido

consistentemente asociado a la inducción de leucemia *de novo*, ha sido la exposición a radiación ionizante (Greaves, 2006). Aunque su etiología es todavía incierta y probablemente multifactorial, los últimos años han registrado un progreso sin precedente en la identificación de aberraciones genéticas, patrones transcripcionales anormales y factores epigenéticos que pueden influenciar el desarrollo de las células iniciadoras de la leucemia (Campos-Sanchez et al. 2011). Observaciones de nuestro laboratorio sugieren la existencia de factores microambientales que regulan críticamente la diferenciación y el mantenimiento de dichas células, argumentando a favor de una estrecha intercomunicación de las células leucémicas y sus progenitores con el microambiente hematopoyético de la MO.

En este proyecto se pretende simular, mediante un modelo computacional dinámico discreto, la red de las interacciones de comunicación intercelular más estudiadas en el microambiente hematopoyético normal y leucémico, así como la señalización intracelular río abajo de dichos elementos de comunicación, con la finalidad de validar la hipótesis formulada a partir de las observaciones experimentales de nuestro laboratorio, y de predecir situaciones de desplazamiento de la hematopoyesis leucémica por hematopoyesis normal a través del restablecimiento de las vías propuestas.

La elaboración de modelos computacionales permite la integración, captura, síntesis y organización de información obtenida experimentalmente, y la predicción de comportamientos y mecanismos de regulación de sistemas biológicos (Albert et al. 2007; Wang et al. 2012; Christensen et al. 2007; Wolkenhauer & Mesarovic 2005; Assman & Albert 2009). Un sistema constituido por elementos que interactúan o se regulan entre sí puede ser representado mediante objetos matemáticos llamados gráficas o redes, en la cual los elementos se representan por nodos o vértices (Christensen et al. 2007; Assman & Albert 2009). Los modelos dinámicos discretos, particularmente los modelo Booleanos (MB), han sido aplicados exitosamente en el modelado de redes de regulación genética y redes de señalización celular (Albert & Wang 2009). La inferencia de las redes genéticas de regulación que controlan el mantenimiento de las células leucémicas en la MO será relevante al entendimiento de la biología celular de la enfermedad y posiblemente al futuro diseño de estrategias terapéuticas basadas en la modelación del microambiente tumoral.

I.1 Sistema hematopoyético

El origen del sistema hematopoyético se encuentra en las HSC, las cuales tienen capacidad de autorenovación y multipotencialidad para dar lugar a todas las estirpes celulares que integran el tejido sanguíneo (Eaves et al. 1997; Ogawa 1993). Durante el desarrollo embrionario, las primeras HSC se derivan de la capa mesodérmica y se observan durante la segunda semana de gestación en saco vitelino, en la esplacnopleura paraaórtica y la región aorta-gonadal-mesonefros. Durante la vida fetal la hematopoyesis ocurre en el hígado y posteriormente las HSC migran a la MO, órgano principal en donde ocurre la hematopoyesis durante la vida adulta.

La diferenciación de las HSC es un proceso jerarquizado a través del cual se va adquiriendo un compromiso hacia un linaje celular específico mediante la ganancia de funciones especializadas, la pérdida gradual de la multipotencialidad, el incremento/disminución de la expresión de antígenos de superficie (Figura 1) (Seita & Weissman 2010; Chotinantakul & Leraanaksiri 2012; Acevedo Fernández et al. 2011). El reabastecimiento de las células sanguíneas a través de la hematopoyesis depende de una población de HSC que constituye una pequeña proporción del total de células troncales y progenitoras hematopoyéticas (HSPC) localizadas en la MO (Tzeng et al. 2011; Grosselin et al. 2012). Esta población minoritaria se encuentra quiescente protegiéndose del estrés y de la depleción por excesiva proliferación (Grosselin et al. 2012). Se han identificado dos tipos de HSC según su aptitud clonal para reconstituir el sistema hematopoyético de animales mieloabatis: HSC reconstituyentes a largo plazo (LT-HSC) y HSC reconstituyentes a corto plazo (ST-HSC) (Acevedo Fernández et al. 2011).

Las HSC dan origen a los progenitores multipotenciales (MPP), los cuales han perdido la capacidad de autorenovación y por lo tanto, la capacidad de reconstituir el sistema hematopoyético a largo plazo (Acevedo Fernández et al. 2011). Los MPP diferencian a progenitores mieloides comunes (CMP), los cuales a su vez dan lugar a los progenitores eritroides y megacariocíticos (MEP), progenitores de granulocitos y monocitos (GMP), y los progenitores de macrófagos y células dendríticas (MDP). Las MPP también son capaces de diferenciar a células progenitoras multilinfoides (MLP) que dan lugar a los precursores de células T, progenitoras de células B y NK (B/NK) y MDP (Chotinantakul & Leraanaksiri 2012). En

conjunto, los CMP, MEP, GMP, MDP y B/NK conforman el compartimento de las células oligopotentes, las cuales producirán células precursoras comprometidas a linaje, unipotenciales y con alta capacidad proliferativa (Acevedo Fernández et al. 2011). Las células hematopoyéticas maduras generadas a partir de sus respectivas células precursoras se clasifican en células de linaje linfoide y mieloide. Las células mieloides comprenden a los granulocitos, (neutrófilos, basófilos y eosinófilos), monocitos, macrófagos, eritrocitos, megacariocitos, células cebadas y células dendríticas. Los linfocitos T, linfocitos B y células NK comprenden el grupo de células linfoides. Las células maduras, excepto los linfocitos T, salen a SP a través de los vasos sanguíneos que irrigan la MO. La maduración de los linfocitos T requiere de la migración de los progenitores multipotentes al timo, en donde diferencian a los distintos estadios de timocitos (Acevedo Fernández et al. 2011).

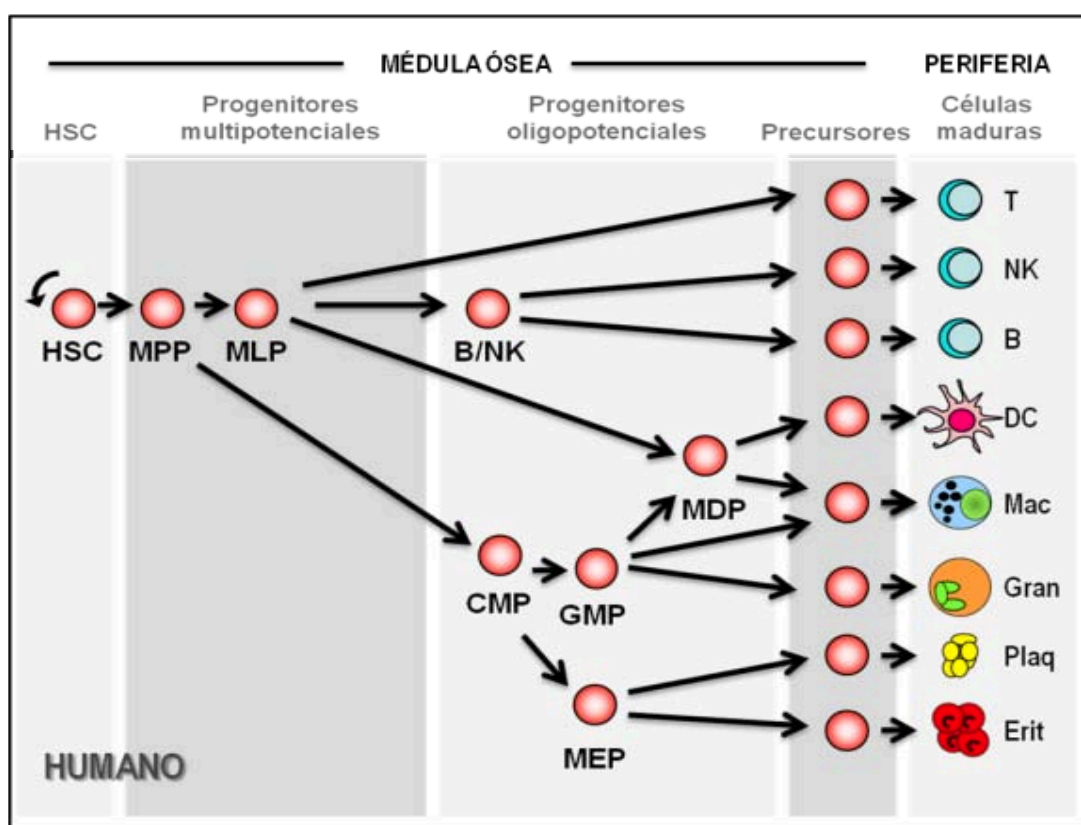


Figura 1. Jerarquía hematopoyética en humanos. Proceso de adquisición de compromiso a linajes celulares específicos y funciones especializadas, a partir de la diferenciación de la HSC, acompañado de pérdida de la multipotencialidad. B, linfocitos B; CMP, progenitor mieloide común; DC, célula dendrítica; Erit, eritrocitos; Gran, granulocitos; GMP, progenitor de granulocitos y monocitos; HSC, célula troncal hematopoyética; Mac, macrófagos, MDP, progenitor de macrófagos y células dendríticas; MEP, progenitor de eritrocitos y megacariocitos; MLP, progenitor multi-linfoide, MPP, progenitor multipotente; NK, células asesinas naturales; Plaq, plaquetas; T, linfocitos T. Tomado de: Vadillo & Pelayo, 2012.

A partir de las progenitoras de B y NK se derivan secuencialmente, las células Pro-B, las Pre-BI grandes, Pre-BII grandes, Pre-BII pequeñas, B-inmaduras y finalmente, se producen las células B maduras (Acevedo Fernández et al. 2011). Las etapas de maduración conocidas como pre-B y pro-B, se identifican principalmente, por el rearrreglo de los genes VDJ de las inmunoglobulinas que conforman el receptor del linfocito B (BCR), factor que da lugar al amplio repertorio de especificidades de los BCR. Cualquier alteración de éste proceso, en la mayoría de los casos, da lugar a el arresto celular y muerte por apoptosis (Fuentes-Pananá, Bannish, Shah, et al. 2004; Fuentes-Pananá, Bannish & Monroe 2004).

La hematopoyesis se encuentra regulada por factores intrínsecos y por factores extrínsecos provistos principalmente por el microambiente hematopoyético. Específicamente, factores solubles como CXCL12 (SDF-1), Flt3L, IL-7 y SCF han mostrado ser críticos en los estadios más tempranos de la linfopoyesis; así como el contacto de precursores de células B con células estromales mediante moléculas de adhesión como VLA-4 y VCAM-1 (Tokoyoda et al. 2004; Purizaca et al. 2012).

I.1.1 Microambiente y nichos hematopoyéticos

El microambiente de la MO está conformado por estructuras tridimensionales complejas y altamente organizadas denominadas nichos hematopoyéticos (Blank et al. 2008; Zhang & Li 2008; Ehninger & Trumpp 2011). El microambiente comprende factores de crecimiento, citocinas, quimiocinas y componentes de matriz extracelular secretados por distintos tipos celulares presentes en la MO, dando lugar a los compartimentos o nichos, los cuales también se definen por su localización en la MO. Se ha observado que las HPSC expresan distintos inmunofenotipos dependiendo del compartimento medular en el cual se encuentren confinadas, diferencias que se han asociado a la composición específica de cada nicho incluyendo también factores como la tensión de oxígeno (Jing et al. 2012). Esta última en la MO de individuos hematológicamente sanos es menor en comparación con la concentración en SP y no es homogénea a lo largo de la MO, consistiendo en un gradiente. En la región de menor tensión de oxígeno, correspondiente a la parte interna del hueso medular o endosteo, se mantiene la población más primitiva y quiescente de células hematopoyéticas (Harrison et al. 2002; Jing et al. 2010). Estos datos sugieren que la condición de hipoxia también está involucrada en la retención

celular en el nicho y en la modulación de la quiescencia de la población más primitiva de células hematopoyéticas (Ehninger & Trumpp 2011). La población quiescente de HSC es mantenida en un estado de bajo estrés oxidativo que tiene como objetivo evitar su diferenciación y agotamiento, además de mantener una baja producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), principalmente producidas por la actividad mitocondrial, las cuales promueven la oxidación del material genético, proteínas y lípidos en la célula (Takubo 2011; Tsai et al. 2011). Una baja concentración de oxígeno inhibe la degradación del factor inducido por hipoxia-1 α (HIF-1 α), factor regulador de la transcripción de numerosos genes entre los cuales se encuentran los codificantes para el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), factor de células troncales (SCF) y CXCL12 en algunas de las células que conforman los nichos, como las células estromales mesenquimales (MSC) (Keith et al. 2012; Ben-Shoshan et al. 2008; Han et al. 2008; Hitchon et al. 2002). Por otra parte, se ha reportado que la hipoxia promueve la diferenciación de las células MSC multipotentes hacia osteoblastos y adipocitos, a través de un mecanismo dependiente de HIF-1 α (Wagegg et al. 2012).

Tomando en cuenta la localización medular y la conformación celular, se han identificado tres nichos hematopoyéticos: endosteal, reticular y vascular (Figura 2) (Sugiyama & Nagasawa 2012; Purizaca et al. 2012).

1.1.1.1 Nicho endosteal u osteoblástico

El nombre de nicho endosteal u osteoblástico hace referencia al tipo celular más característico de éste nicho, las células osteoblásticas que recubren la parte interna del hueso, denominada endosteo (Sugiyama & Nagasawa 2012). Los osteoblastos son células derivadas de progenitores mesenquimales involucrados en la síntesis, deposición y mineralización de la matriz extracelular del hueso (Purizaca et al. 2012; Chotinantakul & Leeanansaksiri 2012). La diferenciación osteoblástica es en parte, mediada por las proteínas morfogénica ósea-2 (BMP-2) y BMP-6 secretadas por las HSC (Chotinantakul & Leeanansaksiri 2012). Los osteoblastos expresan en su superficie ligandos de Notch, Jagged-1 y Jagged-2, que interaccionan con las HSC promoviendo la hematopoyesis en la MO (Chotinantakul & Leeanansaksiri 2012; Nakamura-Ishizu & Suda 2013; Calvi et al. 2003). Otras moléculas reguladoras de la quiescencia de la población de LT-HSC, expresadas o secretadas por los osteoblastos, son Flamingo y Frizzled-8,

que señalizan a través de la vía no canónica de Wnt: angiopoyetina, trombopoyetina, CXCL12 y osteopontina (Nakamura-Ishizu & Suda 2013; Stier et al. 2005; Arai et al. 2004). Otros tipos celulares presentes en el nicho endosteal son los osteoclastos, osteocitos y macrófagos endosteales que regula la secreción de CXCL12 por los osteoblastos y promueve la migración de las células hematopoyéticas. Se ha identificado a una sub-población celular de osteoblastos, denominadas SNO ('spindle-shaped N-cadherin⁺ osteoblastic cells'), las cuales participan en el mantenimiento de las HSC en el nicho endosteal, mantenimiento de la quiescencia e inhibición de la diferenciación a través de la adhesión mediada por N-cadherina y β -catenina (Purizaca et al. 2012; Sugiyama & Nagasawa 2012; Chotinantakul & Leraanaksiri 2012).

I.1.1.2 Nicho vascular

El nicho vascular está conformado por células endoteliales, células estromales Nestina⁺ y macrófagos perivascuales CD169⁺ (Purizaca et al. 2012). Las células endoteliales integran los sinusoides que irrigan la MO y a través de los cuales salen las células sanguíneas generadas mediante el proceso de hematopoyesis (Purizaca et al. 2012; Nakamura-Ishizu & Suda 2013). Se ha reportado que la activación selectiva de las vías Akt y proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK) en células endoteliales de la MO, promueve la auto-renovación de LT-HSC, la expansión de HSPC y la diferenciación a linajes linfoide, mieloide y megacariocítico, además de acelerar la recuperación hematopoyética en ratones mieloabatisados (Kobayashi et al. 2010). La vía Akt es activada por factores de crecimiento como VEGF y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF2), y regula positivamente la secreción de factores estimuladores de HSPC, tales como la proteína 2 de unión a factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP2), ligandos tipo delta 1 (DLL1), BMP-4 y FGF2 (Kobayashi et al. 2010). Por otro lado, esta vía regula negativamente la expresión de factores represores de HSPC como el inhibidor de Wnt, Dickkopf 1 (DKK1) (Kobayashi et al. 2010). Las células endoteliales sinusoidales expresan las moléculas de adhesión E-selectina, P-selectina, molécula de adhesión vascular-1 (VCAM-1), molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1), molécula de adhesión endotelial plaquetaria-1 (PECAM-1), cadherina vascular endotelial (VE-cadherina) y de manera similar a los osteoblastos, expresan Jagged-1 y Jagged-2 reguladores de la población de LT-HSC (Purizaca et al. 2012). A su vez, la expresión de Jagged-1 y Jagged-2 es regulada por la expresión y activación de los receptores de VEGF tipo 2 (VEGFR-2) y VE-cadherina (Figura 2) (Nakamura-Ishizu & Suda 2013). En la región

perivasculares, asociadas a las células endoteliales, se encuentran las MSC Nestina⁺, las cuales expresan VCAM-1 y secretan CXCL12, SCF, angiopoyetina-1, IL-7 y osteopontina (Purizaca et al. 2012; Sugiyama & Nagasawa 2012). La disminución de la población de MSC Nestina⁺ en la MO, inducida por la estimulación con toxina diftérica, se traduce en la movilización de aproximadamente el 50% de HSC hacia hígado, sugiriendo la participación de éste tipo celular en la retención de las HSC en MO (Sugiyama & Nagasawa 2012; Ehninger & Trumpp 2011).

I.1.1.3 Nicho reticular o perivasculares

El nicho reticular, también denominado perivasculares, se encuentra principalmente conformado por MSC CAR, por sus siglas en inglés ‘CXCL12-abundant reticular’. Las MSC CAR se localizan en la interfase del nicho endosteal y del nicho vascular, manteniendo contacto con el endosteo y rodeando a las células endoteliales sinusoidales. El 97% de las células HSC CD150⁺CD48⁺CD41⁻, los precursores tempranos de las células B, células plasmáticas, pDCs y células NK se encuentran asociadas a la red conformada por las células CAR (Sugiyama et al. 2006; Tokoyoda et al. 2004; Kohara et al. 2007; Noda et al. 2011). Las células CAR son las principales secretoras de la quimiocina CXCL12 y de SCF en la MO, además de expresar VCAM-1, y secretar angiopoyetina-1, VEGF y fibronectina (Figura 2) (Omatsu et al. 2010; Nakamura-Ishizu & Suda 2013). La secreción de CXCL12 ha sido sugerida como el factor clave para promover la adhesión de las células HSPC a las células CAR en el nicho reticular y el factor responsable del estado de quiescencia y mantenimiento de HSC en el nicho osteoblástico (Tzeng et al. 2011; Sugiyama & Nagasawa 2012). El mantenimiento de las HSPC en el nicho reticular, a través de la vía de señalización CXCL12/CXCR4, regula su proliferación, diferenciación y migración en la MO (Sugiyama et al. 2006). De manera similar a las MSC Nestina⁺, el abatimiento de la población MSC CAR inducida por la estimulación con toxina diftérica, causa la pérdida parcial de actividad de las HSC debida a la disminución en su actividad proliferativa (Ehninger & Trumpp 2011). Las MSC CAR han sido sugeridas como la población progenitora de adipocitos y osteoblastos (Chotinantakul & Leraanaksiri 2012).

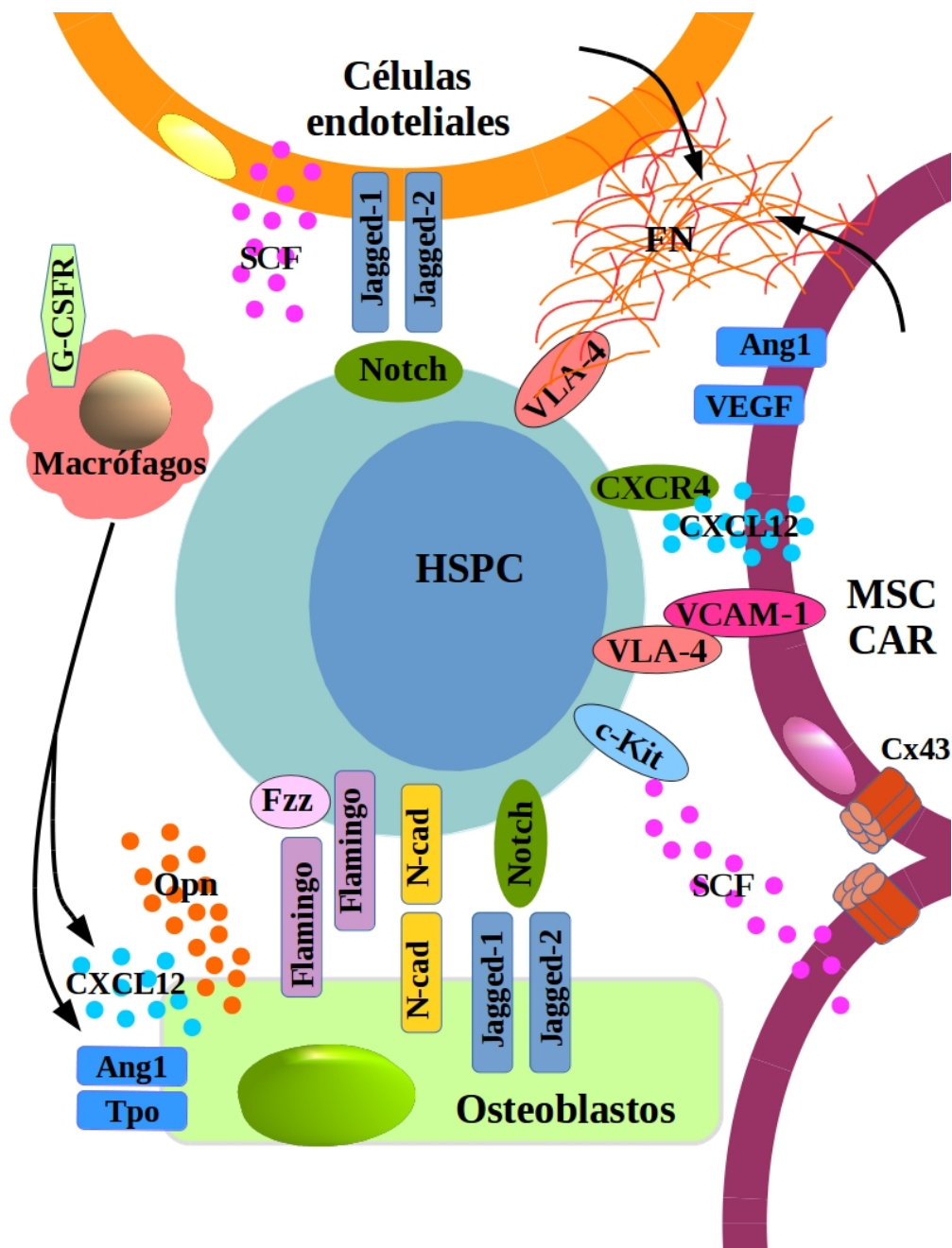


Figura 2. Principales interacciones entre las células troncales y progenitores hematopoyéticos (HSPC) con algunos de los componentes celulares de los nichos hematopoyéticos. Los osteoblastos, las células endoteliales y las células estromales mesenquimales (MSC) son los elementos celulares representativos de los nichos endosteal, vascular y perivascular, respectivamente. Sin embargo, otros tipos celulares también tienen un papel en la regulación de las HSPC, directa o indirectamente mediante a través de los nichos hematopoyéticos. Ang-1, angiopoyetina-1; CXCL12, quimiocina de la familia de ligandos de tipo C-X-C; CXCR4, receptor de CXCL12; FN, fibronectina; Fzz, frizzled; MSC CAR, célula estromal mesenquimal reticular altamente secretora de CXCL12; N-cad, N-cadherina; Opn, osteopontina; SCF, factor de células troncales; Tpo, trombopoyetina; VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular; VLA-4, antígeno de activación tardía; VCAM-1, molécula de adhesión vascular.

I.1.2 Eje CXCL12/CXCR4

Los receptores de quimiocinas conforman una familia de proteínas acopladas a proteína-G, expresadas en la superficie celular con siete dominios transmembranales y caracterizados por su función de inducir la migración celular direccionada hacia un gradiente de citocinas quimiotácticas. Entre esta familia de receptores se encuentra CXCR4, identificado por primera vez en monocitos de sangre periférica e inicialmente denominado LESTR (leukocyte-derived seven-transmembrane domain receptor) (Loetscher et al. 1994). Posteriormente, la misma proteína fue reconocida como co-receptor para la infección de células T CD4⁺ por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Feng et al. 1996). En el mismo año, se identificó a CXCR4 como el receptor del factor derivado de células estromales 1 (SDF-1) (Bleul et al. 1996; Oberlin et al. 1996). SDF-1, también llamado CXCL12, es una quimiocina de la familia de ligandos de tipo C-X-C identificada como un factor de crecimiento estimulador de células pre-B y expresada por una amplia variedad de células mesenquimales como por ejemplo, osteoblastos, células endoteliales y ciertos tipos de células reticulares (Tzeng et al. 2011). Recientemente, se ha encontrado que CXCR7 es un segundo receptor de CXCL12 (Burns et al. 2006). Sin embargo, su función y señalización en células hematopoyéticas aún no es muy clara.

La delección de los genes *Cxr4* y *Cxcl12* en el modelo murino tiene un fenotipo letal caracterizado por una perturbación en la homeostasis de HSPC expresada por la deficiencia en la linfopoyesis de células B y mielopoyesis; además de observarse un desarrollo anormal del sistema neuronal y cardiovascular (Nagasawa et al. 1996; Ma et al. 1998). El estudio en ratón adulto, empleando mutantes condicionales del gen *Cxcl12*, mostró que la pérdida de CXCL12 promueve el incremento de la población de HPC en la MO, SP e hígado a costa de la disminución de la población de HSC reconstituyente a largo plazo; además de observarse un abatimiento significativo en la linfopoyesis de células B (Tzeng et al. 2011). En estudios más generales de knock-out en ratón para CXCL12, CXCR4 y CXCR7 se han observado fenotipos letales durante el desarrollo embrionario o perinatal por daño en el desarrollo hematopoyético, neural, vascular, organogénesis cráneo-facial y cardiaco (Nagasawa et al. 1996; Sierro et al. 2007).

El eje CXCL12/CXCR4 ha sido ampliamente estudiado en las células hematopoyéticas por su papel regulador de la supervivencia, proliferación y migración celular de HSPC. CXCL12,

secretado principalmente por los osteoblastos y las MSC en la MO, se une a CXCR4 expresado en la superficie celular de las HSPC y señala a través de las vías fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K), la familia de serin-treonin proteincinasas Akt (también conocida como PKB), inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) y proteincinasas activadas por mitógenos (MAPK). Se ha observado que la señalización derivada de la activación de CXCR4 regula el mantenimiento de las HSPC en los nichos hematopoyéticos y participa en el mantenimiento de la población quiescente de HSC (Lévesque et al. 2003; Winkler et al. 2013; Christopher et al. 2009; Méndez-Ferrer & Frenette 2007). Además de su papel en el mantenimiento celular en la MO, el eje CXCL12/CXCR4 participa en contextos patológicos de inflamación y respuesta a daño en otros tejidos. En pacientes que han sufrido infarto agudo al miocardio, se ha detectado un incremento en la concentración de CXCL12 en plasma y de CXCR4 en el miocardio isquémico, lo cual se traduce en el reclutamiento de células para la reparación y re-vascularización del tejido (Cheng & Qin 2012). La misma vía de señalización empleada para la quimioatracción de distintos tipos celulares, entre ellos células progenitoras, es aparentemente empleada en procesos oncológicos para inducir la metástasis. Adicional a su papel en la metástasis, estudios realizados en distintos tipos de cáncer, han reportado que la secreción de CXCL12 promueve la angiogénesis en el tumor, y la activación de su receptor CXCR4 favorece la supervivencia y proliferación de las células cancerosas (Lee et al. 2005; Duda et al. 2011).

Uno de los mecanismos sugeridos para la movilización de HSPC de MO inducida por la activación del eje CXCL12/CXCR4, es mediante la regulación de las integrinas $\alpha 1\beta 4$ (ITGA4, VLA-4 o CD49d/CD29), expresadas en la superficie celular de las HSPC (Petty et al. 2009; Sanz-Rodríguez et al. 2001; Peled et al. 2000). La integrina VLA-4 juega un papel importante en la retención de las HSPC en la MO mediante la interacción con la fibronectina de matriz extracelular y con su ligando VCAM-1, el cual es expresado por distintos tipos celulares que conforman los nichos hematopoyéticos (Petty et al. 2009; Sanz-Rodríguez et al. 2001; Peled et al. 2000). En experimentos de bloqueo con anticuerpos o mutaciones en VCAM-1/VLA-4 se ha observado la acumulación de HSPC en SP, lo cual se traduce en el abatimiento de la población primitiva en la MO (Lo Celso & Scadden 2011).

En conjunto, estos dos ejes actúan como mecanismo de comunicación intercelular estroma-HSPC, a través del cual es regulado el mantenimiento de las HSPC en su nicho, el '*homing*' o migración a la MO y su migración a sitios extramedulares.

Publicaciones recientes han reportado un posible papel de CXCR7 en la regulación de la activación de CXCR4. Hasta el momento la mayoría de los experimentos indican que CXCR7 únicamente actúa como receptor 'secuestrador' de CXCL12, debido a que es un receptor no acoplado a proteína G y no moviliza Ca^+ intracelular (Melo et al. 2014). Sin embargo, CXCR7 es capaz de señalar a través de β -arrestina activando la vía de PI3K/Akt. Específicamente en células HSC aisladas de SP no movilizada proveniente de individuos hematológicamente sanos, se reportó que a pesar de la baja expresión de CXCR7 en membrana, su asociación con CXCL12 sinergiza con CXCR4 la activación de PI3K/Akt (Torossian et al. 2014). La función de CXCR7 en proliferación, migración y adhesión en células hematopoyéticas sanas y provenientes de leucemia aún no es muy clara. A pesar de ello, se ha sugerido que participa en el desarrollo y mantenimiento de la LLA al encontrarse incrementado en la superficie de blastos leucémicos e interferir positiva o negativamente en la señalización normal de CXCR4 (Tarnowski et al. 2010).

I.1.3 Leucemia linfoblástica aguda (LLA)

La LLA es un proceso aberrante iniciado en la MO, caracterizado por la proliferación monoclonal y oligoclonal descontrolada de progenitores de células linfoides (Greaves 1997; Pelayo et al. 2012; Purizaca et al. 2012; Dorantes-Acosta & Pelayo 2012). La proliferación anormal de progenitores linfoides causa la supresión de la hematopoyesis normal e induce la infiltración celular de órganos vitales (Campos-Sanchez et al. 2011). Es la principal causa de mortalidad y morbilidad infantil en México y en el mundo, prevaleciendo la LLA de células B (LLA-B). Notablemente, los índices de mortalidad por leucemia en niños, adolescentes y adultos jóvenes en México fueron los más altos reportados entre los años 2000-2004 entre los 21 países Latinoamericanos en estudio (Curado et al. 2011). A pesar de las numerosas investigaciones alrededor del mundo en torno a la LLA poco se conoce sobre su etiología. Sin embargo, en los últimos años se ha registrado un progreso sin precedente en la identificación de aberraciones genéticas, tales como aneuploidías, rearrreglos cromosomales, patrones transcripcionales anormales y factores epigenéticos que pueden influir en el desarrollo de las células iniciadoras de

la leucemia. Algunas de las alteraciones genéticas de mayor frecuencia en la LLA pediátrica son las hiperdiploidías, y las traslocaciones TEL-AML1 t(12;21) y E2A-PBX t(1;19) (Campana & Pui 2008). La traslocación BCR-ABL t(9;22) se asocia con el 30% de los casos de LLA adulta. Otras alteraciones genéticas reportadas son deleciones en los genes *PAX5*, *IKZF1* y *CREBBP* (Mullighan 2012; Iacobucci et al. 2012).

La progresión, mantenimiento y quimioresistencia de la LLA, es aparentemente dependiente de su interacción con las células estromales, más específicamente, con células MSC en la MO. Se ha observado que la supervivencia de células leucémicas incrementa en co-cultivo con LLA-MS, en comparación a cultivos en medio libre de suero (Tabe et al. 2007). Los ejes involucrados en la comunicación intercelular, activan las vías PI3K, mTOR, MEK y NF- κ B, inhibiendo la apoptosis de células de LLA (Jacamo et al. 2014; Nwabo Kamdje & Krampera 2011). Por otra parte, el análisis por citometría de flujo de distintas líneas celulares de leucemia– Kasumi-1, Jurkat, HL-60, KG-1a y K562- ha mostrado que, a pesar de no encontrar diferencias en la expresión de CXCR4, algunas líneas celulares muestran una disminución en la concentración de CXCR4 en la superficie celular sugiriendo un bloqueo en la traslocación del receptor, lo cual se traduce en una disminución en la activación por CXCL12 (Zepeda-Moreno et al. 2012). Recíprocamente, las células leucémicas al interactuar con las MSC activan vías de señalización intracelulares involucrada en supervivencia, proliferación y pro-inflamación (Jacamo et al. 2014; Tabe et al. 2007). Éstos hallazgos sobre la importancia de la comunicación intercelular estroma-HSPC y su alteración en leucemia, ha dirigido las investigaciones, al igual que en otros tipos de cáncer, hacia el estudio del efecto del microambiente como factor relacionado a la progresión y mantenimiento de las células cancerígenas (Ayala et al. 2009; Raaijmakers 2011; MacLean et al. 2013; Burger & Kipps 2006; Purizaca et al. 2013).

Hallazgos aún no publicados de nuestro grupo de trabajo, resumidos en la Figura 3, sugieren que hay un microambiente pro-inflamatorio producido por MSC obtenidas de la MO de pacientes diagnosticados con LLA. Entre las citocinas con un rol pro-inflamatorio, identificadas en el microambiente leucémico destacan G-CSF, IL-1 β y TNF α . Éstas activan distintas vías que podrían derivar en la desregulación de la señalización intercelular estroma-HSPC a través de la perturbación de los ejes CXCL12/CXCR4 y/o VCAM-1/VLA-4. Además del microambiente pro-inflamatorio, hemos observado alteraciones en la expresión de factores reguladores de la

secreción y transcripción de CXCR4 y CXCL12 en HSPC y MSC, respectivamente. Por un lado, en MSC aisladas de la MO de pacientes leucémicos, conexina-43 (Cx43) cuyo papel es la conformación de uniones comunicantes (también denominadas GAP), se encuentra disminuida. La comunicación entre células mesenquimales a través de las uniones de tipo GAP formadas por Cx43, son necesarias para la secreción de CXCL12 (Montecino-Rodriguez et al. 2000; Schajnovitz et al. 2011; Machtaler et al. 2011). También existe una disminución en la expresión del principal regulador transcripcional de *Cxcl12*, HIF-1 α . Por otro lado, en HSPC se encuentra sobre-expresado el represor transcripcional Gfi1, el cual se ha reportado que es inducido por G-CSF y actúa como represor transcripcional de *Cxcr4* (Purizaca et al. 2013; De La Luz Sierra et al. 2007; Hitchon et al. 2002).

Se desconoce si el microambiente es modificado como respuesta a alteraciones en el patrón de secreción de factores solubles provenientes de las células leucémicas o si el patrón de secreción es modificado como respuesta a estímulos provenientes de un microambiente patológico o inflamado. Sin embargo, es altamente probable que existan vías de retroalimentación positiva para el mantenimiento del microambiente leucémico, el cual da soporte y favorece la progresión de la leucemia, además de ser un factor importante en la resistencia a quimioterapéuticos (Iwamoto et al. 2007; Jacamo et al. 2014; Nwabo Kamdje & Krampera 2011).

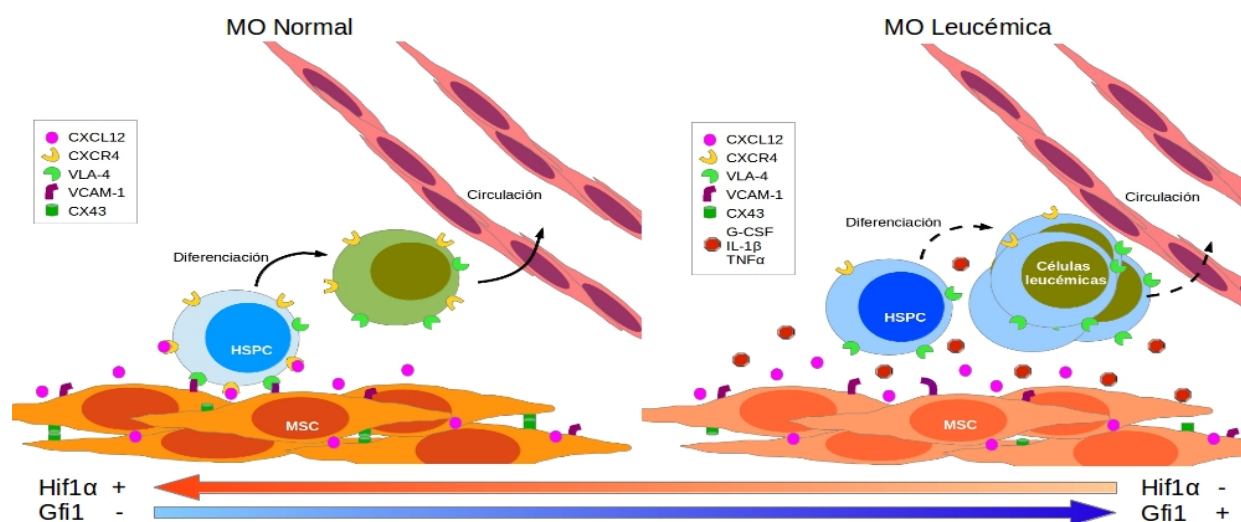


Figura 3. Representación esquemática de hallazgos de nuestro laboratorio sobre la expresión de elementos de señalización en MSC y HSPC en MO leucémica comparada con muestras de MO de individuos hematológicamente sanos.

I.2 Biología computacional

La Biología de sistemas integra elementos que participan en procesos biológicos de interés con la finalidad de comprender las propiedades emergentes a partir de sus interacciones y estudio en conjunto. Una de las ramas de la Biología de sistemas es la biología computacional, la cual emplea la combinación de herramientas informáticas e información obtenida por técnicas experimentales, generalmente con el objetivo de desarrollar modelos cuya estructura y comportamiento son analizados computacionalmente (Wolkenhauer & Mesarovic 2005).

Prácticamente cualquier sistema constituido por elementos que interactúan o regulan entre sí puede ser representado mediante un objeto matemático llamado gráfica o red, esto incluye la representación de comportamientos complejos en sistemas biológicos como vías de señalización celular (Christensen et al. 2007; Assman & Albert 2009). Las redes nos permiten capturar, sintetizar y organizar grandes cantidades de información obtenida experimentalmente mediante el establecimiento de nodos, también llamados vértices, que representan los elementos de un sistema, pudiendo ser estas entidades metabólicas como factores de transcripción, citocinas o módulos funcionales que pueden abarcar desde complejos multienzimáticos hasta organismos o distintos tipos celulares. Las interacciones entre nodos son representados por aristas, las cuales pueden ser de activación o inhibición, y directas representando flujo de información de un nodo inicial hacia un nodo final, o indirectas a través de intermediarios (Christensen et al. 2007; Wang et al. 2012; Albert et al. 2007; Albert & Wang 2009). Los modelos de red son, entonces, una abstracción matemática de elementos que participan en un proceso y las interacciones existentes entre ellos.

Los modelos computacionales han demostrado ser una herramienta útil para describir aspectos cualitativos sobre la dinámica de diferentes procesos biológicos. Para estudiar el comportamiento dinámico de un modelo, se requiere conocer el estado de activación de cada nodo en función del estado de los nodos que lo regulan, también conocidos con el nombre de *inputs*, y las relaciones de regulación que se reflejan en la actualización de patrones de activación de todos los elementos de la red (De Jong 2002).

Los métodos para la inferencia de redes han sido clasificados, de una forma muy general, en top-down y bottom-up (Wang et al. 2012). Los métodos top-down emplean algoritmos estadísticos o probabilísticos que tienen como finalidad organizar e identificar asociaciones entre componentes del sistema biológico de estudio dentro de un contexto específico, como situaciones de patología comparado contra sujetos sanos o presencia de mutantes. La información empleada por los métodos de tipo top-down es obtenida a partir de herramientas experimentales que arrojan grandes cantidades de información, como secuenciaciones masivas y microarreglos. Por otro lado, los métodos bottom-up se basan en hipótesis generadas a partir de datos obtenidos en experimentos de pequeña escala y la integración de esas observaciones aisladas para ser estudiadas de manera integral (Wang et al. 2012).

A partir de las redes inferidas mediante las herramientas de tipo top-down y bottom-up se pueden generar modelos para ser analizados computacionalmente. Los modelos comúnmente más empleados son los modelos dinámicos continuos y los modelos dinámicos discretos (Wang et al. 2012). Los modelos dinámicos continuos representan el cambio de estado de los elementos de la red a través de intervalos regulares denominados pasos de tiempo o time-steps, cambios definidos por variables cuantitativas mediante el uso de ecuaciones diferenciales ordinarias (ODE) (Mendoza & Xenarios 2006; Albert & Wang 2009). Para el diseño de modelos dinámicos continuos, se requiere conocer datos cuantitativos como valores cinéticos, por ejemplo tasa de degradación o tasa de replicación (Wang et al. 2012). Los modelos dinámicos discretos también representan el cambio del estado de los nodos a través de time-steps pero con la diferencia que asumen valores discretos, describiendo el estado de los nodos de una manera más cualitativa (Assman & Albert 2009; Wang et al. 2012).

I.2.1 Modelos Booleanos

Los modelos Booleanos (MB) representan el caso más simple de los modelos dinámicos discretos. Para que un sistema biológico pueda ser representado mediante un MB, se realizan determinadas suposiciones para su simplificación:

- La arquitectura de la red define la mayoría de las características dinámicas de la red. Ésta suposición se fundamenta en la observación del mantenimiento de funcionalidad de los

sistemas biológicas a pesar de las numerosas perturbaciones a las cuales se encuentran constantemente sometidos. Es decir que en condiciones de homeostasis, los fenotipos estables de un sistema biológico se mantienen ante ligeros cambios de concentración de moléculas, tales como citocinas o factores transcripcionales.

- Los elementos de la red, denominados variables Booleanas, asumen un valor binario, 0 o 1, correspondientes a los valores lógicos FALSE/TRUE, o a los estados apagado/encendido, respectivamente (Kauffman 1969). Se asume que las tasas de reacción de los elementos tienen un comportamiento de tipo escalón, permitiendo su modelado con dos estados; un estado de encendido o presencia y un estado de apagado o ausencia. Ésta suposición permite modelar sistemas de los cuales no se tiene suficiente información cuantitativa considerando que existen umbrales de concentración en los cuales una vía o gen está activado o inhibido.
- Los eventos ocurren en intervalos de tiempo discretos, es decir ocurren a intervalos determinados en lugar de ocurrir continuamente, asegurando que el estado del sistema al tiempo observado dependa exclusivamente de su estado en el tiempo anterior (Bansal et al. 2007; Assman & Albert 2009; Kauffman 1969).

Un MB puede representarse por una gráfica $G = (V, E)$, en donde $V = v_1, v_2, v_3, \dots, v_n$ es el conjunto de nodos o vértices que representan los elementos de la red y E es el conjunto de aristas que conectan los vértices (Figura 4a). Cada nodo, v_i , representa una proteína, gen o complejo molecular, con un nivel asociado de expresión X_i . X_i que puede tomar el valor de 1, significando que el gen v_i se expresa y tiene una alta concentración. Si, por el contrario, X_i toma el valor de 0, significa que el gen v_i no se expresa, es decir, su concentración está en un nivel basal o por debajo de este (Albert & Wang 2009; Kauffman 1969). La descripción implícita de E es dada por F , siendo $F = F_1, F_2, F_3, \dots, F_n$ el conjunto de reglas lógicas o funciones de transferencia Booleana. Cada regla lógica tiene como componentes un nodo blanco, un separador (=), una expresión Booleana que permite calcular la transición de un paso de tiempo (t) al siguiente (t+1) para el gen blanco y opcionalmente una regla de probabilidad (Figura 4b). Los operadores lógicos básicos empleados para expresar las funciones de transferencia Booleana son AND, OR y NOT, los

cuales relacionan las variables que actúan como *inputs* del nodo para el cual se escribe la función (Wang et al. 2012).

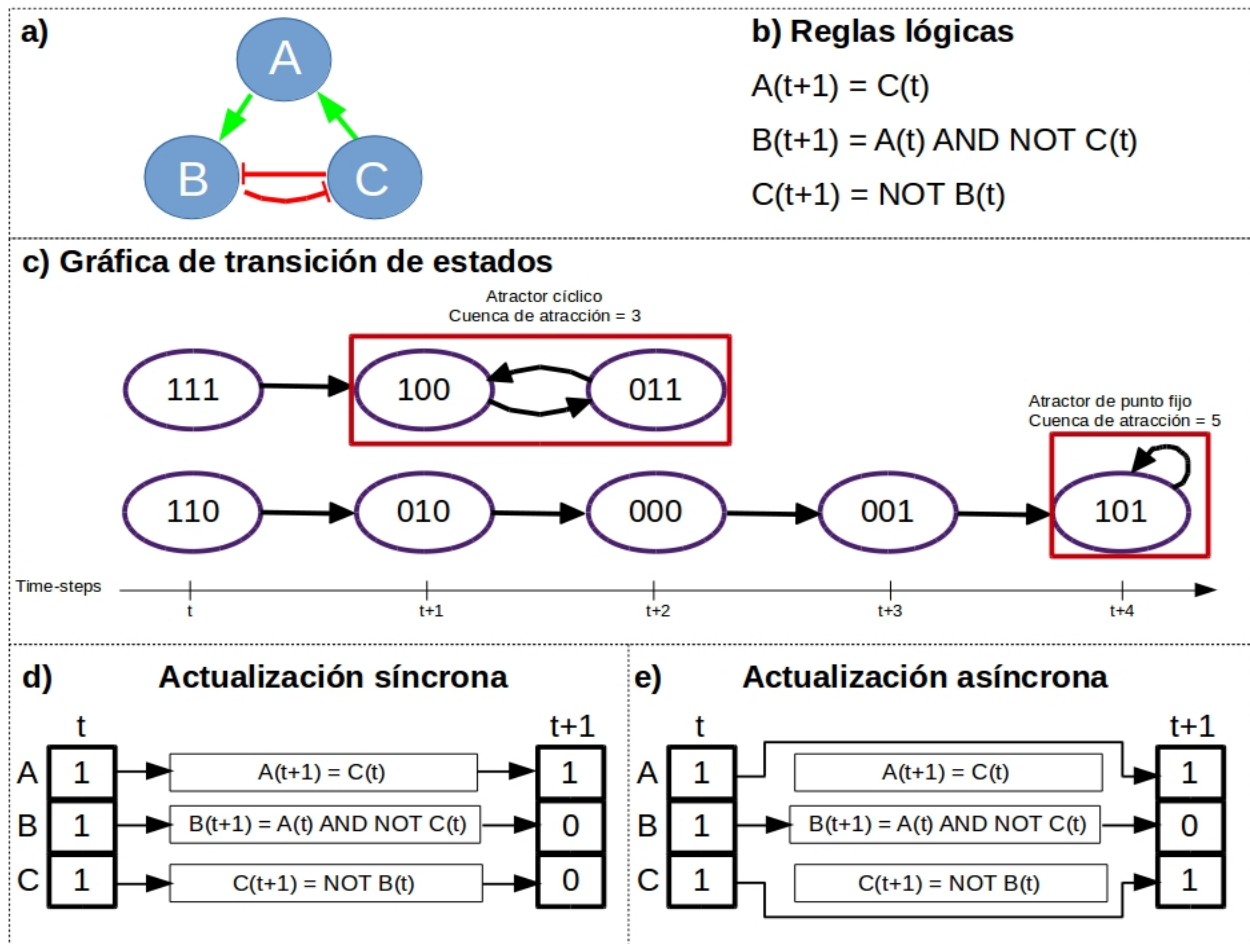


Figura 4. Construcción y simulación de un modelo Booleano. a) Representación gráfica de una red compuesta por 3 nodos (A,B,C) interaccionando a través de regulaciones positivas (flechas verdes) y negativas (flechas truncas rojas). b) Construcción de las reglas lógicas para los nodos A, B y C. c) Gráfica de transición de estados mostrando la dinámica siguiendo un esquema de actualización síncrono. En recuadros rojos se señalan los atractores o estados estables del modelo propuesto. d) Ejemplo de actualización síncrona y e) asíncrona para los nodos A, B y C.

El análisis de los MB se realiza a partir de su simulación como un sistema dinámico y la observación de los comportamientos asintóticos que se pueden encontrar, llamados atractores. Un atractor puede estar compuesto por un estado único o por múltiples estados estableciendo un atractor cíclico. El número de condiciones iniciales que derivan en un determinado atractor después de haber pasado por todos los estados de transición posibles, constituyen la cuenca de atracción (Figura 4c). La dinámica puede ser simulada siguiendo dos posibles esquemas de

actualización: síncrono y asíncrono. En la actualización síncrona, el siguiente estado de la red ($t+1$) es calculado aplicando las funciones de transición a todos los nodos en cada paso de actualización o time-step. En la actualización asíncrona una de las funciones de transición es elegida al azar en cada time-step, y el valor del nodo correspondiente es actualizado (Figura 4d, 4e).

Los modelos desarrollados para estudiar las redes de regulación genética de diferentes tipos celulares, vías de señalización o dinámica de poblaciones han sido capaces de reproducir el comportamiento reportado y permite observar su comportamiento bajo condiciones que no han sido probadas experimentalmente, ofreciendo además de una herramienta analítica y descriptiva, la oportunidad de simular distintos tipos de perturbaciones, como mutaciones de ganancia o pérdida de función.

1.2.2. Biología computacional en el estudio de la hematopoyesis

El proceso de producción de células hematopoyéticas, tanto en estado de salud como en panoramas patológicos, ha sido estudiado desde distintos enfoques empleando modelos matemáticos. Uno de los primeros modelos generados para la validación de datos experimentales, fue el desarrollado por Till y McCulloch en 1963. Basados en su ensayo de formación de colonias en el bazo de ratones irradiados a partir de unidades formadoras de colonias de células multipotentes provenientes de trasplantes de médula ósea, Till y McCulloch obtuvieron cinéticas de producción celular hematopoyética post-trasplante. El modelo resultante buscaba validar la suposición de decisiones de destino azarosas para la generación de nuevas células multipotentes o en diferenciación tras la pérdida de su capacidad de auto-renovación (Till et al. 1963). En paralelo con la acumulación de hallazgos experimentales que evidencian la complejidad de la hematopoyesis en la médula ósea, los modelos matemáticos han ido incluyendo nuevas consideraciones, como el incremento en el número de compartimentos y parámetros cinéticos. Así, la búsqueda de nuevas herramientas matemáticas y computacionales que satisfagan la simulación de poblaciones celulares de gran tamaño, ha promovido la implementación de sistemas de ecuaciones más complejos. Hoy en día aún está en debate si la hematopoyesis puede ser simulada mediante modelos puramente determinísticos o si es preferible emplear modelos

estocásticos debido a la falta de parámetros suficientes para simular la complejidad de las aspas de regulación existentes *in vivo* provistas por un gran número de señales en la médula ósea.

Con el advenimiento de herramientas de biología molecular también se ha incrementado la información de los reguladores intrínsecos para la determinación del linaje hematopoyético a partir de las HSC. Los modelos discretos han sido aplicados para la generación de redes de regulación genética conformadas principalmente por factores transcripcionales, citocinas y moléculas de membrana asociadas a la determinación de un tipo celular maduro específico. Empleando modelos booleanos, dos grupos en paralelo han desarrollado modelos por curación manual de datos para el estudio de la diferenciación y plasticidad de linfocitos T dependiente de la combinación específica de interleucinas (Mendoza 2006, Mendoza & Pardo 2010, Naldi et al. 2010, Martínez-Sosa & Mendoza 2013, Abou-Jaoudé et al. 2015). Por otro lado, un modelo multi-valuado construido a partir de mapas de regulación previamente disponibles y de acceso público, ha sido de gran utilidad para analizar las vías de señalización involucradas en la amplificación de señal desencadenada por el receptor de alta afinidad a IgE expresado en la superficie celular de los mastocitos y responsable de su activación para su participación en la respuesta inmune innata y adaptativa (Niarakis et al. 2014). También es posible modelar una red de regulación genética mediante un modelo dinámico que permite la obtención de datos comparables, no únicamente con fenotipos definidos, sino con datos cuantitativos de expresión. Notablemente, el modelo dinámico para simular el comportamiento de una red construida mediante curación manual, ha permitido una red con los factores involucrados en el paso de diferenciación del progenitor multipotente de pre-instrucción linfoide hacia linfocitos B (Salerno et al. 2015).

En concordancia, el estudio de malignidades asociadas al tejido hematopoyético ha empleado principalmente modelos dinámicos con la finalidad de analizar la progresión de la población celular con comportamientos cinéticos aberrantes (MacLean et al. 2013). Pocos modelos han abarcado la regulación intracelular existente en células hematopoyéticas malignas. Específicamente los modelos propuestos para el estudio de leucemias agudas es brevemente revisado en (Enciso et al. 2015) (Anexo 1).

II. JUSTIFICACIÓN

Nuestros hallazgos experimentales respaldan la hipótesis de que el microambiente hematopoyético que en condiciones normales mantiene a las células primitivas en un estado de quiescencia, protegiéndolas del agotamiento por excesiva proliferación, podría proveer en la leucemia un microambiente patológico de mantenimiento de las células troncales y progenitoras leucémicas en proliferación. El análisis de la expresión de distintas moléculas y citocinas inflamatorias en MSC y HSPC en MO humana normal y MO leucémica sugiere la sustancial disminución de la quimiocina CXCL12 y de HIF1 α en las MSC de la médula leucémica, probablemente inducida por un microambiente pro-inflamatorio con alta expresión de citocinas como IL-1 α/β y TNF α . En concordancia, el bloqueo de la comunicación intercelular estromal posiblemente mediada por la reducción de uniones GAP de Cx43, podría intervenir en la expresión de CXCL12 y ello traducirse en la movilización de los precursores leucémicos del nicho.

La simulación del modelo computacional dinámico discreto (modelo Booleano) conformado por las interacciones intercelulares mediadas por CXCR4/CXCL12 y VLA4/VCAM1, y vías intracelulares involucradas en la activación de ambos ejes de comunicación, puede constituir una herramienta poderosa para la validación de las teorías formuladas a partir de los resultados experimentales obtenidos, y predecir estados biológicos de beneficio o riesgo para el paciente oncológico. El estudio de estados patológicos es posible mediante la simulación del modelo propuesto en presencia de mutantes (activación o inhibición constitutiva de uno o varios elementos) o perturbaciones (estímulo temporal de activación o inhibición de uno o varios elementos).

III. HIPÓTESIS

Si las vías de señalización involucradas en la activación de los ejes propuestos como elementos clave de la comunicación intercelular HSPC-MSK, CXCR4/CXCL12 y VLA4/VCAM, son suficientes para construir un módulo funcional que genere los estados de adhesión y no-adhesión a un nicho mesenquimal regulatorio en presencia y ausencia de condiciones pro-inflamatorias; entonces el modelo Booleano planteado a partir de dichos elementos, nos permitirá comprobar si la perturbación del microambiente hematopoyético en la MO, mediada por el incremento de citocinas pro-inflamatorias, inhibe los ejes de comunicación intercelular y deriva en la migración y proliferación de precursores hematopoyéticos favoreciendo el mantenimiento y progresión de la LLA por la prevalencia de nichos alterados a través de factores producidos por las células leucémicas.

IV. OBJETIVOS

IV.1 Objetivo general

Proponer un modelo Booleano que represente las principales vías de comunicación entre MSN y HSC en la MO, y nos permita, mediante la simulación con mutantes, validar las teorías formuladas a partir de los resultados experimentales de nuestro laboratorio para predecir probables alteraciones que favorezcan la progresión y mantenimiento de la LLA.

IV.2 Objetivos particulares

- Proponer una red de interacciones moleculares entre MSC y HSPC en la MO, construida a partir del planteamiento de los ejes CXCR4/CXCL12 y VLA4/VCAM1 como principales ejes de mantenimiento de las células HSPC en el nicho mesenquimal y de la curación manual de datos reportados en la bibliografía sobre las vías de señalización involucradas en la activación de ambos ejes.

- Construir un modelo Booleano de la red de interacciones HSPC-MSC a partir de los datos reportados en la literatura.
- Simular el comportamiento de la red HSPC-MSC en presencia y ausencia de perturbaciones externas, tales como la presencia de un ligando de TLR-4.
- Simular el comportamiento de la red HSPC-MSC en presencia de mutaciones que representen la pérdida o ganancia de función de los elementos de la red.
- Determinar la posible contribución de la señalización molecular derivada de la interacción HSPC-MSC en el mantenimiento de estados activados de las células de LLA, mediante análisis de atractores y estados de transición resultantes de las simulaciones.

V. METODOLOGÍA

V.1 Construcción de la red de señalización HSPC-MSC

La construcción de la red de señalización se llevó a cabo mediante una revisión bibliográfica exhaustiva de publicaciones sobre la regulación cualitativa de moléculas de adhesión (VCAM-1/VLA-4), moléculas de uniones gap (Cx43) y el eje de comunicación intercelular CXCL12/CXCR4. De especial interés fue la inclusión de factores pro-inflamatorios y represores transcripcionales como IL-1 β y Gfi1, respectivamente. Los trabajos experimentales considerados para la construcción de redes suelen demostrar la interacción física entre dos nodos o la epistasis genética entre los productos de dos genes distintos. Los experimentos que identifican posibles nodos pertenecientes a una red de señalización pueden ser de distintos tipos, como los que a continuación se describen (Assman & Albert 2009):

- Experimentos *in vivo* o *in vitro* que demuestren que las propiedades (localización subcelular, afinidad, actividad, etc) de una proteína u otra molécula son modificadas directamente como consecuencia de una perturbación o señal de entrada (input), o por la acción de elementos asociados a la señal de entrada (input).
- Experimentos que prueben que la concentración de un metabolito (concentración intracelular de Ca²⁺, etc.) cambia como consecuencia de una perturbación o por la modulación de elementos asociados.
- Experimentos farmacológicos en donde se observe que la señal de salida de un sistema es alterada por la administración de algún agente bloqueador de un elemento candidato como nodo intermediario de la red de señalización (inhibidores de cinasas, antagonistas de receptores de membrana, etc.).
- Experimentos en los cuales se reporte la alteración de la señal de salida del sistema biológico de interés, a través de la administración o inducción artificial de la

concentración o actividad de un elemento candidato como nodo intermediario de la red de señalización (quimiocina, citocina, factor de crecimiento, etc.).

- Experimentos genéticos de modelos knock-out, knock-out condicionales, knock-down o sobreexpresión de un elemento candidato como nodo intermediario de la red de señalización.

Las moléculas intermediarias de las distintas vías de señalización podrán ser colapsadas, según sus características de regulación, en nodos funcionales para analizar el comportamiento dinámico y simplificar la red. En este estudio, la red final se esquematizó con el programa yEd.

V.2 Desarrollo de las reglas lógicas

En conjunto, los hallazgos reportados en la literatura y los hallazgos de nuestro laboratorio, sugirieron el tipo de interacción existente entre los elementos de la red, lo cual nos permitió proponer las reglas lógicas o funciones Booleanas. Las reglas lógicas definen las condiciones necesarias para que cada nodo esté encendido. Los operadores lógicos básicos que se emplean para el desarrollo de las reglas lógicas son AND (&), OR (|) y NOT (!) (Albert et al. 2007; Albert & Wang 2009). El operador AND es empleado por BoolNet para representar el requerimiento de dos o más elementos co-participando en la activación del nodo para el cual describe la regla lógica. Si sólo uno de los elementos es suficiente para la activación del nodo, se emplea el operador OR. Puede considerarse como ejemplo, la regla lógica para la integrina VLA-4, la cual requiere para alcanzar el máximo nivel de adhesión, la activación de CXCR4 y la unión de alguno de sus dos ligandos, VCAM-1 o fibronectina. La regla lógica correspondiente para la activación de VLA-4 es representada como:

$$\text{VLA-4} = \text{CXCR4} \ \& \ (\text{VCAM-1} \ | \ \text{fibronectina})$$

Finalmente, el operador NOT es empleado para indicar la actividad represora de un elemento sobre otro. Por ejemplo, la transcripción y secreción de IL-1 β es regulada positivamente por la vía NF κ B, promotora de la transcripción de pro-IL-1 β . Sin embargo, la maduración de pro-IL-1 β a IL-1 β requiere de la activación de caspasas reguladas positivamente por el incremento en la concentración de ROS. Por otro lado, la activación de la vía PI3K/Akt estimula la expresión del

antagonista de IL-1 (IL-1Ra). Considerando las interacciones anteriores, la regla lógica para la activación de IL-1 β será:

$$\text{IL-1}\beta = (\text{NF}\kappa\text{B} \ \& \ \text{ROS}) \ \& \ ! \ \text{PI3K/Akt}$$

V.3 Simulaciones computacionales

V.3.1 Evaluación de confiabilidad del modelo

El comportamiento dinámico de la red fue analizado a través de la introducción de las reglas lógicas en el programa BoolNet (Müssel et al. 2010). BoolNet, empleando la función *getAttractors()*, realiza una simulación a partir de todos los estados iniciales posibles de la red, que corresponden a 2^n , en donde n equivale al número de nodos que conforman la red. El método de búsqueda de estados iniciales que considera todo el espacio de estados iniciales posibles es denominado exhaustivo y únicamente es posible emplearlo en simulaciones empleando un esquema de actualización síncrono. La función *getAttractors()* además de realizar simulaciones por el método exhaustivo, permite también, emplear un método de generación de un número establecido de estados iniciales al azar. El número de estados iniciales para éste método es establecido por el usuario.

La evaluación de la red silvestre se realizó analizando los atractores arrojados por simulaciones, empleando el método de búsqueda exhaustivo para el esquema de actualización síncrono y al azar partiendo de 50,000 estados iniciales para las simulaciones empleando un esquema de actualización asíncrono. La comprobación de confiabilidad del modelo se evaluó mediante la comparación de los atractores obtenidos en las simulaciones y las características del fenotipo silvestre reportadas en la literatura. El modelo estuvo sujeto a la modificación de las reglas lógicas, introducción y eliminación de elementos continuamente, con la finalidad de alcanzar la representación más confiable de los procesos biológicos que se estaban evaluando.

V.3.2 Evaluación de estabilidad

La estabilidad de los atractores fue evaluada mediante la generación de una y dos perturbaciones simultáneas. A partir de los atractores de punto fijo obtenidos simulando la red silvestre (ausencia de mutaciones), se realizó para cada nodo, una perturbación o intercambio en

el estado de activación ($0 \rightarrow 1$, $1 \rightarrow 0$). Tomando como estado inicial el atractor perturbado, se evaluó si la simulación con esquema de actualización síncrono, lleva a un atractor diferente o si vuelve al atractor original. El regreso al atractor inicial refleja la estabilidad del atractor evaluado. El valor de estabilidad del atractor es dado por el número de perturbaciones que retornan al atractor inicial entre el total de perturbaciones posibles.

V.3.3 Análisis de estados de transición

En cada simulación se comienza con un estado inicial arbitrario y el resultado representa el perfil dinámico de una sola célula. Las células que forman parte de una población reaccionan de manera independiente a estímulos extrínsecos y a partir de condiciones iniciales heterogéneas. Computacionalmente, la respuesta o comportamiento de una población se puede analizar empleando un modelo dinámico discreto, a través de la obtención del promedio de los estados de activación de un número definido de corridas con estados iniciales al azar (Wu et al. 2009). Este análisis se realizó mediante la obtención de los valores promedio del estado de activación de cada nodo en un total de 50,000 simulaciones, por 2,000 pasos de tiempo. La gráfica de los estados promedio de activación a lo largo del intervalo de simulación, refleja el comportamiento de una población celular. Éste tipo de análisis nos permite observar de una manera más gráfica la dinámica de transición del modelo partiendo de un estímulo temporal pro-inflamatorias (ITLR), el cual, a su vez, enciende mecanismos de regulación de la respuesta celular.

V.3.4 Simulación de mutantes

Una vez evaluado el modelo en condiciones silvestres, se estudiaron mutantes nulas o de pérdida de función (nodo apagado permanentemente, $NODO=0$), y de expresión constitutiva (nodo encendido permanentemente, $NODO=1$) para cada uno de los elementos de la red empleando la función *fixgenes()* del paquete BoolNet. El número de mutantes posibles es igual al número de nodos $\times 2$ (mutante nula y ganancia de función). La evaluación de mutantes es tanto una evaluación de confiabilidad mediante la comparación de los atractores obtenidos con fenotipos mutantes reportados en la literatura, como una herramienta predictiva, si las mutantes aún no han sido reportadas. La modificación en el estado de activación de los nodos en los atractores sugerirán el probable fenotipo *in vivo*, resultante de la mutación evaluada.

VI. RESULTADOS

VI.1 Propuesta de modelo de interacción intercelular HSPC-MSC.

A partir de la revisión y análisis exhaustivo de la literatura científica disponible en la base de datos PubMed ofrecida por la Biblioteca Nacional de Medicina de Estados Unidos, se compiló la información necesaria para proponer una red de señalización inter e intracelular para MSC y para HSPC con vías de señalización que participan en la regulación de los ejes más estudiados para la retención de las HSPC en la MO. Los nodos de los cuales se partió para la construcción de ambas redes de regulación fueron propuestos basándonos en datos experimentales de nuestro laboratorio (Purizaca et al. 2013; Vilchis-Ordoñez et al. 2015). Los hallazgos reportados consisten en la observación del incremento en la expresión de Gfi1 en blastos provenientes de muestras de pacientes leucémicos, disminución de la expresión de CXCL12 y Cx43 en MSC de las mismas muestras, y alteración en el patrón de secreción de citocinas mediadoras de la inflamación y factores de crecimiento producidos tanto por los blastos leucémicos como por las MSC. Estas observaciones involucran 2 sistemas, el mesenquimal (MSC) y el hematopoyético (HSPC), comunicados a través de ejes regulados río abajo de Gfi1 y Cx43. Por un lado, Gfi1 es un represor transcripcional que inhibe la expresión de CXCR4 y por el otro lado, la secreción de CXCL12 por las MSC es regulada por la comunicación entre células mesenquimales a través de Cx43. Finalmente, es bien conocido que las condiciones generadas por un microambiente pro-inflamatorio interfieren en la homeostasis de la MO para poder satisfacer las demandas celulares ante alguna perturbación al organismo como daño tisular o infección.

Adicional al eje CXCR4/CXCL12, la interacción VLA-4/VCAM-1 ha sido identificada como necesaria para el mantenimiento de HSPC en la MO, más específicamente en el nicho mesenquimal en donde la proliferación y diferenciación de este estadio de las células hematopoyéticas es finamente regulada. Bajo condiciones de perturbación de alguno de los dos ejes anteriormente mencionados, los reportes han sido consistentes respecto a la observación de hiperproliferación celular en la MO y migración de HSPC a sitios extramedulares.

Por lo tanto, tomando en consideración los ejes principales CXCR4/CXCL12 y VLA-4/VCAM-1, los reguladores sugeridos Gfi1 y Cx43, así como la observación de citocinas pro-inflamatorias

como IL-1 β y G-CSF, el siguiente paso consistió en buscar los elementos que estuvieran mediando la interacción entre los nodos anteriormente sugeridos. Los reportes sobre las consecuencias de la perturbación de los ejes de mantenimiento de las HSPC en MO, nos llevaron a investigar en la literatura vías involucradas en la regulación de entrada y arresto de ciclo celular, migración y supervivencia celular, tales como: PI3K/Akt, ERK y NF κ B. Adicional a estos nodos representando quimiocinas, receptores, canales, integrinas, cinasas y factores transcripcionales, otros elementos fueron documentados para ser integrados a la red.

Inicialmente se construyeron dos submodelos con la finalidad de optimizar la verificación de las interacciones y el tiempo de cómputo. El submodelo o subsistema HSPC tiene como input CXCL12 y VCAM-1 y ningún elemento como output. El segundo subsistema MSC consideraba como input Cx43, y como output CXCL12 y VLA4. Ambos subsistemas incluyeron, además, un input de ligando de TLR (lTLR) con la finalidad de simular un estímulo de perturbación del estado homeostático y desencadenante de respuestas pro-inflamatorias. Una vez establecidos ambos subsistemas, se unieron el meta-modelo HSPC-MSC estableciendo la interacción de CXCL12 con CXCR4 y de VCAM-1 con CXCL12. Los inputs del modelo son Cx43 y lTLR. Ambos tipos celulares son susceptibles a la estimulación con lTLR y secretores de IL1 β . En el modelo propuesto G-CSF está regulada principalmente por la presencia de IL1 β en el microambiente y se considera que es secretada por células mesenquimales, aunque también es expresada por células hematopoyéticas como células mieloides en la MO (Tesio et al. 2013)

Las interacciones entre los elementos propuestos para la construcción del modelo se encuentran justificadas en la Tabla 1 para los elementos del sub-sistema HSPC (nodos con terminación '_H') y en la Tabla 2 para los elementos del sub-sistema MSC (nodos con terminación '_M'). Las reglas lógicas generadas para modelo HSPC-MSC (Tabla 3), para su posterior simulación en BoolNet, fueron generadas a partir de las interacciones referenciadas. En la Figura 5 se muestra la representación gráfica del modelo propuesto.

Tabla 1. Interacciones de las principales vías de señalización involucradas en la expresión de VLA-4 y CXCR4 por HSPC, y la respuesta a sus ligandos VCAM-1 y CXCL12, respectivamente.

Nodo A		Nodo B	Observación	Referencia	Modelo
GSK3B_H	-	β -catenina_H	GSK3 β fosforila a β -catenina, señal para su posterior ubiquitinación y degradación proteosomal.	(Perry et al. 2011)	HSC (M)
CXCL12_M	->	CXCR4_H	El receptor de CXCL12 juega un papel importante en el mantenimiento de las células HSPC en al MO, además de regular su proliferación y quiescencia. CXCL12 señala a través de su unión con el receptor membranal CXCR4 acoplado a proteína G.	(Peled et al. 2000; Spiegel et al. 2004; Sugiyama et al. 2006)	Células CD34+ (H), células precursoras de B de LLA (H), HSC (M).
CXCR7_H	-	CXCR4_H	En células que co-expresan ambos receptores, CXCR7 disminuye la señalización por CXCR4 debido a que CXCL12 tiene mayor afinidad por CXCR7 que por CXCR4, a la vez que β -arrestina tiene mayor afinidad por el complejo CXCR7/CXCL12 que por CXCR4/CXCL12. Adicionalmente, CXCR7 forma heterodímeros con CXCR4 induciendo su internalización y degradación.	(Melo et al. 2014; Coggins et al. 2014; Torossian et al. 2014; Uto-Konomi et al. 2013)	Células de LLA-T (H), Jurkat (H), células de cáncer de mama (H), HSPC (H) y simulaciones <i>in silico</i> .
G-CSF	-	CXCR4	G-CSF incrementa la concentración de elastasa de neutrófilos y catepsina G en la MO, proteasas que en experimentos <i>in vitro</i> rompen a CXCR4 en el sitio intermedio entre el primer y segundo dominio transmembranal inhibiendo sus propiedades quimiotácticas.	(Lévesque et al. 2003)	Línea celular de LLA-B (H), HPC (H).
Gfi1_H	-	CXCR4	En células mieloides se ha reportado una inhibición directa de CXCR4 por la unión de Gfi1 en la región promotora del gen. Por otro lado, en HSC se puede inferir el probable mantenimiento de la represión Gfi1-CXCR4, debido a que las HSC provenientes de ratones Gfi1b ko/ko, inhibidor de Gfi1, muestran una elevada expresión de CXCR4.	(De La Luz Sierra et al. 2007; Khandanpour et al. 2010)	Línea celular mielóide (M), HSC (M).
CXCL12	->	CXCR7	CXCR7 es un receptor alternativo de alta afinidad a CXCL12, el cual se expresa en células HPC en una menor concentración que el receptor CXCR4. CXCR7 es un receptor de quimiocinas atípico, de señalización mediada por β -arrestina.	(Burns et al. 2006; Tarnowski et al. 2010; Torossian et al. 2014)	Líneas celulares endotelial, cáncer de mama y hematopoyéticas (H). Células mononucleares de SP y HSPC (H).

Nodo A		Nodo B	Observación	Referencia	Modelo
NFκB_H	->	CXCR7	El promotor del gen de CXCR7 contiene tres sitios de unión para NFκB. Su actividad promotora sobre la transcripción de CXCR7 fue comprobada realizando mutaciones en cada uno de los tres sitios identificados e inhibiendo directamente la actividad de NFκB.	(Tarnowski et al. 2010)	Líneas celulares hematopoyéticas (H)
CXCR4 & PI3KAkt_H	->	ERK_H	El cultivo de células dendríticas con inhibidores de PI3K -α, -γ y δ, disminuye la fosforilación de ERK1/2 mediada por la estimulación de CXCR4 con CXCL12.	(Delgado-Martín et al. 2011)	Células dendríticas (M).
CXCR7	->	ERK_H	Bajo condiciones de bloqueo del receptor CXCR4, la unión de CXCL12 con CXCR7 promueve la fosforilación de ERK1/2.	(Kumar et al. 2012)	Células T Jurkat (H)
FoxO3a_H	-	ERK_H	FoxO3a está involucrado en un asa de retroalimentación negativa, a través de Spred2 y p27Kip1, que regula la fosforilación de ERK.	(Miyamoto et al. 2008)	HPC (M)
G-CSF	->	ERK_H	La unión de G-CSF a su receptor estimula la activación de la vía PI3K/Akt, que en colaboración con ERK y NFκB, estimula la producción de MMP2.	(Liu et al. 2007; Furmento et al. 2014)	Línea celular de trofoblasto (H) y HPC (M).
GSK3B_H	-	ERK_H	GSK3β inhibe la fosforilación de ERK1/2 inducida por LPS. En condiciones de inhibición de GSK3β se observa una hiperactivación de ERK1/2, reversible a través de la inhibición de PKCδ.	(Noh et al. 2012)	Células dendríticas (M).
Gfi1_H	->	ERK_H	En células MN de MO de ratones Gfi1-/- se observa una disminución en la activación de la vía ERK tras la estimulación con G-CSF.	(de la Luz Sierra et al. 2010)	Células MN de MO (M).
ROS_H	->	ERK_H	Células cultivadas bajo condiciones de estrés oxidativo, incrementan la activación de MAP cinasas incrementando la fosforilación de ERK1/2.	(Griffith et al. 1998; Keshari et al. 2013)	Neutrófilos y células T Jurkat (H).
VLA-4	->	ERK_H	La interacción mediada por la integrina VLA-4 expresada en la superficie de las células hematopoyéticas y sus ligandos en la MO, activa entre otras vías de señalización, a ERK1/2. La activación de ERK1/2 se ve disminuida al inhibir la actividad fosfotransferasa de la cinasa ligada a integrinas.	(Mcgilvray et al. 1997; Tabe et al. 2007)	Línea celular de AML (H).
β-catenina_H	->	FoxO3a_H	β-catenina interacciona directamente con los factores FoxO1, Foxo3a y FoxO4 promoviendo la transcripción de sus genes blanco. Su interacción requiere secuencias repetidas armadillo en β-catenina y la porción C-terminal de los factores FoxO.	(Essers et al. 2005)	Células B de linfoma (H) y adenocarcinoma (H). Modelo doble-híbrido en levadura.

Nodo A		Nodo B	Observación	Referencia	Modelo
ERK_H	-	FoxO3a_H	ERK regula negativamente a FoxO3a promoviendo su degradación vía Mdm2 y su traslocación a citoplasma por fosforilación en Ser 294, Ser 344 y Ser 425.	(Yang et al. 2008)	Células de cáncer de mama (H), hepatoma (H) y fibroblastos embrionarios (M).
PI3KAkt_H	-	FoxO3a_H	Akt fosforila e inhibe a los factores transcripcionales de la familia FoxO, incluyendo a FoxO3a. La fosforilación de FoxO3a en residuos serina/treonina, por Akt, promueve su traslocación del núcleo hacia el citoplasma.	(Brunet et al. 1999; Miyamoto et al. 2008; Park et al. 2008)	HSC (Miyamoto, M)
ROS_H	->	FoxO3a_H	La actividad y regulación de factores FoxO, homólogos a DAF en <i>Caenorhabditis elegans</i> , se encuentra aparentemente conservada en células de mamífero. En distintos tipos celulares se ha observado la activación mediante distintos mecanismos, de los factores FoxO en respuesta a distintos estímulos de estrés, entre ellos el incremento de ROS. Algunos de los mecanismos de activación son mediados por la vía JNK, por la actividad de acetilasas y GTPasa Ral.	(Brunet et al. 1999; Essers et al. 2005)	Células embrionarias de riñón (H), de carcinoma de colon (H), fibroblastos embrionarios (M), mioblastos (M).
G-CSF	->	Gfi1_H	La estimulación de células MN con G-CSF incrementa expresión de Gfi1 <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .	(De La Luz Sierra et al. 2007; de la Luz Sierra et al. 2010; Zhuang et al. 2006)	Suspensiones celulares de MO, SP, timo e hígado (M). Línea celular mieloide (M).
Gfi1_H	-	Gfi1_H	Se han identificado motivos conservados en rata, ratón y humano, en el promotor del gen Gfi1, a los cuales se une el factor transcripcional Gfi1 reprimiendo a través de un mecanismo cis.	(Doan et al. 2004; Yücel et al. 2004)	Células T Jurkat (H), linfocitos T y B (M).
TLRs_H	->	Gfi1_H	Gfi1 es inducido como respuesta a la activación de TLR-4 con LPS y regula la inducción de blancos de la vía NFκB mediante la interacción con la subunidad p65 en el núcleo.	(Sharif-Askari et al. 2010)	Macrófagos (M), monocitos de AML (H) y fibroblastos embrionarios (M).
PI3KAkt_H	-	GSK3B_H	La activación de la vía PI3K/Akt incrementa la fosforilación e inhibición a GSK3β, incrementando la estabilidad de β-catenina.	(Tjin et al. 2006)	Tumores de células B (M) y de linfoma difuso de células B (H).

Nodo A		Nodo B	Observación	Referencia	Modelo
NFκB_H & ! Gfi1_H	->	IL-1β	Gfi1 es inducido ante la activación de TLR-4 con LPS y regula la inducción de blancos de la vía NFκB, entre ellos IL-1β. A través de la clonación y análisis del promotor de IL-1β de la trucha arcoiris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) se observaron sitios de unión para el factor transcripcional NFκB, NF-IL6, AP1, AP4, CHOP/CEBPa, SP1, PU.1 y Gfi1.	(Jones et al. 2001; Sharif-Askari et al. 2010; Tak & Firestein 2001; Wang et al. 2002)	Fibroblastos (Cg), macrófagos (M), <i>in silico</i> (H,M)
PI3KAkt_H	-	IL-1β	PI3K/Akt está involucrado en la regulación de secreción de IL-1β y en la inducción de expresión de IL-1Ra en monocitos.	(Molnarfi et al. 2006; Tapia-Abellán et al. 2014)	Monocitos (H), macrófagos (H).
ROS_H	->	IL-1β	La estimulación <i>in vitro</i> de macrófagos con LPS, incrementa la producción y secreción de IL-1β, dependiente del incremento de ROS y la activación de la enzima convertidora de IL-1β (ICE). En neutrófilos aislados de sangre periférica se reportó que el incremento de ROS es necesario para la secreción de IL-1β.	(Gabelloni et al. 2013; Hsu & Wen 2002)	Neutrófilos (H) y macrófagos (M).
FoxO3a_H	-	NFκB_H	FoxO3a inhibe la traslocación de la subunidad RelA de NFκB_H. En ratones mutados para FoxO3a, cuya expresión fue disminuida debajo de los niveles de detección con anticuerpos, se reportó una hiperproliferación de células linfoides.	(Lin et al. 2004)	Células epiteliales embrionarias de riñón (H), células de linfoma B (M) y T naive (M).
IL-1β & PI3KAkt_H	->	NFκB_H	En células epiteliales se observó que la activación de NFκB por IL-1β, es dependiente tanto de la activación de la proteína cinasa asociada al receptor de interleucina (IRAK) como de PI3K, también activada por una probable interacción directa con el receptor. La activación de NFκB parcialmente dependiente de la vía PI3K también ha sido reportada en linfocitos T.	(Bektas et al. 2014; S. a. G. Reddy et al. 1997)	Linfocitos T (H) y células epiteliales (H).
ROS_H	->	NFκB_H	En distintos tipos celulares se han reportado diferentes mecanismo sensibles a estrés oxidativo, a través de los cuales el incremento en los niveles de ROS es capaz de activar la vía NFκB. Algunos de los mecanismos reportados incluyen la dimerización de NEMO por la formación de puentes disulfuro y la S-glutathionilación de la unidad catalítica IKK-β.	(Finn & Kemp 2012)	Células de LLA Pre-B (H).

Nodo A	Nodo B	Observación	Referencia	Modelo	
TLRs_H	->	NFκB_H	Las vías activadas por el estimulación de TLRs se encuentra bien caracterizada en distintos tipos celulares. A excepción de TLR3, todos los TLRs (TLR1-10) señalizan a través de la vía MyD88 que deriva en la activación y traslocación nuclear del factor transcripcional NFκB. En la fracción primitiva de células hematopoyéticas en la MO también se ha comprobado la expresión de TLRs y su activación por MyD88.	(Nagai et al. 2006)	HSPC (M).
CXCR4_H & CXCR7_H	->	PI3KAkt_H	El bloqueo de cualquiera de los dos receptores para CXCL12, CXCR7 o CXCR4, inhibe la traslocación de β-arrestina al núcleo evitando la activación de la vía PI3K/Akt en células hematopoyéticas CD34+ purificadas de sangre periférica. El bloqueo de ambos receptores no muestra una actividad sinérgica.	(Torossian et al. 2014)	HSPC (H).
FoxO3a_H	-	PI3KAkt_H	FoxO3a está involucrado en un asa de retroalimentación negativa, que regula la fosforilación de PI3KAkt. En ratones deficientes de FoxO3a, se observa una hiperactivación de las vías PI3Ky ERK.	(Miyamoto et al. 2008)	HPC (M).
G-CSF	->	PI3KAkt_H	La estimulación de HPC con G-CSF incrementa la fosforilación de Akt en la Ser-473, requerida para su activación.	(Liu et al. 2007; Vagima et al. 2009)	HPC (M) y HSPC (H).
ROS_H	->	PI3KAkt_H	El principal regulador de PI3K, homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN), es inhibido por oxidación en condiciones de incremento de ROS.	(Leslie et al. 2003; Silva et al. 2008)	Fibroblastos (M), células de glioblastoma (H), macrófagos (M) y LLA-T (H).
TLRs_H	->	PI3KAkt_H	Experimentos en distintos tipos celulares han confirmado la activación de PI3K/Akt posterior a la estimulación de TLRs, principalmente de TLR4 por LPS. En células hematopoyéticas la mayor parte de experimentos confirmando el mantenimiento de esta interacción han sido realizados en monocitos, macrófagos y células dendríticas. La estimulación de TLR deriva en la fosforilación de Akt en la posición Thr308 y Ser473 a través de un mecanismo mediado por p38α y MK2/3.	(Guha & Mackman 2002; McGuire et al. 2013)	Monocitos (H), macrófagos (M).
VLA-4	->	PI3KAkt_H	La asociación de los ligandos de integrinas β1, regula positivamente la activación de PI3K mediada por la interacción directa con la cinasa de adhesión focal (FAK) o Pyk2, dependiendo del tipo celular.	(Melikova et al. 2004)	HSPC (H) y células AML (H).

Nodo A		Nodo B	Observación	Referencia	Modelo
FoxO3a_H	-	ROS_H	FoxO3a regula los niveles de ROS en HSC induciendo la expresión de las enzimas antioxidantes súper oxido dismutasa 1 y 2 (SOD1, SOD2), catalasa y glutatión peroxidasa 1(GPX-1). La inducción de SOD2 es mediada por la inducción de la proteína de la ataxia telangiectasia mutado (ATM).	(Yalcin et al. 2008)	HSC (M).
IL-1 β	->	ROS_H	La estimulación celular con IL-1 β incrementa los niveles de ROS intracelular. El mecanismo de generación de ROS es dependiente del tipo celular. Para células hematopoyéticas se ha observado que el mecanismo involucrado en neutrófilos y macrófagos es dependiente de la activación de NADPH oxidasa, mientras que en linfocitos es 5-lipoxigenasa-dependiente.	(Bonizzi et al. 1999; Yagisawa et al. 1995)	Líneas celulares linfoides (H) y neutrófilos (H).
TLRs_H	->	ROS_H	La estimulación celular con LPS incrementa los niveles de ROS. Se ha sugerido que éste incremento es mediado por NADPH oxidasa.	(Hsu & Wen 2002)	Macrófagos (M) y muestras de sangre total (M).
CXCR4	->	VLA-4_H	CXCL12 regula positivamente la afinidad y avidéz de VLA-4 por sus ligandos.	(Hidalgo et al. 2001; Peled et al. 2000; Sanz-Rodríguez et al. 2001)	Línea celular de mieloma (H), leucemia megacariocítica (H) y HSPC de muestras de MO (H).
VCAM-1_M	->	VLA-4_H	La integrina VLA-4 es receptor para VCAM-1 y fibronectina.	(Hidalgo et al. 2001; Peled et al. 2000; Sanz-Rodríguez et al. 2001)	Línea celular de mieloma (H), leucemia megacariocítica (H) y HSPC de muestras de MO (H).

Tabla 2. Interacciones de las principales vías de señalización que participan en la expresión de VCAM-1 y CXCL12 por MSC.

Nodo A		Nodo B	Observación	Referencia	Modelo de estudio
FoxO3a_M	-	β -catenina_M	La acumulación de factores FOXO compite por la unión con β -catenina disminuyendo su asociación con los factores transcripcionales TCF/Lef, e inhibiendo la transcripción de los genes blanco de la vía canónica de Wnt.	(Almeida et al. 2007; Iyer et al. 2013; Iyer et al. 2014)	Osteoblastos y células precursoras de osteoblastos (M).
GSK3B_M	-	β -catenina_M	GSK3 β fosforila β -catenina, señal para su posterior ubiquitilación y degradación proteosomal.	(Biver et al. 2014; Malhotra & Paul W Kincade 2009; Zhou 2011; Zhu et al. 2014)	MSC (M, H).
NF κ B_M	-	β -catenina_M	La activación de IKK-NF κ B promueve la ubiquitinación y degradación de β -catenina a través del incremento de la transcripción de Smurf1 y Smurf2 ('Smad ubiquitin regulatory factor').	(Chang et al. 2013)	MSC (H, M, R)
Cx43	->	CXCL12	La secreción de CXCL12 por MSC, es dependiente del contacto célula-célula mediada por canales de Cx43. El contacto intercelular regula positivamente la translocación nuclear del factor Sp1, promotor de la transcripción y secreción de <i>Cxcl12</i> .	(Cancelas et al. 2000; Schajnovitz et al. 2011)	MSC (H, M)
β -catenina_M	-	CXCL12	β -catenina interactúa con la región promotora del gen de CXCL12 inhibiendo su transcripción.	(Tamura et al. 2011)	Línea celular estromal (M)
G-CSF	-	CXCL12	G-CSF inhibe la expresión del mRNA de CXCL12 e incrementa la secreción de MMP9 promoviendo la degradación de CXCL12.	(Day et al. 2015; Lévesque et al. 2003; Semerad et al. 2005; Christopher et al. 2009)	Osteoblastos (M), MSC (M).
NF κ B_M	-	CXCL12	La vía canónica de NF κ B inhibe a su contraparte no canónica, promotora de la expresión de CXCL12 e induce miR-146p-5a, inhibidor de <i>Cxcl12</i> .	(Lee et al. 2013; Madge & May 2010)	MSC (H), endoteliales (H).
G-CSF	->	ERK_M	La unión de G-CSF a su receptor estimula la activación de la vía PI3K/Akt, derivando en conjunto con ERK1/2 y NF κ B en la producción de metaloproteinasas.	(Furmento et al. 2014; Ponte et al. 2012)	Células de trofoblasto (H), MSC (H).
ROS_M	->	ERK_M	El tratamiento <i>in vitro</i> de osteoblastos con H2O2, promueve la fosforilación/activación de ERK1/2 (p-ERK).	(Bai et al. 2004)	Osteoblastos y MSC (O).
TLRs_M	->	ERK_M	La estimulación <i>in vitro</i> de MSC con LPS incrementa en un 40% la concentración de p-ERK.	(Crisostomo & Wang 2008)	MSC (H)

Nodo A		Nodo B	Observación	Referencia	Modelo de estudio
β -catenina_M	->	FoxO3a_M	β -catenina interacciona directamente con la región promotora de los factores FoxO1, Foxo3a y FoxO4 incrementando su transcripción independiente de la presencia o ausencia de ROS.	(Almeida et al. 2007; Hoogeboom et al. 2008; Iyer et al. 2014; Essers et al. 2005)	Células de adenocarcinoma (H), embrionarias de riñón (M), linfoma B (H), pre-osteoblastos (R) y <i>C. elegans</i> .
ERK_M	-	FoxO3a_M	ERK fosforila a FoxO3a en Ser 294, Ser 344 y Ser 425, señales promotoras para su degradación vía MDM2.	(Meng et al. 2010; Yang et al. 2008)	Células de cáncer de pulmón (H), de hepatoma (H) y fibroblastos embrionarios (M),
PI3KAkt_M	-	FoxO3a_M	Akt fosforila a FoxO3a en Thr32, Ser253 y Ser315, promoviendo su traslocación del núcleo hacia el citoplasma y disminuyendo la expresión de sus genes blanco.	(Brunet et al. 1999; Meng et al. 2010; Shankar et al. 2013)	Células epiteliales de riñón (H), fibroblastos de pulmón (Cg), cáncer de pulmón y pancreático (H).
ROS_M	->	FoxO3a_M	El incremento de la concentración de ROS promueve la traslocación nuclear de factores FOXO, incluyendo FoxO3a, promotor de enzimas reguladoras de ROS, ej: catalasa.	(Almeida et al. 2007; Essers et al. 2005; Gorbunov et al. 2013)	Precusores de osteoblastos (M), <i>C. elegans</i> , MSC (M)
IL-1 β	->	G-CSF	MSC tratadas con IL-1 β incrementan la expresión de G-CSF <i>in vitro</i> .	(Majumdar et al. 2000; Allakhverdi et al. 2013)	MSC (H)
PI3KAkt_M	-	GSK3B_M	La activación de Akt inactiva a GSK3 β por fosforilación.	(Biver et al. 2014; Case et al. 2011)	MSC (H), MSC (M).
NF κ B_M	->	IL-1 β	NF κ B promueve la transcripción de pro-IL-1 β , mediante su unión a la región promotora del gen.	(Higashikuni et al. 2013; Wang et al. 2002)	Cardiomiocitos (R) y análisis <i>in silico</i> (H,M).
PI3KAkt_M	-	IL-1 β	La vía PI3K/Akt promueve la producción de moléculas antagonistas del receptor de IL-1 (IL-1Ra). El tratamiento con inhibidores de PI3K está asociado al incremento de IL-1 β en circulación de ratones con sepsis.	(Li & Smith 2014; Williams et al. 2004)	Fibroцитos (H), modelo de sepsis (M).
ROS_M	->	IL-1 β	El incremento de ROS en MSC promueve la maduración de pro- IL-1 β a IL-1 β mediada por caspasas, e incrementa su secreción.	(Yang et al. 2010)	MSC (R)

Nodo A		Nodo B	Observación	Referencia	Modelo de estudio
ROS_M & ERK_M	->	NFκB_M	ERK favorece la fosforilación de IκBα para la activación de NFκB por H2O2.	(Bai et al. 2004)	MSC (O)
IL-1β & PI3KAkt_M	->	NFκB_M	La activación del receptor de IL-1β (IL-1R) promueve la fosforilación de NFκB, su activación es dependiente de la vía PI3K, activada por la interacción de la sub-unidad p85 con IL-1R.	(Carrero et al. 2012; Shrikanth a. G. Reddy et al. 1997; Sizemore et al. 1999)	MSC (H), líneas celulares epiteliales (H).
TLRs_M	->	NFκB_M	La activación de TLR4 lleva a la translocación y actividad en el núcleo de NFκB.	(Crisostomo & Wang 2008; Wang et al. 2009)	MSC (H)
FoxO3a_M	-	ROS_M	FoxO3a induce la expresión de enzimas superóxido dismutasa (SOD) y catalasa, reguladoras de ROS.	(Almeida et al. 2007; Liu et al. 2005)	Línea celular epitelial (H), precursores de osteoblastos (M).
IL-1β	->	ROS_M	El tratamiento de MSC con IL-1β incrementa la concentración de ROS.	(Liu et al. 2013)	MSC (M)
TLRs_M	->	ROS_M	La estimulación de MSC con LPS promueve la generación de ROS.	(Gorbunov et al. 2013)	MSC (M)
G-CSF	->	PI3KAkt_M	La unión de G-CSF a su receptor estimula la activación de la vía PI3K/Akt, que en colaboración con ERK y NFκB, estimula la producción de MMP2.	(Furmento et al. 2014; Ponte et al. 2012)	Línea celular de trofoblasto (H), MSC (H).
ROS_M	->	PI3KAkt_M	En presencia de ROS, PI3K es activada a través de la inhibición reversible de PTEN.	(Buldak et al. 2013; Lee et al. 2002)	Líneas celulares epiteliales (H)
TLRs_M	->	PI3KAkt_M	La estimulación con LPS incrementa la fosforilación de Akt en Ser473.	(Wang et al. 2009)	MSC (M)
β-catenina_M	-	VCAM-1	La expresión de VCAM-1 es regulada negativamente por la activación de la vía canónica de Wnt en MSC. La disminución de VCAM-1 por β-catenina es revertida por la inducción con LPS.	(Malhotra & Paul W. Kincade 2009)	MSC (M)
NFκB_M	->	VCAM-1	La activación de la vía NFκB incrementa la expresión de VCAM-1 a través de la unión del factor transcripcional a motivos específicos en la región promotora del gen de VCAM-1.	(Bayat et al. 2008; Hu et al. 2013; Malhotra & Paul W. Kincade 2009)	HUVEC, MSC (M, R)
PI3KAkt_M	->	VCAM-1	PI3K/Akt, en colaboración con p38 MAPK y NFκB, está involucrada en el incremento de expresión de VCAM-1 en MSC.	(Hu et al. 2013)	MSC (R)

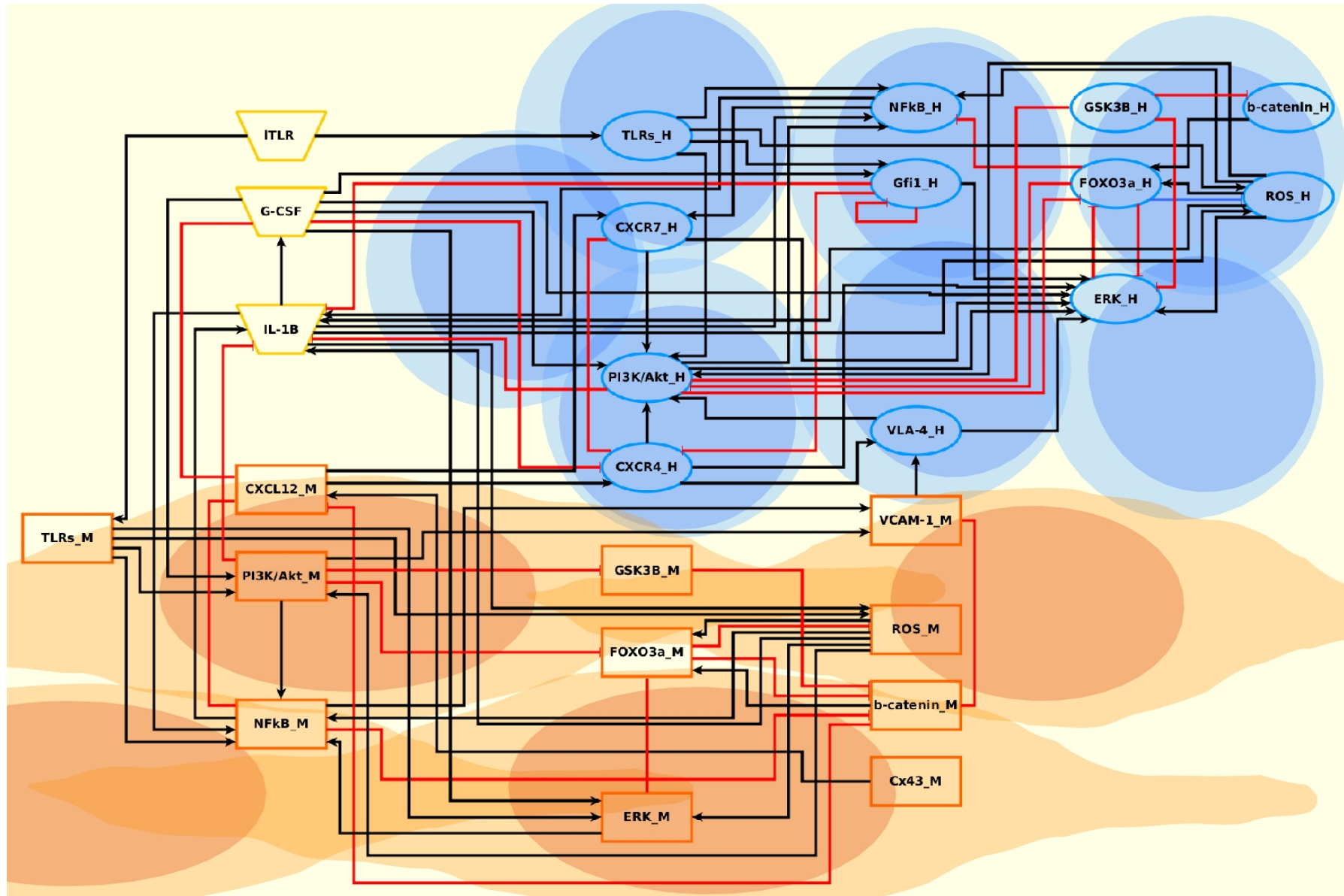


Figura 5. Red de señalización HSPC-MSC. Red de señalización con los nodos intracelulares de MSC (Nodo_M,) y HSPC (Nodo_H,) involucrados en la comunicación intercelular entre ambos tipos celulares, a través de citocinas solubles (IL-1 β y G-CSF,) y de los ejes CXCR4/CXCL12 y VLA-4/VCAM-1. En un nodo se encuentra representado un ligando de TLR (ITLR,) para la simulación de una perturbación temporal dada por una señal pro-inflamatoria. La red está conformada por 26 nodos y 80 ejes representando las interacciones entre ellos (Regulación positiva \rightarrow , regulación negativa \rightarrow).

Tabla 3. Reglas lógicas generadas para el modelo HSPC-MSC.

Nodo	Regla lógica
ITLR	ITLR
Cx43_M	Cx43_M
Bcatenin_M	!(FoxO3a_M GSK3B_M Nfkb_M)
CXCL12_M	Cx43_M & !(Bcatenin_M GCSF Nfkb_M)
ERK_M	GCSF ROS_M TLRs_M
FoxO3a_M	(Bcatenin_M ROS_M) & !(ERK_M PI3KAkt_M)
GSK3B_M	!PI3KAkt_M
Nfkb_M	(IL1B & PI3KAkt_M) (ROS_M & ERK_M) TLRs_M
ROS_M	IL1B & TLRs_M & !(FoxO3a_M)
PI3KAkt_M	GCSF ROS_M TLRs_M
TLRs_M	ITLR
VCAM1_M	!Bcatenin_M Nfkb_M PI3KAkt_M
Bcatenin_H	!GSK3B_H
CXCR4_H	CXCL12_M & !(CXCR7_H GCSF Gfi1_H)
CXCR7_H	CXCL12_M & Nfkb_H
ERK_H	((CXCR4_H & PI3KAkt_H) CXCR7_H GCSF Gfi1_H ROS_H VLA4_H) & !(FoxO3a_H GSK3B_H)
FoxO3a_H	(Bcatenin_H ROS_H) & !(ERK_H PI3KAkt_H)
Gfi1_H	(GCSF TLRs_H) & !Gfi1_H
GSK3B_H	!PI3KAkt_H
Nfkb_H	(TLRs_H ROS_H (IL1B & PI3KAkt_H)) & !(FoxO3a_H)
PI3KAkt_H	((CXCR4_H & CXCR7_H) GCSF ROS_H TLRs_H VLA4_H) & !FoxO3a_H
ROS_H	!FoxO3a_H & IL1B & TLRs_H
VLA4_H	VCAM1_M & CXCR4_H
TLRs_H	ITLR
IL1B	((ROS_M Nfkb_M) & !PI3KAkt_M) ((ROS_H Nfkb_H) & !PI3KAkt_H)
GCSF	IL1B

VI.2 Obtención de atractores y comparación con los patrones de expresión reportados en la literatura para el tipo silvestre, en presencia y ausencia de Cx43.

Cx43 y ITLR son nodos input de la red y su regla lógica es de auto-regulación positiva. La mitad de los 67,108,864 estados iniciales posibles de la red ($2^{\# \text{ nodos}}$) mantendrán el valor de Cx43 y/o ITLR igual a 1 a lo largo de los estados de transición hasta llegar a un atractor, y la otra mitad con un valor de 0. Teniendo por lo tanto, 4 estados iniciales de nodos input para las simulaciones: Cx43=0/ITLR=0, Cx43=1/ITLR=0, Cx43=0/ITLR=1, y Cx43=1/ITLR=1. Cuando Cx43 = 1, representa que las MSC se encuentran en contacto a través de uniones gap funcionales compuestas por Cx43 y por lo tanto, con la capacidad de favorecer la secreción de CXCL12 (Schajnovitz et al. 2011). Por otro lado, ITLR = 1 implica la presencia de algún ligando de TLR, como LPS favoreciendo una respuesta pro-inflamatoria.

A partir de la simulación de la red de HSPC-MSC empleando un esquema de actualización síncrono y asíncrono, se obtuvieron dos atractores de punto fijo en ausencia de ITLR conservados en ambos esquemas de actualización. En el esquema de actualización síncrono se obtuvieron dos atractores cíclicos en ausencia de ITLR, los cuales no son considerados para los análisis debido a que no se conservan en el esquema asíncrono indicando que son resultado de la actualización simultánea de dos o más nodos con reglas lógicas que generan un circuito que se enciende y apaga intermitentemente. Con ITLR = 1, se obtienen atractores cíclicos en la actualización síncrona y dos atractores complejos con el esquema asíncrono. En la Tabla 4 se muestran los atractores obtenidos con el esquema asíncrono para todas las condiciones iniciales posibles de los nodos input. El atractor al que llegan los estados iniciales con el nodo de Cx43 apagado, no tienen encendido CXCL12 y como consecuencia, CXCR4 tampoco. A pesar de la expresión de VCAM-1 por MSC, VLA-4 en la célula hematopoyética no es activado debido a la ausencia de CXCR4, de acuerdo con la importancia de la interacción entre los ejes CXCR4/CXCL12 y VLA-4/VCAM-1 reportada para la retención de células hematopoyéticas en la MO (Sanz-Rodríguez et al. 2001; Hidalgo et al. 2001; Peled et al. 2000).

Debido a que la función *getAttractors()* de BoolNet únicamente arroja el valor de cuencas/porcentaje de atracción para simulaciones realizadas con un esquema de actualización síncrono, fue programada la función *asynchAtt()* en el lenguaje R (Anexo 4). Ésta función toma

como input la información de los atractores asíncronos, el número de estados iniciales al azar que serán consideradas para calcular la cuenca y el número de atractores de punto fijo. Se obtuvieron las cuencas de atracción para cada uno de los atractores de punto fijo y para ambos atractores complejos, partiendo de 500,000 estados iniciales al azar (Tabla 5). La función *asynchAtt()* no determina la cuenca de atracción para los atractores complejos. El valor reportado en la Tabla 5 es el restante entre las cuencas de los atractores de punto fijo y los 500,000 estados iniciales de la simulación.

Tabla 4. Atractores obtenidos de la simulación asíncrona de la red HSPC-MSC.

	Input	MSC											HSPC											ITLR	Citocinas		
	Cx43	Bcatenin_H	CXCL12	ERK_M	FoxO3a_M	GSK3B_M	NFKB_M	ROS_M	PEKAK_M	TLRs_M	VCAMI	Bcatenin_H	CXCR4	CXCR7	ERK_H	FoxO3a_H	Gfi1_H	GSK3B_H	NFKB_H	PEKAK_H	ROS_H	TLRs_H	VLA4		IL1B	GCSF	
Att_PF1																											
Att_PF2																											
Att_Cplx1																											
Att_Cplx2																											

Los recuadros en naranja, azul y amarillo intenso representan que el nodo se encuentra encendido o que su valor es igual a 1. Los recuadros en naranja, azul y amarillo claro representan que el nodo se encuentra apagado o su valor es igual a 0. Los recuadros azul intermedio en los nodos ERK_H y Gfi1_H para los atractores Att_Cplx1 y Att_Cplx2, cuyo valor puede ser 0 o 1, son los nodos responsables de que el atractor sea complejo y compuesto por más de un estado. Att_PF1 corresponde al atractor de punto fijo al cual se llega iniciando en ausencia de Cx43 y ITLR. Att_PF2 corresponde al atractor de punto fijo al cual se llega iniciando con Cx43 encendido y ITLR apagado. Att_Cplx1 y Att_Cplx2 corresponde a los atractores complejos a los cuales se llega partiendo de estados iniciales en presencia de ITLR y Cx43 apagado y encendido, respectivamente.

Tabla 5. Cuenca de atracción de los atractores de punto fijo y de los atractores complejos obtenida con base en una simulación partiendo de 500,000 estados iniciales a la red.

Atractor	Cuenca de atracción	Porcentaje
Att_PF1	125048	25.01
Att_PF2	124986	25.00
Att_Cplx1/Att_Cmplx2	249966	49.99

A partir del valor de la cuenca para los atractores y el total de estados iniciales empleados para la estimación, se determinó el porcentaje de probabilidad de llegar a cada uno de los dos atractores de punto fijo o a algún atractor complejo.

En el atractor Att_PF1 el estado de los ejes de interacción HSPC-MSC, CXCR4/CXCL12 y VLA-4/VCAM-1, se encuentran ausentes. Este atractor representa las condiciones de ausencia de estímulo y señalización entre HSPC, provisto tanto por MSC como por estímulos

microambientales externos. Los únicos nodos encendidos en Att_PF1 corresponden a la glucógeno cinasa sintasa-3 en ambos subsistemas, GSK3 β _H y GSK3 β _M, la cual tiene expresión constitutiva, únicamente regulada negativamente por PI3K y actúa como represora de β -catenina. Att_PF2 corresponde al atractor de establecimiento de comunicación entre HSPC y MSC. La vía PI3K/Akt promotora de proliferación y supervivencia celular en HSPC se encuentra activada por CXCR4 y VLA-4, al igual que la vía ERK. Como consecuencia de la activación de PI3K/Akt, se estabiliza β -catenina mediada por la inhibición de GSK3 β en HSPC.

Los nodos activos en ambos atractores son congruentes con lo observado experimentalmente y representan el estado de mantenimiento de la HSPC en contacto con su nicho represor representado por la interacción con la MSC a través de VLA-4/VCAM-1 y respondiendo a la señal quimiotáctica de CXCL12. Estas señales mantienen a la HSPC en su nicho, además de que experimentalmente se ha sugerido que tienen una función represora sobre la proliferación celular, aunque en Att_PF2 las vías de señalización activadas sugieren lo contrario. Por otro lado, el atractor en ausencia de Cx43, representa un estado en el cual la HSPC se encuentra libre para migrar en respuesta a otro gradiente quimiotáctico.

Para evaluar la estabilidad de los atractores de punto fijo, se programó la función *analyzeStability()* (Anexo 4). Ésta función toma uno por uno los atractores y modifica el valor de activación de cada uno de los nodos en simulaciones independientes y, empleando la función *getPathToAttractor()* de BoolNet, determina si la perturbación provoca un cambio de atractor o vuelve al atractor inicial. Debido a que la función *getPathToAttractor()* únicamente puede emplear un esquema de actualización síncrono, ciertas perturbaciones pueden llevar a atractores cíclicos. El número de perturbaciones o nodos a los cuales se les modifica el valor de activación puede ser de 1 o 2. Los resultados obtenidos de esta evaluación indican que Att_PF1 tiene una estabilidad del 0.92 ante perturbaciones simples (modificación de un solo nodo), es decir que de las 26 perturbaciones posibles únicamente 2 llevaron a un nuevo atractor. El cambio del valor de activación de Cx43 (0 \rightarrow 1) llevó a Att_PF2 y la modificación de ROS_H (0 \rightarrow 1) llevó a un atractor cíclico. El valor de estabilidad para Att_PF2 también es de 0.92 y las perturbaciones que modifican el atractor corresponden de igual manera a Cx43 (1 \rightarrow 0) que deriva en Att_PF1 y ROS_H (0 \rightarrow 1) que lleva a un atractor cíclico. En el análisis de estabilidad de atractores realizando dos perturbaciones simultáneas, el valor de estabilidad para Att_PF1 y Att_PF2 fue de

0.83 y 0.85, respectivamente. Los nodos que generaron un cambio de atractor fueron Cx43 ($0 \rightarrow 1$ y $1 \rightarrow 0$), ROS_H ($0 \rightarrow 1$) y diversas combinaciones de nodos que derivan en un atractor cíclico.

VI.3 Análisis del modelo en presencia de una señal pro-inflamatoria.

Debido a que la presencia de ITLR durante toda la simulación lleva a atractores complejos en el esquema de actualización síncrono y atractores complejos con el esquema de actualización asíncrono, se realizó un análisis alternativo para poder analizar la respuesta y regulación existente entre las vías ante un estímulo temporal de ITLR. Para ello, se realizó un análisis de la transición de estados con un estímulo de ITLR cada 700 time-steps. Para el análisis de transición de estados, se corrieron 50,000 simulaciones por 2,000 time-steps y se graficaron los valores promedio de activación de cada nodo en cada intervalo de tiempo.

Se graficó el valor promedio del estado de activación para cada nodo para los nodos intracelulares de HSPC (Figura 6A), nodos intracelulares de MSC (Figura 6B) y los elementos relacionados con la comunicación intercelular y microambiente (Figura 6C). Aproximadamente hasta el paso de tiempo 500 el valor de activación de los nodos se estabiliza, la inestabilidad en el intervalo previo se debe a la heterogeneidad del valor de activación de los nodos en los 50,000 estados iniciales, y consecuentemente cada estado inicial progresará a través de estados de transición hasta llegar a uno de los dos atractores de punto fijo a los que llega el sistema en ausencia de ITLR. Tomando en cuenta que la mitad de los estados iniciales comenzarán con Cx43=0 y la otra mitad con Cx43=1, los nodos encendidos diferencialmente en HSPC en presencia o ausencia de Cx43 (Bcatenin_H, ERK_H y PI3KAkt_H encendidos cuando Cx43 = 1; GSK3B_H encendido cuando Cx43=0) se estabilizan en un valor de activación promedio de 0.5. En el caso de los nodos en MSC, en ambos atractores de punto fijo en ausencia de ITLR, GSK3B_M se encuentra encendido, lo cual se refleja en la gráfica B de la figura 6, en una estabilización en valor de 1 previa al estímulo con ITLR. Finalmente en la gráfica C, observamos el estado de activación promedio de las vías output de los sub-sistemas HSPC y MSC, observando que CXCR4, VLA-4 y CXCL12 tienen un valor promedio de 0.5 previo a la estimulación con ITLR y, VCAM-1 se estabiliza en un valor de 1.

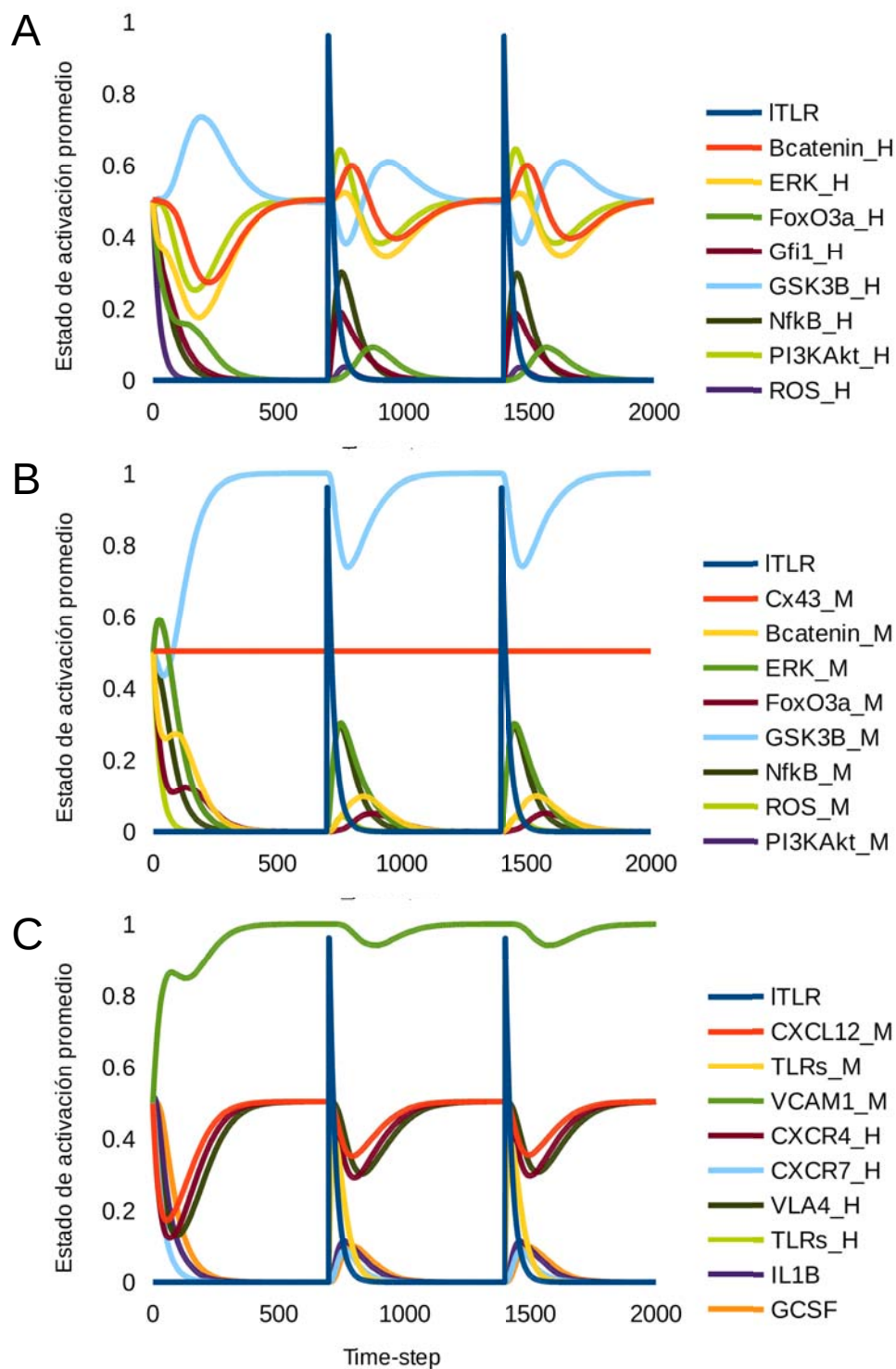


Figura 6. Activación promedio para nodos intracelulares de HSPC (A), MSC (B) y nodos involucrados en la comunicación intercelular y microambiental (C). El promedio de estados de activación fue obtenido de 50,000 simulaciones a partir de estados iniciales al azar en los cuales únicamente se fijó a 0 el valor de ITLR, TLRs_H y TLRs_H.

Posterior a la estimulación con ITLR, se observa en los tres compartimentos (HSPC, MSC y microambiente y comunicación intercelular) un incremento en la activación de nodos de vías de señalización involucradas en respuesta inflamatoria que deriva en la expresión de las citocinas pro-inflamatorias IL1B y G-CSF. La respuesta pro-inflamatoria desencadenada es acompañada por una disminución en la activación de CXCR4, CXCL12, VLA-4 y VCAM-1. Posteriormente, los niveles de expresión se restablecen a un estado de ausencia de citocinas pro-inflamatorias. Es de especial interés la ligera regulación positiva sobre el nodo CXCR7 y el incremento seguido de un decremento abrupto en ERK_H, PI3kAkt_H y Bcatenin_H.

VI.4 Análisis de mutantes

El análisis de mutantes empleando la función *getMutants()*, nos permite buscar posibles panoramas que llevan a la inhibición de las señales de mantenimiento de las HSPC en la MO. Para ello, realizamos la simulación computacional de la red con todas las mutantes posibles, considerando la mutante nula (apagado permanente) y la mutante de ganancia de función (encendido permanente) para cada nodo de la red (26 nodo x 2 = 52 mutantes). La función *getMutants()* crea una tabla con los atractores obtenidos con un esquema de actualización síncrono. En el caso de obtener un atractor cíclico, suma el valor de activación para cada nodo y lo divide entre el número de estados involucrados en el atractor. La función crea un archivo en el cual, en formato binario, proporciona tanto los atractores obtenidos por actualización síncrona como por actualización asíncrona. En el Anexo 2 se muestran las gráficas obtenidas con actualización síncrona cotejadas con los atractores obtenidos en actualización asíncrona. No fue posible obtener los atractores de simulación asíncrona de las redes mutantes con ganancia de función de NFkB_M y NFkB_H, debido a que consistían en atractores complejos. En el Anexo 3 se muestran las gráficas de transición de estados para ambas mutantes (Figura 8 y 9).

En la Tabla 6, se resumen los resultados obtenidos en las simulaciones con mutantes haciendo hincapié en su efecto sobre los ejes CXCR4/CXCL12 y VLA-4/VCAM-1. Para cotejar los resultados obtenidos por el modelo *in silico*, en la tercera columna de la misma tabla, se hace referencia a observaciones experimentales reportadas por otros grupos de investigación empleando modelos de inducción e inhibición de expresión o actividad (ej. modelos mutantes de ratón, inducción exógena de expresión, moléculas inhibidoras, shRNAs, etc.).

Tabla 6. Comparación de los resultados de simulación con mutantes del modelo HSPC-MSK con reportes experimentales. N/C, no hay cambio en los atractores respecto al modelo sin mutaciones.

Nodo	Simulación con pérdida de función	Simulación con ganancia de función	Observaciones experimentales
Bcatenin_M	N/C	Inhibición de CXCL12 y VCAM-1.	Mayoritariamente, el estudio de β -catenina en MSC se ha enfocado en su papel regulador de la osteoblastogénesis (Zhou 2011; Iyer et al. 2014). En modelo de ratón con expresión constitutiva de β -catenina en células osteoblásticas, se reportó la inducción de AML (Kode et al. 2014). La inhibición de VCAM-1 por β -catenina en las simulaciones es restablecido en presencia de ITLR como fue reportado en (Malhotra & Paul W Kincade 2009).
CXCL12_M	No hay activación de CXCR4 ni VLA4.	CXCR4 se encuentra constitutivamente activo en presencia y ausencia de Cx43. En condiciones con ITLR encendido, CXCR7 permanece activo en respuesta a CXCL12 y NfkB_M.	La inhibición selectiva de secreción de CXCL12 por células estromales Osterix+, induce la pérdida de quiescencia de HSPC y el incremento de migración a sitios extramedulares (Greenbaum et al. 2013).
ERK_M	Únicamente es afectado el atractor obtenido en condiciones con ITLR, ERK_M no es activado.	ERK_M constitutivamente activo en todas las condiciones. No hay modificaciones en el resto de los nodos.	Reportes de mutantes que involucren algún efecto sobre su comunicación intercelular con HSPC, no encontrados.
FoxO3a_M	N/C	FoxO3a_M constitutivamente activo en todas las condiciones. No hay modificaciones en el resto de los nodos.	Reportes de mutantes que involucren algún efecto sobre su comunicación intercelular con HSPC, no encontrados.
GSK3B_M	La expresión de Bcatenin_M, Foxo3a_M, VCAM1 y CXCL12 es inestable.	GSK3B_M constitutivamente activo en todas las condiciones. No hay modificaciones en el resto de los nodos.	Al igual que los estudios con mutantes para β -catenina, los experimentos de inhibición de GSK3 β en MSC se han enfocado en su participación en la diferenciación tanto a osteoblastos, como a adipocitos (Cook et al. 2014). Satija y colaboradores, estudiando el efecto del litio (inhibidor de GSK3 β) en la osteoblastogénesis, reportaron una disminución en la expresión de CXCL12 (Satija et al. 2013).

Nodo	Simulación con pérdida de función	Simulación con ganancia de función	Observaciones experimentales
NFκB_M	No hay modificación en otros nodos. El único atractor afectado es en presencia de ITLR, en donde NFκB_M no se enciende como ocurre en la simulación de la red silvestre.	Atractores complejos. Bajo ninguna condición se establece el eje CXCR4/CXCL12, ni VLA-4/VCAM-1.	En un reporte sobre el efecto de una dieta alta en grasas en la expresión de NFκB y PPARγ en MSC de ratas, se observó que el incremento de estos dos factores está acompañado de una probable desregulación en la producción hematopoyética. Los resultados sugieren un incremento en células totales en MO y en SP. Estos datos podrían explicarse con los resultados en las simulaciones con ganancia de función en NF-κB en donde hay una inhibición de los ejes de retención y regulación de HSPC (Cortez et al. 2013).
ROS_M	N/C	No hay activación de CXCR4 ni VLA-4.	Se han estudiado, en modelos de ratón y en pacientes con sobrecarga férrica, las probables alteraciones en MSC que afectan la producción hematopoyética. Asociado al incremento en concentraciones de hierro, hay una disminución en la secreción de CXCL12, SCF y VEGF, y una alteración la capacidad de soporte de células hematopoyéticas (Lu et al. 2013; Zhang et al. 2015). Éstos efectos son parcialmente reversibles al administrar un inhibidor de ROS (Lu et al. 2013). Notablemente, las MSC muestran una capacidad de diferenciación deficiente lo cual podría explicarse por la inhibición de GSK3β_M que se observa en los resultados de la simulación (Zhang et al. 2015).
PI3KAkt_M	En presencia de ITLR se activa ROS_M, GSK3B_M, IL1B y GCSF. Las citocinas pro inflamatorias, en consecuencia activan ROS_H, PI3kAkt_H y estabilizan ERK_H	Activa Bcatenin_M, no se activa CXCL12 y se apaga GSK3B_M.	A pesar de que no se encontraron reportes de MSC mutantes en PI3K/Akt y su efecto sobre la regulación de las células HSPC, los resultados de las simulaciones en presencia de ITLR son consistentes con experimentos que demuestran el papel regulador de la vía (Williams et al. 2004; Xu et al. 2012). En ausencia de PI3K/Akt hay una activación sostenida de nodos pro-inflamatorios que en ausencia de la mutante se activan e inhiben consecutivamente (Figura 6B).
TLRs_M	CXCL12 permanece encendido en presencia de ITLR activando a CXCR7 en HPSC.	No hay activación de CXCL12.	Los resultados de las simulaciones con mutantes de TLR_M son consistentes con los reportes sobre la disminución de CXCL12 en la MO como consecuencia de la activación de NF-κB (Hayden & Ghosh 2014; Ueda et al. 2004). La inhibición de CXCL12, disminuye la adhesión de HSPC al estroma permitiendo su probable migración a nichos de expansión y diferenciación. Por otro lado, si existe una señal constitutiva de CXCL12 (que podría provenir de un sitio de daño extramedular) y la señal pro-inflamatoria inhibe a CXCR4, la quimiocina señaliza alternativamente por CXCR7, cuyas funciones aún no son muy claras. Sin embargo, CXCR7 en algunos modelos ha demostrado ser promotor de migración (Dang et al. 2013; Hartmann et al. 2008).

Nodo	Simulación con pérdida de función	Simulación con ganancia de función	Observaciones experimentales
VCAM1_M	CXCR4/CXCL12 no es suficiente para activar ERK_H y PI3KAkt_H.	N/C	La inhibición de la FAK, promueve la expansión de HSC (Lua et al. 2012). El resultado de la simulación de pérdida de función de VCAM-1 muestra una inhibición en la vía PI3K/Akt y ERK en HSPC, ambas involucradas en proliferación y supervivencia. Lua y colaboradores, mencionan que la señalización VLA-4/VCAM-1 es bidireccional, mientras que en el modelo propuesto únicamente se considera la señalización desencadenada por VLA-4.
Bcatenin_H	N/C	Se llega a un atractor fijo adicional en presencia de Cx43 y dos adicionales en presencia de ITLR, en los cuales se encienden FoxO3a_H y GSK3B_H, e inhiben ERK_H y PI3K_H.	En ratones con mutante inducida para β y γ -catenina, las HSC no pierden capacidad de reconstitución a largo plazo ni pérdida de multipotencialidad (Cobas et al. 2004; Jeannet et al. 2008). Por el contrario, la inducción y estabilización de β -catenina produce pérdida de troncalidad, bloqueo en la diferenciación eritroide y linfoide y, pérdida de progenitores mieloides y granulo-monocíticos (Kirstetter et al. 2006; Scheller et al. 2006). Según las simulaciones con mutantes, β -catenina podría estar induciendo a proliferación con una consecuente pérdida de troncalidad por el número de incursiones de HSC en el ciclo celular. Sin embargo, GSK3 β estaría indicando una probable inducción de las células a apoptosis (Maurer et al. 2006).
CXCR4_H	No haya activación de VLA-4 a pesar de la presencia de su ligando VCAM-1 y sólo se encuentra activo el nodo GSK3B en HSPC.	Se estabiliza ERK_H en presencia de ITLR.	La inhibición de CXCR4 en células de mieloma múltiple y células de LLA pre-B, inhiben la capacidad de adhesión dependiente de VLA-4 (Sanz-Rodríguez et al. 2001; Spiegel et al. 2004). En concordancia con las simulaciones, sin embargo en un modelo celular distinto, la inhibición de la expresión de CXCR4 en células de cáncer de páncreas inhibe la expresión de genes blanco de Wnt y la proliferación celular (Wang et al. 2008).
CXCR7_H	N/C	Sin CXCR4 en presencia de CXCL12 solo se queda activo GSK3B_H. Se estabiliza ERK en presencia de ITLR	Mediante experimentos realizados con modelos de ratón <i>Cxcr7</i> ^{-/-} , se reportó que el receptor alternativo para CXCL12 no es esencial para la hematopoyesis (Sierro et al. 2007). Por otro lado, aún se encuentra en discusión su probable papel como el responsable de la activación de PI3K/Akt en respuesta a CXCL12 (Kumar et al. 2012), co-actividad con CXCR4 (Melo et al. 2014; Torossian et al. 2014) o únicamente como regulador de la interacción CXCR4/CXCL12 como se ha reportado para otros tipos celulares (Uto-Konomi et al. 2013).

Nodo	Simulación con pérdida de función	Simulación con ganancia de función	Observaciones experimentales
ERK_H	Ya no se enciende ERK_H con CXCR4 ni con ITLR	ERK encendido	La alteración de la vía de Ras/MEK/ERK se ha reportado en LLA. Ésta vía influye en la proliferación, diferenciación, migración y supervivencia de los blastos leucémicos. Sin embargo, para poder comparar los resultados de experimentos de mutantes en esta vía, son necesarios nodos característicos para la identificación del destino celular (Knight & Irving 2014).
FoxO3a_H	N/C	No se enciende ERK, PI3K_H ni Bcatenin_H, a pesar de la activación de CXCR4. Tampoco en presencia de ITLR.	FoxO3a es uno de los principales factores promotores de estado quiescente de las células HSC (Tothova & Gilliland 2007; Yamazaki et al. 2006; Lei & Quelle 2009), lo cual sería consistente con la simulación de ganancia de función y la inhibición de las vías ERK_H, PI3KAkt_H y Bcatenin_H. Sin embargo, la traslocación y mantenimiento de FoxO3a en el núcleo como vía represora, contradice los estados de activación de los nodos en los atractores obtenidos a partir de la red silvestre, en donde esperaríamos encontrar algún estado con activación de FoxO3a simulando el estado quiescente.
Gfi1_H	Se estabilizan los atractores de ITLR y no se enciende ERK en presencia de ITLR	No se activan los nodos Bcatenin_H, ERK_H ni PI3KAkt_H a pesar de la activación de los ejes CXCR4/CXCL12 y VLA-4/VCAM-1.	En los ratones con HSPC <i>Gfi</i> ^{-/-} se observa un incremento inicial en el número de HSPC, consecuencia de hiperproliferación que deriva en un agotamiento de la población en MO (Hock et al. 2004; Zeng et al. 2004). Gfi1 regula la proliferación y auto-renovación restringiendo la entrada a ciclo celular de HSPC. Zeng y colaboradores reportan una disminución en la expresión de p21. En la simulación de ganancia de función de Gfi1 hay una inhibición de las vías de inducción proliferativa, lo cual respalda la actividad reguladora de Gfi1. Consistentemente, PI3K es un inhibidor de p21, proponiendo una probable explicación a la disminución de p21 en ausencia de Gfi1 en el modelo experimental.
GSK3B_H	Dos atractores de punto fijo con FoxO3a_H encendido, uno con Cx43 encendido y otro en ausencia de Cx43. En el primero, no se activa PI3K_H ni ERK_H a pesar de que CXCR4 se encuentra encendido. Dos atractores adicionales con ITLR, en donde FoxO3a también inhibe el encendido de ERK_H y PI3KAkt_H.	No se activan ERK_H ni Bcatenin_H en presencia de CXCR4, ni ITLR.	La inhibición de GSK3β en HSPC enriquecidas de sangre de cordón umbilical incrementa su expansión (Holmes et al. 2008). En el mismo artículo, Holmes y colaboradores reportan que la inhibición de GSK3β en líneas celulares de AML disminuye su capacidad expansiva. Los resultados de la red con pérdida de función de GSK3β mantiene el atractor de la red silvestre que equivale a HSPC con capacidad de auto-renovación y expansión, sin embargo los atractores adicionales con FoxO3a no son explicables con los reportes experimentales. Con la mutante de ganancia de función la inhibición de Bcatenin_H representa la pérdida de capacidad auto-renovativa.

Nodo	Simulación con pérdida de función	Simulación con ganancia de función	Observaciones experimentales
NfκB_H	No se activan IL-1B ni GCSF en presencia de ITLR.	Atractores complejos sin activación de ejes CXCR4/CXCL12 ni VLA-4/VCAM-1.	A pesar de que no se ha reportado una inducción directa de CXCR4 por NF-κB, numerosos reportes en diferentes tipos de cáncer coinciden en la correlación entre el incremento en la expresión y activación de NF-κB y la expresión de CXCR4, con una posible participación en metástasis (Ayala et al. 2009; Richmond 2002; Shin et al. 2014). Lo cual contradice los resultados obtenidos por la simulación de ganancia de función. Sin embargo, CXCR4 podría ser regulado positivamente por un mecanismo independiente a NF-κB e incluso la activación de la vía NF-κB podría deberse en parte a la respuesta a quimiocinas (Richmond 2002).
PI3KAkt_H	No se activa ERK_H en presencia de CXCR4 ni ITLR. Se inestabiliza FoxO3a_H, ROS_H, IL1B, NfκB_H y G-CSF en presencia de ITLR.	Igual pero con PI3K_H, sin GSK3B_H y con Bcatenin_H en ausencia de estímulos. No hay activación de GSK3B_H y Bcatenin_H permanece activa en ausencia de Cx43 y ITLR.	La inhibición de la vía PI3K/Akt induce el desprendimiento de células hematopoyéticas en la médula ósea por la inhibición del eje VLA-4/VCAM-1 (Katsumi et al. 2011), refutando los resultados obtenidos por la simulación de pérdida de función en donde se mantiene la activación del eje de integrinas.
ROS_H	N/C	Atractores adicionales con IL-1B, G-CSF, inestabilidad de Gfi1. Ninguno con CXCR4 y solo uno con secreción de CXCL12. Atractores adicionales con activación de IL-1B y GCSF, e inestabilidad de Gfi1. En ningún atractor se encuentra activado el nodo CXCR4 y solo en uno se encuentra activo CXCL12.	El trabajo publicado por Yalcin y colaboradores sugiere que el incremento de ROS causado por la inhibición de FoxO3a en el compartimento de células hematopoyéticas de ratón, inhibe su capacidad de auto-renovación y reconstitución post-transplante (Yalcin et al. 2008). En la simulación de ganancia de función, los atractores con expresión de IL1β, GCSF, FoxO3a, e inhibición de β-catenina en HSPC, simulan un fenotipo no proliferativo y no auto-renovativo.
VLA4_H	La activación de CXCR4 no es suficiente para activar PI3K_H, ERK_H y Bcatenin_H.	Los nodos PI3K_H, ERK_H y Bcatenin_H se encuentran activos a pesar de la ausencia de activación de CXCR4.	La pérdida de expresión de FAK en la población de HSC, conduce al incremento en la expansión celular de este compartimento (Lua et al. 2012). En los resultados de pérdida de función las vías de proliferación y auto-renovación no se activan en HSPC. Por otro lado, la simulación de ganancia de función sugiere que VLA-4/VCAM-1 es el responsable de la activación de las vías reportadas río abajo de CXCR4.

Nodo	Simulación con pérdida de función	Simulación con ganancia de función	Observaciones experimentales
TLRs_H	Solo MSC responde a lTLR.	En presencia de CXCL12 se activa el nodo CXCR7. Se activa intermitentemente la expresión de Gfi1.	El atractor obtenido en la simulación de mutante de ganancia de función para el nodo TLRs_H en presencia Cx43, tiene el mismo estado de activación de los nodos en HSPC que el obtenido con la mutante nula de TLRs_M en presencia lTLR y Cx43. Respaldando la hipótesis sobre la interacción de CXCL12 con su receptor alterno en presencia de señales pro-inflamatoria en la MO, y con activación de vías que favorecen la expansión y migración celular (Dang et al. 2013; Hartmann et al. 2008).
IL-1B	N/C	Se activan los nodos GCSF, PI3KAkt_M, ERK_M, ERK_H, NFkB_H, PI3kAkt_H y Bcatenin_H en todas las condiciones. No se enciende CXCR4 ni VLA4. Se enciende ROS_M y ROS_H con lTLR.	La generación de GCSF por células mieloides en la MO como respuesta a un microambiente pro-inflamatorio o a su administración exógena, promueve la movilización de HSPC a sitios extramedulares mediante la inhibición del eje CXCR4/CXCL12, cuya inhibición disminuye la afinidad entre los elementos del eje VLA-4/VCAM-1 (Lévesque et al. 2003; de la Luz Sierra et al. 2010; Ponte et al. 2012; Tesio et al. 2013).
G-CSF	N/C	Gfi1 se activa intermitentemente, se activan los nodos ERK_M, PI3KAkt_H en todas las condiciones y se activa Bcatenin_M en condiciones de Cx43 y sin lTLR. Se inhibe GSK3B_M en todas las condiciones. Inhibición de los ejes CXCR4/CXCL12 y VLA-4/VCAM-1.	

VII. DISCUSIÓN

En la hipótesis del presente proyecto se plantean como ejes fundamentales para la interacción de las HSPC con el nicho regulatorio mesenquimal, a CXCR4/CXCL12 y VLA-4/VCAM-1. La activación de CXCR4 ha sido planteada como condición reguladora de la quiescencia de HSPC, mediante diferentes mecanismos, entre ellos se ha propuesto la inhibición directa de ciclina D y regulación positiva del inhibidor de cinasa dependiente de ciclina p57^{kip2} (Nie et al. 2008). Por otro lado, tanto CXCR4/CXCL12 como VLA-4/VCAM-1 han sido identificados como ejes esenciales para el retención de HSPC en la MO (Greenbaum et al. 2013; Lua et al. 2012; Park et al. 2013; Lévesque et al. 2003). Mediante el modelo propuesto, se esperaba encontrar dos atractores. El primero de ellos, debía simular el contacto de la HSPC con un nicho represor de MSC. El segundo, la ausencia de represión por ausencia de factores inductores de la activación de los ejes fundamentales. Adicional a estos dos atractores básicos, se deseaba simular la inhibición inducida de la interacción HSPC-MSK mediante un estímulo pro-inflamatorio (Vadillo et al. 2013). Conforme a lo esperado, se obtuvieron dos atractores básicos, Att_PF1 y Att_PF2. El atractor Att_PF1, en ausencia de Cx43 carece de la activación de CXCL12 y a pesar de la expresión de VCAM-1, no tiene activo el nodo VLA-4, de acuerdo al requerimiento de activación de CXCR4 para incrementar la afinidad entre VLA-4 y VCAM-1 necesaria para retener a las HSPC en la MO (Hidalgo et al. 2001; Peled et al. 2000; Sanz-Rodríguez et al. 2001). El atractor Att_PF2 activa nodos involucrados en la proliferación, auto-renovación, diferenciación y migración de las HSPC (CXCR4_H, VLA4_H, Bcatenin_H, ERK_H, PI3KAkt_H). Actualmente, el papel de β -catenina permanece en debate y existen numerosos artículos que abordan su importancia en el mantenimiento de la capacidad de auto-renovación, expansión, diferenciación y migración de HSPC. Recientemente, Duinhouwer y colaboradores reportaron la inhibición de la expansión de HSC inducida por factores de crecimiento, tras el cultivo con Wnt3a, proteína inductora de la vía canónica de Wnt (Duinhouwer et al. 2015). Por otro lado, Perry reportó que la pérdida de PTEN, inhibidor de PI3K/Akt, en combinación con la activación de β -catenina, promueve la autorenovación y expansión de HSC (Perry et al. 2011). Finalmente, la sobreactivación de β -catenina conlleva un agotamiento de la población troncal inhibiendo la capacidad de reconstitución del sistema hematopoyético (Kirstetter et al. 2006). En conjunto, estos hallazgos sugieren que si bien, β -catenina es promotor de la auto-renovación, debe estar finamente regulado para mantener la homeostasis y la población troncal para asegurar el

reabastecimiento del tejido sanguíneo. De acuerdo con lo reportado para los receptores acoplados a proteína-G, existe una respuesta de activación de la vía PI3K/Akt y ERK. La activación de estos dos nodos mediada por el nicho mesenquimal, es compatible con el mantenimiento de las HSPC debido a su papel como inductores de supervivencia. Sin embargo ambos nodos también tienen una participación en la inducción de proliferación, actividad que se contrapone con lo planteado durante la construcción del modelo. El nodo inductor de arresto celular, FoxO3a en HSPC, es regulado positivamente por β -catenina pero inhibido por PI3K/Akt. La inhibición directa de CXCR4 de factores involucrados en el ciclo celular y/ la interacción de otros factores microambientales podrían estar regulando la actividad proliferativa de HSPC, independientemente de PI3K/Akt y ERK.

La construcción de las gráficas del estado de activación promedio de los nodos a través de los estados de transición, permitió analizar la dinámica de los elementos en respuesta a un estímulo temporal. Los atractores complejos obtenidos por la simulación con ITLR no muestran la transición del estado de homeostasis a un estado de respuesta pro-inflamatoria regulada. Mediante el análisis de estados de transición se observó la regulación esperada al estímulo temporal con ITLR, una respuesta de incremento de expresión de citocinas pro-inflamatorias regulada por PI3K/Akt, incremento de ROS regulado por FoxO3a, activación de NF- κ B y su posterior inactivación por desaparición del estímulo, y disminución de expresión de CXCL12. La disminución de los ejes de retención/represión de HSPC en procesos inflamatorios *in vivo*, promueve la expansión, diferenciación y migración de las células hematopoyéticas de la MO (Vadillo et al. 2013).

Los resultados de las simulaciones del modelo HSPC-MSK con nodos mutantes fueron analizados mediante la comparación con literatura científica para comprobar la fidelidad del modelo *in silico* con los datos experimentales. Existen pocos reportes de mutantes en los nodos de MSK considerados en la construcción del presente modelo y su efecto sobre las células hematopoyéticas en la MO. Respecto al efecto de mutantes de β -catenina y GSK3 β en las células mesenquimales, la literatura revisada se enfoca principalmente en su papel regulatorio sobre la osteoblastogénesis (Zhou 2011). Recientemente fue publicado un artículo en donde el incremento de β -catenina en células osteoblásticas derivó en la inducción de AML en ratón (Kode et al. 2014). La publicación de Kode et al. reporta la desregulación de Jagger y Notch en

MSC provenientes de pacientes con AML. La identificación de alteraciones en MSC ha sido anteriormente reportada por otros grupos (Lim et al. 2015), entre ellas se encuentra la producción alterada de BMP4 (López et al. 2014). La pérdida de capacidad de soporte de MSC provenientes de pacientes leucémicos reportada por el incremento de BMP4 podría responder al incremento de β -catenina (Fujimori et al. 2010) la cual, de acuerdo con las simulaciones *in silico* estaría también afectando la expresión de CXCL12.

Los resultados de las simulaciones con mutantes de ganancia de expresión de nodos involucrados en la respuesta inflamatoria de MSC y citocinas microambientales (Nfkb_M, ROS_M, TLR_M, IL1B, GCSF) son consistentes con los reportes sobre la disminución de CXCL12 en la MO que como consecuencia, al no activar a CXCR4 estaría disminuyendo la adhesión de HSPC al estroma permitiendo su probable migración a nichos de expansión y diferenciación. Por otro lado, si adicional a las señales pro-inflamatorias en la MO, existe un gradiente de CXCL12 (modelado por la activación constitutiva de TLR_M) proveniente de un sitio de daño extramedular, éste podría estar señalizando por CXCR7. A pesar de que aún no está clara la función y señalización de CXCR7 en HSPC normales, en líneas celulares de mieloma y células provenientes de pacientes con LLA se ha reportado un incremento de expresión y su participación en el incremento de adhesión y migración celular (Melo et al. 2014; Tarnowski et al. 2010). Entre las alteraciones en MSC de pacientes leucémicos, se reportó un incremento en la activación de la vía de NF- κ B que a través de VCAM-1/VLA-4 promueve el incremento de NF- κ B en las células leucémicas induciendo quimiorresistencia (Jacamo et al. 2014). Para comparar la dinámica del modelo propuesto con éste reporte, se realizó un análisis de transición de estados con Nfkb_M encendido constitutivamente y con inhibición de VCAM-1 en el paso de tiempo 700 y 1400. El resultado de la simulación no concuerda con los resultados reportados, dado que, a pesar de que se observa una ligera activación de Nfkb_H ésta no se ve afectada al inhibir VCAM-1 (Anexo 3).

La mayoría de los resultados de simulaciones con mutantes en los nodos de HSPC no concuerda con lo publicado a partir de datos experimentales. Las discrepancias entre los resultados obtenidos con el modelo *in silico* y los datos experimentales están principalmente basados en la expresión de β -catenina y la ausencia de constante activación de vías involucradas en proliferación. Lataillade y colaboradores han estudiado el incremento en la proliferación de HSPC en SP inducida por la activación de CXCR4 (Chabanon et al. 2008; Lataillade et al. 2000;

Lataillade et al. 2002). El efecto de CXCL12 en HSPC difiere según el contexto microambiental en el cual se encuentre (SP o MO), sugiriendo la probable regulación de las vías de señalización activadas por la quimiocina por factores microambientales. La alternativa en el modelo *in silico* para la regulación de las vías PI3K/Akt y ERK activadas por CXCR4, es la activación del nodo FoxO3a. FoxO3a es uno de los principales factores promotores del estado quiescente de las células HSC (Tothova et al. 2007, Yamazaki et al. 2006) sin embargo, los únicos inductores para la activación de éste nodo son ROS_H y Bcatenin_H. ROS únicamente se enciende en presencia de un estímulo pro-inflamatorio y Bcatenin_H es activado en presencia de PI3KAkt_H, nodo que a su vez regula negativamente a FoxO3a_H.

VIII. CONCLUSIÓN

Los elementos propuestos como factores esenciales en el mantenimiento de la comunicación intercelular en la LLA (CXCL12/CXCR4, Cx43, VCAM-1/VLA-4) se encuentran teóricamente inter-conectados y regulados por vías que participan en diferenciación y proliferación celulares (Gfi1, PI3K/Akt, β -catenina). Es de especial interés la perturbación de los ejes de comunicación intercelular HSPC-MSK en situaciones de pro-inflamación.

El análisis de atractores es una aproximación limitada para el estudio de las vías de señalización, debido a lo cual hemos implementado el análisis de estados de transición como método para mimetizar un comportamiento poblacional más que un comportamiento de célula única, como lo es el análisis de atractores. Las observaciones de la dinámica del modelo discreto de HSPC-MSK en presencia de un estímulo pro-inflamatorio corresponden con las reportadas en la literatura.

El análisis de los resultados obtenidos por la simulación del modelo con nodos mutados fue difícil debido a la ausencia de nodos *output* que determinen un destino celular (Grieco et al. 2013; Zhang et al. 2008). La adición de nodos directamente involucrados en ciclo celular, apoptosis y/o auto-renovación, facilitarían el análisis de los resultados del modelo HSPC-MSK.

La construcción y simulación del modelo propuesto, ha sido útil para comprobar que la participación de los ejes CXCR4/CXCL12 y VLA-4/VCAM-1 no son suficientes para simular los efectos de las MSK como soporte del compartimento de HSPC normales ni de células HSPC con mutaciones frecuentemente reportadas en leucemia (β -catenina, NF- κ B y PI3K/Akt). Debe existir una co-regulación con otros componentes del microambiente en la MO para promover el arresto celular de HSPC. En esta dirección se ha reportado el requerimiento de TGF β para que CXCR4 permanezca responsivo ante una exposición prolongada a CXCL12 (Basu & Boxmeyer et al. 2005).

Adicional a la probable co-regulación entre CXCR4 y otros factores microambientales, debe estudiarse más a fondo las evidencias de la actividad y participación de CXCR7, debido a que podría estar reemplazando la activación de CXCR4 en situaciones de estrés y no ser sensible a la regulación por otros factores microambientales por su localización mayoritariamente intracelular

(Torossian et al. 2014). CXCR7 no necesariamente inhibe la señalización desencadenada por el receptor acoplado a proteína-G, sino que probablemente activa selectivamente algunas de las mismas vías a través de β -arrestina (Uto-Konomi et al. 2013).

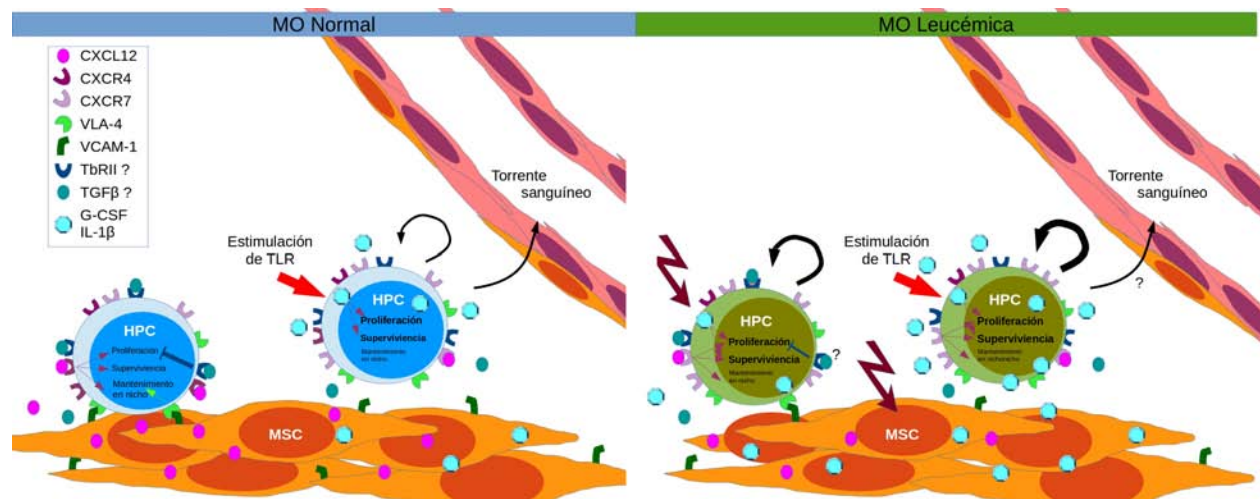


Figura 10. Perturbación de señales actuando en colaboración para la regulación de la decisión del destino celular de HSPC en el nicho mesenquimal. En la normalidad, el mantenimiento de la HSPC en el nicho mesenquimal es consecuencia de la interacción de moléculas de adhesión (VLA-4/VCAM-1) y la actividad quimiotáctica de CXCR4/CXCL12. Sin embargo, a partir de los resultados reportados, se propone que la señal proliferativa provista por la activación de CXCR4 debe estar regulada por algún otro elemento microambiental. TGF β podría estar proveyendo una señal anti-proliferativa (flecha trunca azul), a la par que se ha propuesto como elemento necesario para mantener la sensibilidad a CXCL12. Ante un estímulo pro-inflamatorio, como ligandos de TLR, la señalización de ambos ejes de mantenimiento disminuye, se favorece la señalización por CXCR7, incrementa la secreción de citocinas pro-inflamatorias y como consecuencia hay una migración celular, no necesariamente fuera de la MO, sino a otro nicho medular promotor de la proliferación y diferenciación hematopoyética. En la MO leucémica, en donde hemos observado un microambiente pro-inflamatorio provisto tanto por la fracción blástica como por la mesenquimal, la interacción entre ambos tipos celulares podría encontrarse inhibida, provocando una hiperproliferación celular. En ausencia de CXCL12, las citocinas pro-inflamatorias, proporcionan las señales de supervivencia y proliferación.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Abou-Jaoudé, W. et al., 2015. Model checking to assess T-helper cell plasticity. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2, pp.1–13.
- Acevedo Fernández, J.J. et al., 2011. *Células troncales y medicina regenerativa* 1a ed. R. Pelayo, J. Santa-Olalla, & I. Velasco, eds., México, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Albert, R. et al., 2007. A novel method for signal transduction network inference from indirect experimental evidence. *Journal of computational biology: a journal of computational molecular cell biology*, 14(7), pp.927–49.
- Albert, R. & Wang, R.-S., 2009. Discrete dynamic modeling of cellular signaling networks. *Methods in enzymology*, 467, pp.281–306.
- Allakhverdi, Z. et al., 2013. Mast cell-activated bone marrow mesenchymal stromal cells regulate proliferation and lineage commitment of CD34+ progenitor cells. *Frontiers in immunology*, 4(461).
- Almeida, M. et al., 2007. Oxidative stress antagonizes Wnt signaling in osteoblast precursors by diverting beta-catenin from T cell factor- to forkhead box O-mediated transcription. *The Journal of biological chemistry*, 282(37), pp.27298–305.
- Arai, F. et al., 2004. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell*, 118(2), pp.149–61.
- Assman, S.M. & Albert, R., 2009. Discrete dynamic modelling with asynchronous update or, how to model complex systems in the absence of quantitative information. *Methods in molecular biology*, 553, pp.207–225.
- Ayala, F. et al., 2009. Contribution of bone microenvironment to leukemogenesis and leukemia progression. *Leukemia*, 23(12), pp.2233–41.
- Bai, X. et al., 2004. Oxidative stress inhibits osteoblastic differentiation of bone cells by ERK and NF- κ B. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 314(1), pp.197–207.
- Bansal, M. et al., 2007. How to infer gene networks from expression profiles. *Molecular systems biology*, 3(78), p.78.
- Bayat, H. et al., 2008. Activation of Thromboxane Receptor Upregulates Interleukin (IL)-1 β -Induced VCAM-1 Expression Through JNK Signaling. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 28, pp.127–134.
- Bektas, A. et al., 2014. Age-associated changes in basal NF- κ B function in human CD4+ T lymphocytes via dysregulation of PI3 kinase. *Aging*, 6(11), pp.957–974.
- Ben-Shoshan, J. et al., 2008. Constitutive expression of HIF-1 α and HIF-2 α in bone marrow stromal cells differentially promotes their proangiogenic properties. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 26(10), pp.2634–43.
- Biver, E. et al., 2014. Crosstalk between tyrosine kinase receptors, GSK3 and BMP2 signaling during osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 382(1), pp.120–130.
- Blank, U., Karlsson, G. & Karlsson, S., 2008. Signaling pathways governing stem-cell fate. *Blood*, 111(2), pp.492–503.
- Bleul CC, et al., 1996. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature*, 382(6594), pp.829–833.
- Bonizzi, G. et al., 1999. Reactive oxygen intermediate-dependent NF-kappaB activation by interleukin-1beta requires 5-lipoxygenase or NADPH oxidase activity. *Molecular and cellular biology*, 19(3), pp.1950–1960.
- Brunet, A. et al., 1999. Akt Promotes Cell Survival by Phosphorylating and Inhibiting a Forkhead Transcription Factor. *Cell*, 96, pp.857–868.
- Buldak, R.J. et al., 2013. Exogenous administration of visfatin affects cytokine secretion and increases oxidative stress in human malignant melanoma ME45 cells. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 64(3), pp.377–385.

- Burger, J. a & Kipps, T.J., 2006. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood*, 107(5), pp.1761–7.
- Burns, J.M. et al., 2006. A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *The Journal of experimental medicine*, 203(9), pp.2201–13.
- Calvi, L. et al., 2003. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*, 425, pp.841–846.
- Campana, D. & Pui, C.-H., 2008. Childhood Leukemia. In M. Abeloff et al., eds. *Abeloff's Clinical Oncology*. Philadelphia: Elsevier, pp. 2139–2169.
- Campos-Sanchez, E. et al., 2011. Acute lymphoblastic leukemia and developmental biology. A crucial interrelationship. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 10(20), pp.3473–3486.
- Cancelas, J. a et al., 2000. Connexin-43 gap junctions are involved in multic Connexin-expressing stromal support of hemopoietic progenitors and stem cells. *Blood*, 96(2), pp.498–505.
- Carrero, R. et al., 2012. IL1 β induces mesenchymal stem cells migration and leucocyte chemotaxis through NF- κ B. *Stem cell reviews*, 8(3), pp.905–16.
- Case, N. et al., 2011. Mechanical regulation of glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) in mesenchymal stem cells is dependent on Akt protein serine 473 phosphorylation via mTORC2 protein. *Journal of Biological Chemistry*, 286(45), pp.39450–39456.
- Lo Celso, C. & Scadden, D.T., 2011. The haematopoietic stem cell niche at a glance. *Journal of cell science*, 124(Pt 21), pp.3529–35.
- Chabanon, A. et al., 2008. A cross-talk between stromal cell-derived factor-1 and transforming growth factor-beta controls the quiescence/cycling switch of CD34(+) progenitors through FoxO3 and mammalian target of rapamycin. *Stem cells*, 26(12), pp.3150–3161.
- Chang, J. et al., 2013. NF- κ B inhibits osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells by promoting β -catenin degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(23), pp.9469–9474.
- Cheng, M. & Qin, G., 2012. Progenitor cell mobilization and recruitment: SDF-1, CXCR4, α 4-integrin, and c-kit. *Progress in molecular biology and translational science*, 111, pp.243–264.
- Chotinantakul, K. & Leeansaksiri, W., 2012. Hematopoietic stem cell development, niches, and signaling pathways. *Bone marrow research*, 2012, p.270425.
- Christensen, C., Thakar, J. & Albert, R., 2007. Systems-level insights into cellular regulation : inferring , analysing , and modelling intracellular networks. *IET systems biology*, 1(2), pp.61–77.
- Christopher, M.J. et al., 2009. Suppression of CXCL12 production by bone marrow osteoblasts is a common and critical pathway for cytokine-induced mobilization. *Blood*, 114(7), pp.1331–1339.
- Cobas, M. et al., 2004. Beta-catenin is dispensable for hematopoiesis and lymphopoiesis. *The Journal of experimental medicine*, 199(2), pp.221–229.
- Coggins, N.L. et al., 2014. CXCR7 controls competition for recruitment of β -arrestin 2 in cells expressing both CXCR4 and CXCR7. *PloS one*, 9(6), p.e98328.
- Cook, D. a. et al., 2014. Wnt-dependent osteogenic commitment of bone marrow stromal cells using a novel GSK3 β inhibitor. *Stem Cell Research*, 12(2), pp.415–427.
- Cortez, M. et al., 2013. A high-fat diet increases IL-1, IL-6, and TNF- α production by increasing NF- κ B and attenuating PPAR- γ expression in bone marrow mesenchymal stem cells. *Inflammation*, 36(2), pp.379–386.
- Crisostomo, P. & Wang, Y., 2008. Human mesenchymal stem cells stimulated by TNF α , LPS, or hypoxia produce growth factors by an NF κ B-but not JNK-dependent mechanism. *American Journal of ...*, 46202, pp.675–682.
- Curado, M.P. et al., 2011. Leukemia mortality trends among children, adolescents, and young adults in Latin America. *Revista panamericana de salud pública = Pan American journal of public health*, 29(2), pp.96–102.
- Dang, S. et al., 2013. Stimulation of TLR4 by LMW-HA Induces Metastasis in Human Papillary Thyroid Carcinoma through CXCR7. *Clinical & developmental immunology*, 2013, p.712561.

- Day, R.B. et al., 2015. Granulocyte colony-stimulating factor reprograms bone marrow stromal cells to actively suppress B lymphopoiesis in mice. *Blood*, pp.pii: blood-2015-02-629444.
- De Jong, H., 2002. Modeling and simulation of genetic regulatory systems: A literature review. *Journal of computational biology*, 9(1), pp.67-103.
- De la Luz Sierra, M. et al., 2010. The transcription factor Gfi1 regulates G-CSF signaling and neutrophil development through the Ras activator RasGRP1. *Blood*, 115(19), pp.3970-9.
- De La Luz Sierra, M. et al., 2007. Transcription factor Gfi-1 induced by G-CSF is a negative regulator of CXCR4 in myeloid cells. *Blood*, 110(7), pp.2276-85.
- Delgado-Martín, C. et al., 2011. Chemokine CXCL12 uses CXCR4 and a signaling core formed by bifunctional akt, Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK)1/2, and Mammalian Target of Rapamycin Complex 1 (mTORC1) proteins to control chemotaxis and survival simultaneously in mature dendriti. *Journal of Biological Chemistry*, 286(43), pp.37222-37236.
- Doan, L.L. et al., 2004. Targeted transcriptional repression of Gfi1 by GFI1 and GFI1B in lymphoid cells. *Nucleic acids research*, 32(8), pp.2508-2519.
- Dorantes-Acosta, E. & Pelayo, R., 2012. Lineage switching in acute leukemias: a consequence of stem cell plasticity? *Bone marrow research*, 2012, p.406796.
- Duda, D.G. et al., 2011. CXCL12 (SDF1alpha)-CXCR4/CXCR7 pathway inhibition: an emerging sensitizer for anticancer therapies? *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 17(8), pp.2074-80.
- Duinhouwer, L.E. et al., 2015. Wnt3a Protein Reduces Growth Factor-Driven Expansion of Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cells in Serum-Free Cultures. *Plos One*, 10(3), p.e0119086.
- Eaves, C. et al., 1997. Hematopoietic stem cells: inferences from in vivo assays. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 15 Suppl 1(suppl 1), pp.1-5.
- Ehninger, A. & Trumpp, A., 2011. The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in. *The Journal of experimental medicine*, 208(3), pp.421-8.
- Enciso, J., Mendoza, L. & Pelayo, R., 2015. Normal vs. Malignant hematopoiesis: the complexity of acute leukemia through systems biology. *Frontiers in Genetics*, 6, pp.1-5.
- Essers, M. a G. et al., 2005. Functional interaction between beta-catenin and FOXO in oxidative stress signaling. *Science (New York, N.Y.)*, 308(5725), pp.1181-4.
- Feng, Y. et al., 1996. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*, 272(5263), pp.872-7.
- Finn, N.A. & Kemp, M.L., 2012. Pro-oxidant and antioxidant effects of N-acetylcysteine regulate doxorubicin-induced NF-kappa B activity in leukemic cells. *Molecular bioSystems*, 8(2), pp.650-62.
- Fuentes-Pananá, E.M., Bannish, G., Shah, N., et al., 2004. Basal Igalpha/Igbeta signals trigger the coordinated initiation of pre-B cell antigen receptor-dependent processes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 173(2), pp.1000-11.
- Fuentes-Pananá, E.M., Bannish, G. & Monroe, J.G., 2004. Basal B-cell receptor signaling in B lymphocytes: mechanisms of regulation and role in positive selection, differentiation, and peripheral survival. *Immunological reviews*, 197, pp.26-40.
- Fujimori, S. et al., 2010. Wnt/ β -catenin signaling in the dental mesenchyme regulates incisor development by regulating Bmp4. *Developmental Biology*, 348(1), pp.97-106.
- Furmento, V. a. et al., 2014. The granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) upregulates metalloproteinase-2 and VEGF through PI3K/Akt and Erk1/2 activation in human trophoblast Swan 71 cells. *Placenta*, 35(11), pp.937-946.
- Gabelloni, M.L. et al., 2013. NADPH oxidase derived reactive oxygen species are involved in human neutrophil IL-1 β secretion but not in inflammasome activation. *European Journal of Immunology*, 43(12), pp.3324-3335.

- Gorbunov, N. V. et al., 2013. Adaptive redox response of mesenchymal stromal cells to stimulation with lipopolysaccharide inflammagen: Mechanisms of remodeling of tissue barriers in sepsis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013:186795.
- Greaves, M., 1997. Aetiology of acute leukaemia. *The Lancet*, 349, pp.344–349.
- Greaves, M., 2006. Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. *Nature Reviews. Cancer*, 6(3), pp.193-203.
- Greenbaum, A. et al., 2013. CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. *Nature*, 495(7440), pp.227–30.
- Grieco, L. et al., 2013. Integrative modelling of the influence of MAPK network on cancer cell fate decision. *PLoS Computational Biology*, 9(10).
- Griffith, C.E., Zhang, W. & Wange, R.L., 1998. ZAP-70-dependent and -independent Activation of Erk in. *The Journal of biological chemistry*, 273(17), pp.10771–10776.
- Grosselin, J. et al., 2012. *Searching for the Key to Expand Hematopoietic Stem Cells* D. R. Pelayo, ed., InTech.
- Guha, M. & Mackman, N., 2002. The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway limits lipopolysaccharide activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocytic cells. *Journal of Biological Chemistry*, 277(35), pp.32124–32132.
- Han, Z.-B. et al., 2008. Hypoxia-inducible factor (HIF)-1 alpha directly enhances the transcriptional activity of stem cell factor (SCF) in response to hypoxia and epidermal growth factor (EGF). *Carcinogenesis*, 29(10), pp.1853–61.
- Harrison, J.S. et al., 2002. Oxygen saturation in the bone marrow of healthy volunteers. *Blood*, 99(1), p.394.
- Hartmann, T.N. et al., 2008. A crosstalk between intracellular CXCR7 and CXCR4 involved in rapid CXCL12-triggered integrin activation but not in chemokine-triggered motility of human T lymphocytes and CD34+ cells. *Journal of leukocyte biology*, 84(4), pp.1130–1140.
- Hayden, M.S. & Ghosh, S., 2014. Regulation of NF- κ B by TNF family cytokines. *Seminars in Immunology*, 26(3), pp.253–266.
- Hidalgo, A. et al., 2001. Chemokine stromal cell-derived factor-1 α modulates VLA-4 integrin-dependent adhesion to fibronectin and VCAM-1 on bone marrow hematopoietic progenitor cells. *Experimental Hematology*, 29(3), pp.345–355.
- Higashikuni, Y. et al., 2013. Toll-like receptor-2 mediates adaptive cardiac hypertrophy in response to pressure overload through interleukin-1 β upregulation via nuclear factor κ B activation. *Journal of the American Heart Association*, 2(6), p.e000267.
- Hitchon, C. et al., 2002. Hypoxia-induced production of stromal cell-derived factor 1 (CXCL12) and vascular endothelial growth factor by synovial fibroblasts. *Arthritis and rheumatism*, 46(10), pp.2587–97.
- Hock, H. et al., 2004. Gfi-1 restricts proliferation and preserves functional integrity of haematopoietic stem cells. *Nature*, 431(7011), pp.1002–1007.
- Holmes, T. et al., 2008. Glycogen synthase kinase-3beta inhibition preserves hematopoietic stem cell activity and inhibits leukemic cell growth. *Stem cells*, 26(5), pp.1288–1297.
- Hoogeboom, D. et al., 2008. Interaction of FOXO with β -Catenin Inhibits β -Catenin/T Cell Factor Activity. *The Journal of biological chemistry*, 283, pp.9224–9230.
- Hsu, H.Y. & Wen, M.H., 2002. Lipopolysaccharide-mediated reactive oxygen species and signal transduction in the regulation of interleukin-1 gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, 277(25), pp.22131–22139.
- Hu, Y. et al., 2013. Platelet-derived growth factor BB mediates the glioma-induced migration of bone marrow-derived mesenchymal stem cells by promoting the expression of vascular cell adhesion molecule-1 through the PI3K, P38 MAPK and NF- κ B pathways. *Oncology Reports*, 30(6), pp.2755–2764.
- Iacobucci, I. et al., 2012. IKAROS deletions dictate a unique gene expression signature in patients with adult B-cell acute lymphoblastic leukemia. *PloS one*, 7(7), p.e40934..

- Iwamoto, S., Mihara, K. & Downing, J.R., 2007. Mesenchymal cells regulate the response of acute lymphoblastic leukemia cells to asparaginase. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(4), pp.1049–1057.
- Iyer, S. et al., 2013. FOXOs attenuate bone formation by suppressing Wnt signaling. *The Journal of clinical investigation*, 123(8), pp.3409–3419.
- Iyer, S. et al., 2014. Sirtuin1 (Sirt1) promotes cortical bone formation by preventing β -catenin sequestration by FoxO transcription factors in osteoblast progenitors. *The Journal of biological chemistry*, 289(35), pp.24069–78.
- Jacamo, R. et al., 2014. Reciprocal leukemia-stroma VCAM-1/VLA-4-dependent activation of NF- κ B mediates chemoresistance. *Blood*, 123(17), pp.2691–2702.
- Jeannet, G. et al., 2008. Long-term, multilineage hematopoiesis occurs in the combined absence of β -catenin and γ -catenin. *Blood*, 111(1), pp.142–149.
- Jing, D. et al., 2010. Hematopoietic stem cells in co-culture with mesenchymal stromal cells--modeling the niche compartments in vitro. *Haematologica*, 95(4), pp.542–50.
- Jing, D. et al., 2012. Oxygen tension plays a critical role in the hematopoietic microenvironment in vitro. *Haematologica*, 97(3), pp.331–9.
- Jones, B.W. et al., 2001. Different Toll-like receptor agonists induce distinct macrophage responses. *Journal of leukocyte biology*, 69(6), pp.1036–1044.
- Katsumi, A. et al., 2011. FLT3/ITD regulates leukaemia cell adhesion through α 4 β 1 integrin and Pyk2 signalling. *European journal of haematology*, 86(3), pp.191–8.
- Kauffman, S. a, 1969. Metabolic stability and epigenesis in randomly constructed genetic nets. *Journal of theoretical biology*, 22(3), pp.437–67.
- Keith, B., Johnson, R.S. & Simon, M.C., 2012. HIF1 α and HIF2 α : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nature reviews. Cancer*, 12(1), pp.9–22.
- Keshari, R.S. et al., 2013. Reactive oxygen species-induced activation of ERK and p38 MAPK mediates PMA-induced NETs release from human neutrophils. *Journal of cellular biochemistry*, 114(3), pp.532–40.
- Khandanpour, C. et al., 2010. Evidence that Growth factor independence 1b regulates dormancy and peripheral blood mobilization of hematopoietic stem cells Evidence that Growth factor independence 1b regulates dormancy and peripheral blood mobilization of hematopoietic stem cells. *Blood*, 116(24), pp.5149–5161.
- Kirstetter, P. et al., 2006. Activation of the canonical Wnt pathway leads to loss of hematopoietic stem cell repopulation and multilineage differentiation block. *Nature immunology*, 7(10), pp.1048–1056.
- Knight, T. & Irving, J.A.E., 2014. Ras/Raf/MEK/ERK pathway activation in childhood acute lymphoblastic leukemia and its therapeutic targeting. *Frontiers in oncology*, 4(June), pp.1–12.
- Kobayashi, H. et al., 2010. Angiocrine factors from Akt-activated endothelial cells balance self-renewal and differentiation of hematopoietic stem cells. *Nature cell biology*, 12(11), pp.1046–1056.
- Kode, A. et al., 2014. Leukemogenesis Induced by an Activating β -catenin mutation in Osteoblasts. *Nature*, 506(7487), pp.240–244.
- Kohara, H. et al., 2007. Development of plasmacytoid dendritic cells in bone marrow stromal cell niches requires CXCL12-CXCR4 chemokine signaling. *Blood*, 110(13), pp.4153–60.
- Kumar, R. et al., 2012. CXCR7 mediated G α independent activation of ERK and Akt promotes cell survival and chemotaxis in T cells. *Cellular Immunology*, 272(2), pp.230–241.
- Lataillade, J. et al., 2002. Stromal cell – derived factor 1 regulates primitive hematopoiesis by suppressing apoptosis and by promoting G 0 / G 1 transition in CD34 α cells : evidence for an autocrine / paracrine mechanism. , 99(4), pp.1117–1129.
- Lataillade, J.J. et al., 2000. Chemokine SDF-1 enhances circulating CD34(+) cell proliferation in synergy with cytokines: possible role in progenitor survival. *Blood*, 95(3), pp.756–768.
- Lee, B. et al., 2005. Carboxyl-Terminal Src Kinase Homologous Kinase Negatively Regulates the Chemokine Receptor CXCR4 through YY1 and Impairs CXCR4 / CXCL12 (SDF-1 α) – Mediated Breast Cancer Cell

- Migration CXCR4 / CXCL12 (SDF-1 A)– Mediated Breast Cancer Cell Migration. *Cancer research*, 65(7), pp.2840–2845.
- Lee, H.-H. et al., 2013. Hypoxia enhances chondrogenesis and prevents terminal differentiation through PI3K/Akt/FoxO dependent anti-apoptotic effect. *Scientific reports*, 3, p.2683.
- Lee, S.R. et al., 2002. Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H₂O₂. *Journal of Biological Chemistry*, 277(23), pp.20336–20342.
- Lei, H. & Quelle, F.W., 2009. FOXO Transcription Factors Enforce Cell Cycle Checkpoints and Promote Survival of Hematopoietic Cells after DNA Damage. *Molecular cancer research*, 7(8), pp.1294–1303.
- Leslie, N.R. et al., 2003. Redox regulation of PI 3-kinase signalling via inactivation of PTEN. *EMBO Journal*, 22(20), pp.5501–5510.
- Lévesque, J. et al., 2003. Disruption of the CXCR4 / CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by GCSF or cyclophosphamide. *The Journal of clinical investigation*, 111(2), pp.187–196.
- Li, B. & Smith, T.J., 2014. PI3K/AKT pathway mediates induction of IL-1RA by TSH in fibrocytes: Modulation by PTEN. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 99(August), p.jc20141257.
- Lim, M. et al., 2015. Altered mesenchymal niche cells impede generation of normal hematopoietic progenitor cells in leukemic bone marrow. *Leukemia*, (August).
- Lin, L., Hron, J.D. & Peng, S.L., 2004. Regulation of NF- κ B, Th activation, and autoinflammation by the Forkhead transcription factor Foxo3a. *Immunity*, 21(2), pp.203–213.
- Liu, J.-W. et al., 2005. Induction of prosurvival molecules by apoptotic stimuli: involvement of FOXO3a and ROS. *Oncogene*, 24(12), pp.2020–2031.
- Liu, Q. et al., 2013. Fullerol nanoparticles suppress inflammatory response and adipogenesis of vertebral bone marrow stromal cells--a potential novel treatment for intervertebral disc degeneration. *The spine journal : official journal of the North American Spine Society*, 13(11), pp.1571–80.
- Liu, T.M. et al., 2007. Identification of common pathways mediating differentiation of bone marrow- and adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells into three mesenchymal lineages. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 25(3), pp.750–60.
- Loetscher, M., 1994. Cloning of a human seven-transmembrane domain receptor, LESTR, that is highly expressed in leukocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(1), pp.232-7.
- López, Á.V. et al., 2014. Mesenchymal stromal cells derived from the bone marrow of acute lymphoblastic leukemia patients show altered BMP4 production: Correlations with the course of disease. *PLoS ONE*, 9(1), pp.1–11.
- Lu, W. et al., 2013. Free iron catalyzes oxidative damage to hematopoietic cells/mesenchymal stem cells in vitro and suppresses hematopoiesis in iron overload patients. *European Journal of Haematology*, 91(3), pp.249–261.
- Lua, J. et al., 2012. Fak depletion in both hematopoietic and non-hematopoietic niche cells leads to hematopoietic stem cell expansion. *Experimental hematology*, 40(4), pp.307–317.
- Ma, Q. et al., 1998. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(16), pp.9448–9453.
- Machtaler, S. et al., 2011. The gap junction protein Cx43 regulates B-lymphocyte spreading and adhesion. *Journal of cell science*, 124(Pt 15), pp.2611–21.
- MacLean, A.L., Lo Celso, C. & Stumpf, M.P.H., 2013. Population dynamics of normal and leukaemia stem cells in the haematopoietic stem cell niche show distinct regimes where leukaemia will be controlled. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*, 10(81), p.20120968.
- Madge, L. a. & May, M.J., 2010. Classical NF- κ B activation negatively regulates noncanonical NF- κ B-dependent CXCL12 expression. *Journal of Biological Chemistry*, 285(49), pp.38069–38077.

- Majumdar, M.K. et al., 2000. Human Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells (MSCs) Express Hematopoietic Cytokines and Support Long-Term Hematopoiesis When Differentiated Toward Stromal and Osteogenic Lineages. *Journal of hematology & Stem cell research*, 9, pp.841–848.
- Malhotra, S. & Kincade, P.W., 2009. Canonical Wnt pathway signaling suppresses VCAM-1 expression by marrow stromal and hematopoietic cells. *Experimental hematology*, 37(1), pp.19–30.
- Malhotra, S. & Kincade, P.W., 2009. Wnt-Related Molecules and Signaling Pathway Equilibrium in Hematopoiesis. *Cell Stem Cell*, 4(1), pp.27–36.
- Maurer, U. et al., 2006. Glycogen synthase kinase-3 regulates mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis by destabilization of MCL-1. *Molecular Cell*, 21(6), pp.749–760.
- Martínez-Sosa, P. & Mendoza, L., 2013. The regulatory network that controls the differentiation of T lymphocytes. *Bio Systems*, 113(2), pp.96–103.
- Mcgilvray, I.D. et al., 1997. VLA-4 Integrin Cross-linking on Human Monocytic THP-1 Cells Induces Tissue Factor Expression by a Mechanism Involving Mitogen-activated Protein Kinase VLA-4 Integrin Cross-linking on Human Monocytic THP-1 Cells Induces Tissue Factor Expression by a Mechanism Involving Mitogen-activated Protein Kinase. *The Journal of biological chemistry*, 272(15), pp.10287–10294.
- McGuire, V. a et al., 2013. Cross talk between the Akt and p38 α pathways in macrophages downstream of Toll-like receptor signaling. *Molecular and cellular biology*, 33(21), pp.4152–65.
- Melikova, S., Dylla, S.J. & Verfaillie, C.M., 2004. Phosphatidylinositol-3-kinase activation mediates proline-rich tyrosine kinase 2 phosphorylation and recruitment to α 1-integrins in human CD34 + cells. *Experimental Hematology*, 32(11), pp.1051–1056.
- Melo, R. et al., 2014. CXCR7 Is Highly Expressed in Acute Lymphoblastic Leukemia and Potentiates CXCR4 Response to CXCL12. *PLoS ONE*, 9(1), p.e85926.
- Méndez-Ferrer, S. & Frenette, P.S., 2007. Hematopoietic stem cell trafficking: regulated adhesion and attraction to bone marrow microenvironment. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1116, pp.392–413.
- Mendoza, L., 2006. A network model for the control of the differentiation process in Th cells. *Biosystems*, 84(2), pp.101–14.
- Mendoza, L. & Pardo, F., 2010. A robust model to describe the differentiation of T-helper cells. *Theory in Biosciences*, 129, pp.283–293.
- Mendoza, L. & Xenarios, I., 2006. A method for the generation of standardized qualitative dynamical systems of regulatory networks. *Theoretical biology & medical modelling*, 3, p.13.
- Meng, J. et al., 2010. Apoptosis Induction by MEK Inhibition in Human Lung Cancer Cells Is Mediated by Bim. *PLoS ONE*, 5(9), p.e13026.
- Miyamoto, K. et al., 2008. FoxO3a regulates hematopoietic homeostasis through a negative feedback pathway in conditions of stress or aging. *Blood*, 112(12), pp.4485–93.
- Molnarfi, N. et al., 2006. Opposite Regulation of IL-1 and Secreted IL-1 Receptor Antagonist Production by Phosphatidylinositide-3 Kinases in Human Monocytes Activated by Lipopolysaccharides or Contact with T Cells. *The Journal of Immunology*, 178(1), pp.446–454.
- Montecino-Rodriguez, E., Leathers, H. & Dorshkind, K., 2000. Expression of connexin 43 (Cx43) is critical for normal hematopoiesis. *Blood*, 96(3), pp.917–24.
- Mullighan, C.G., 2012. Molecular genetics of B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(10), pp.3407–3415.
- Müssel, C., Hopfensitz, M. & Kestler, H. a., 2010. BoolNet-an R package for generation, reconstruction and analysis of Boolean networks. *Bioinformatics*, 26(10), pp.1378–1380.
- Nagai, Y. et al., 2006. Toll-like receptors on hematopoietic progenitor cells stimulate innate immune system replenishment. *Immunity*, 24(6), pp.801–812.
- Nagasawa, T. et al., 1996. Defects of B-cell lymphopoiesis and BM myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF-SDF1. *Nature*, 382(6592), pp.635–638.

- Nakamura-Ishizu, A. & Suda, T., 2013. Hematopoietic stem cell niche: an interplay among a repertoire of multiple functional niches. *Biochimica et biophysica acta*, 1830(2), pp.2404–9.
- Naldi, A. et al., 2010. Diversity and plasticity of Th cell types predicted from regulatory network modelling. *PLoS computational biology*, 6(9), p.e1000912.
- Niarakis, A. et al., 2014. Computational modeling of the main signaling pathways involved in mast cell activation M. Daeron & F. Nimmerjahn, eds. *Current topics in microbiology and immunology*, 382, pp.69–93.
- Nie, Y., Han, Y.-C. & Zou, Y.-R., 2008. CXCR4 is required for the quiescence of primitive hematopoietic cells. *The Journal of experimental medicine*, 205(4), pp.777–83.
- Noda, M. et al., 2011. CXCL12-CXCR4 chemokine signaling is essential for NK-cell development in adult mice. *Blood*, 117(2), pp.451–8.
- Noh, K.T. et al., 2012. Protein kinase C δ (PKC δ)-extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) signaling cascade regulates glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) inhibition-mediated interleukin-10 (IL-10) expression in lipopolysaccharide (LPS)-induced endotoxemia. *Journal of Biological Chemistry*, 287(17), pp.14226–14233.
- Nwabo Kamdje, A.H. & Krampera, M., 2011. Notch signaling in acute lymphoblastic leukemia: any role for stromal microenvironment? *Blood*, 118(25), pp.6506–14.
- Oberlin, E., 1996. The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature*, 382(6594), pp.833–5.
- Ogawa, M., 1993. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood*, 81, pp.2844–2853.
- Omatsu, Y. et al., 2010. The essential functions of adipo-osteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche. *Immunity*, 33(3), pp.387–99.
- Park, S. et al., 2008. Identification of 24p3 as a Direct Target of Foxo3a Regulated by Interleukin-3 through the Phosphoinositide 3-Kinase/Akt Pathway. *The Journal of biological chemistry*, 284(4), pp.2187–2193.
- Park, S.-Y. et al., 2013. Focal adhesion kinase regulates the localization and retention of pro-B cells in bone marrow microenvironments. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 190(3), pp.1094–102.
- Pelayo, R. et al., 2012. From HSC to B-Lymphoid Cells in Normal and Malignant Hematopoiesis. *InTech*, pp.277–298.
- Peled, A. et al., 2000. The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. *Blood*, 95(11), pp.3289–96.
- Perry, J.M. et al., 2011. Cooperation between both Wnt/ β -catenin and PTEN/PI3K/Akt signaling promotes primitive hematopoietic stem cell self-renewal and expansion. *Genes and Development*, 25.
- Petty, J.M. et al., 2009. Crosstalk between CXCR4/stromal derived factor-1 and VLA-4/VCAM-1 pathways regulates neutrophil retention in the bone marrow. *The Journal of immunology*, 182, pp.604–612.
- Ponte, A.L. et al., 2012. Granulocyte-Colony-Stimulating Factor Stimulation of Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells Promotes CD34+ Cell Migration Via a Matrix Metalloproteinase-2-Dependent Mechanism. *Stem Cells and Development*, 21(17), p.120724080005007.
- Purizaca, J. et al., 2013. Lymphoid progenitor cells from childhood acute lymphoblastic leukemia are functionally deficient and express high levels of the transcriptional repressor *gfi-1*. *Clinical & developmental immunology*, 2013, p.349067.
- Purizaca, J., Meza, I. & Pelayo, R., 2012. Early lymphoid development and microenvironmental cues in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Archives of medical research*, 43(2), pp.89–101.
- Raaijmakers, M.H.G.P., 2011. Niche contributions to oncogenesis: emerging concepts and implications for the hematopoietic system. *Haematologica*, 96(7), pp.1041–8.
- Reddy, S. a. G., Huang, J.H. & Liao, W.S.-L., 1997. Phosphatidylinositol 3-Kinase in Interleukin 1 Signaling: PHYSICAL INTERACTION WITH THE INTERLEUKIN 1 RECEPTOR AND REQUIREMENT IN NF B AND AP-1 ACTIVATION. *Journal of Biological Chemistry*, 272(46), pp.29167–29173.

- Richmond, A., 2002. NF- κ B, Chemokine Gene Transcription and Tumour Growth. *Nature reviews. Immunology*, 2(9), pp.664–674.
- Salerno, L. et al., 2015. Computational modeling of a transcriptional switch underlying B-lymphocyte lineage commitment of hematopoietic multipotent. *PloS one*, 10(7), pp.1–23.
- Sanz-Rodríguez, F., Hidalgo, A. & Teixidó, J., 2001. Chemokine stromal cell-derived factor-1 α modulates VLA-4 integrin-mediated multiple myeloma cell adhesion to CS-1/fibronectin and VCAM-1. *Blood*, 97(2), pp.346–351.
- Satija, N.K. et al., 2013. High Throughput Transcriptome Profiling of Lithium Stimulated Human Mesenchymal Stem Cells Reveals Priming towards Osteoblastic Lineage. *PLoS ONE*, 8(1).
- Schajnovitz, A. et al., 2011. CXCL12 secretion by bone marrow stromal cells is dependent on cell contact and mediated by connexin-43 and connexin-45 gap junctions. *Nature immunology*, 12(5), pp.391–8.
- Scheller, M. et al., 2006. Hematopoietic stem cell and multilineage defects generated by constitutive beta-catenin activation. *Nature immunology*, 7(10), pp.1037–1047.
- Seita, J. & Weissman, I.L., 2010. Hematopoietic stem cell: Self-renewal versus differentiation. *Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine*, 2(6), pp.640–653.
- Semerad, C.L. et al., 2005. G-CSF potently inhibits osteoblast activity and CXCL12 mRNA expression in the bone marrow. *Blood*, 106(9), pp.3020–7.
- Shankar, S., Marsh, L. & Srivastava, R.K., 2013. EGCG inhibits growth of human pancreatic tumors orthotopically implanted in Balb C Nude mice through modulation of FKHRL1/FOXO3a and neuropilin. *Molecular and cellular biochemistry*, 372(1-2), pp.83–94.
- Sharif-Askari, E. et al., 2010. Zinc Finger Protein Gfi1 Controls the Endotoxin-Mediated Toll-Like Receptor Inflammatory Response by Antagonizing NF- κ B p65. *Molecular and cellular biology*, 30(16), pp.3929–3942.
- Shin, H.C. et al., 2014. Clinical significance of nuclear factor κ B and chemokine receptor CXCR4 expression in patients with diffuse large B-cell lymphoma who received rituximab-based therapy. *Korean journal of internal medicine*, 29, pp.785–792.
- Sierro, F. et al., 2007. Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(37), pp.14759–64.
- Silva, A. et al., 2008. PTEN posttranslational inactivation and hyperactivation of the PI3K/Akt pathway sustain primary T cell leukemia viability. *Journal of Clinical Investigation*, 118(11), pp.3762–3774.
- Sizemore, N., Leung, S. & Stark, G.R., 1999. Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase in Response to Interleukin-1 Leads to Phosphorylation and Activation of the NF- κ B p65/RelA Subunit. *Molecular and cellular biology*, 19(7), pp.4798–4805.
- Spiegel, A. et al., 2004. Unique SDF-1-induced activation of human precursor-B ALL cells as a result of altered CXCR4 expression and signaling. *Blood*, 103(8), pp.2900–7.
- Stier, S. et al., 2005. Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size. *The Journal of experimental medicine*, 201(11), pp.1781–91.
- Sugiyama, T. et al., 2006. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity*, 25(6), pp.977–88.
- Sugiyama, T. & Nagasawa, T., 2012. Bone marrow niches for hematopoietic stem cells and immune cells. *Inflammation & allergy drug targets*, 11(3), pp.201–206.
- Tabe, Y. et al., 2007. Activation of integrin-linked kinase is a critical prosurvival pathway induced in leukemic cells by bone marrow-derived stromal cells. *Cancer Research*, 67(2), pp.684–694.
- Tak, P.P. & Firestein, G.S., 2001. NF- κ B: a key role in inflammatory diseases. *The Journal of clinical investigation*, 107(1), pp.7–11.
- Takubo, K., 2011. The hypoxia regulatory system in hematopoietic stem cells. *Advances in hematopoietic stem cell research*.

- Tamura, M., Sato, M.M. & Nashimoto, M., 2011. Regulation of CXCL12 expression by canonical Wnt signaling in bone marrow stromal cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 43(5), pp.760–7.
- Tapia-Abellán, a. et al., 2014. Regulatory role of PI3K-protein kinase B on the release of interleukin-1 β in peritoneal macrophages from the ascites of cirrhotic patients. *Clinical & Experimental Immunology*, 178(3), pp.525–536.
- Tarnowski, M. et al., 2010. CXCR7: A new SDF-1-binding receptor in contrast to normal CD34+ progenitors is functional and is expressed at higher level in human malignant hematopoietic cells. *European Journal of Haematology*, 85(6), pp.472–483.
- Tesio, M. et al., 2013. Pten loss in the bone marrow leads to G-CSF-mediated HSC mobilization. *The Journal of experimental medicine*, 210(11), pp.2337–49.
- Till, E., McCulloch, E.A. & Siminovitch, L., 1963. A stochastic model of stem cell proliferation, based on the growth of spleen colony-forming cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 51, pp.29–36.
- Tjin, E.P.M. et al., 2006. Functional analysis of HGF/MET signaling and aberrant HGF-activator expression in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, 107(2), pp.760–8.
- Tokoyoda, K. et al., 2004. Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development. *Immunity*, 20(6), pp.707–18.
- Torossian, F. et al., 2014. CXCR7 participates in CXCL12-induced CD34+ cell cycling through b-arrestin-dependent Akt activation. , 123(2), pp.191–202.
- Tothova, Z. & Gilliland, D.G., 2007. FoxO Transcription Factors and Stem Cell Homeostasis: Insights from the Hematopoietic System. *Cell Stem Cell*, 1(2), pp.140–152.
- Tsai, C.-C. et al., 2011. Hypoxia inhibits senescence and maintains mesenchymal stem cell properties through down-regulation of E2A-p21 by HIF-TWIST. *Blood*, 117(2), pp.459–69.
- Tzeng, Y.-S. et al., 2011. Loss of Cxcl12/Sdf-1 in adult mice decreases the quiescent state of hematopoietic stem/progenitor cells and alters the pattern of hematopoietic regeneration after myelosuppression. *Blood*, 117(2), pp.429–39.
- Ueda, Y. et al., 2004. Inflammation controls B lymphopoiesis by regulating chemokine CXCL12 expression. *The Journal of experimental medicine*, 199(1), pp.47–58.
- Uto-Konomi, A. et al., 2013. CXCR7 agonists inhibit the function of CXCL12 by down-regulation of CXCR4. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 431(4), pp.772–776.
- Vadillo, E., Dorantes-acosta, E. & Pelayo, R., 2013. Regulation of hematopoietic stem / progenitor cell development by inflammation cues. In *Molecular Aspects of Inflammation*. pp. 71–87.
- Vagima, Y. et al., 2009. MT1-MMP and RECK are involved in human CD34+ progenitor cell retention, egress, and mobilization. *Journal of Clinical Investigation*, 119(3), pp.492–503.
- Vilchis-Ordoñez, A. et al., 2014. Bone marrow cells in acute lymphoblastic leukemia create a proinflammatory microenvironment influencing normal hematopoietic differentiation fates. *BioMed Research International*, p.Article ID 386165, in press.
- Wagegg, M. et al., 2012. Hypoxia promotes osteogenesis but suppresses adipogenesis of human mesenchymal stromal cells in a hypoxia-inducible factor-1 dependent manner. *PLoS one*, 7(9), p.e46483.
- Wang, R.-S., Saadatpour, A. & Albert, R., 2012. Boolean modeling in systems biology: an overview of methodology and applications. *Physical biology*, 9(055001), pp.1–14.
- Wang, T. et al., 2002. Cloning and functional characterisation of the interleukin-1 beta 1 promoter of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biochimica et biophysica acta*, 1575(1-3), pp.108–16.
- Wang, Z. et al., 2008. Blockade of SDF-1/CXCR4 signalling inhibits pancreatic cancer progression in vitro via inactivation of canonical Wnt pathway. *British journal of cancer*, 99(10), pp.1695–703.
- Wang, Z.J. et al., 2009. Lipopolysaccharides can protect mesenchymal stem cells (MSCs) from oxidative stress-induced apoptosis and enhance proliferation of MSCs via Toll-like receptor(TLR)-4 and PI3K/Akt. *Cell Biology International*, 33(6), pp.665–674.

- Williams, D.L. et al., 2004. Modulation of the phosphoinositide 3-kinase pathway alters innate resistance to polymicrobial sepsis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 172(1), pp.449–456.
- Winkler, I.G. et al., 2013. B-lymphopoiesis is stopped by mobilizing doses of G-CSF and is rescued by overexpression of the anti-apoptotic protein Bcl2. *Haematologica*, 98(3), pp.325–33.
- Wolkenhauer, O. & Mesarovic, M., 2005. Feedback dynamics and cell function: Why systems biology is called Systems Biology. *Molecular bioSystems*, 1(1), pp.14–6.
- Wu, M., Yang, X. & Chan, C., 2009. A dynamic analysis of IRS-PKR signaling in liver cells: A discrete modeling approach. *PloS one*, 4(12), p.e8040.
- Xu, J. et al., 2012. High density lipoprotein protects mesenchymal stem cells from oxidative stress-induced apoptosis via activation of the PI3K/Akt pathway and suppression of reactive oxygen species. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(12), pp.17104–17120.
- Yagisawa, M. et al., 1995. Stimulation and priming of human neutrophils by IL-1 alpha and IL-1 beta: complete inhibition by IL-1 receptor antagonist and no interaction with other cytokines. *Experimental hematology*, 23(7), pp.603–8.
- Yalcin, S. et al., 2008. Foxo3 is essential for the regulation of ataxia telangiectasia mutated and oxidative stress-mediated homeostasis of hematopoietic stem cells. *Journal of Biological Chemistry*, 283(37), pp.25692–25705.
- Yamazaki, S. et al., 2006. Cytokine signals modulated via lipid rafts mimic niche signals and induce hibernation in hematopoietic stem cells. *The EMBO journal*, 25(15), pp.3515–3523.
- Yang, J. et al., 2008. ERK promotes tumorigenesis by inhibiting FOXO3a via MDM2-mediated degradation. *Nature cell biology*, 10(2), pp.138–148.
- Yang, K. et al., 2010. Advanced glycation end products induce chemokine/cytokine production via activation of p38 pathway and inhibit proliferation and migration of bone marrow mesenchymal stem cells. *Cardiovascular diabetology*, 9(1), p.66.
- Yücel, R. et al., 2004. Gfi1: Green fluorescent protein knock-in mutant reveals differential expression and autoregulation of the growth factor independence 1 (Gfi1) gene during lymphocyte development. *The Journal of biological chemistry*, 279(39), pp.40906–17.
- Zeng, H. et al., 2004. Transcription factor Gfi1 regulates self-renewal and engraftment of hematopoietic stem cells. *The EMBO Journal*, 23(20), pp.4116–4125.
- Zepeda-Moreno, A. et al., 2012. Modeling SDF-1-induced mobilization in leukemia cell lines. *Experimental hematology*, 40(8), pp.666–74.
- Zhang, J. & Li, L., 2008. Stem cell niche: microenvironment and beyond. *The Journal of biological chemistry*, 283(15), pp.9499–503.
- Zhang, R. et al., 2008. Network model of survival signaling in large granular lymphocyte leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(42), pp.16308–16313.
- Zhang, Y. et al., 2015. Effects of Iron Overload on the Bone Marrow Microenvironment in Mice. *Plos One*, 10(3), p.e0120219.
- Zhou, S., 2011. TGF- β regulates β -catenin signaling and osteoblast differentiation in human mesenchymal stem cells. *Journal of cellular biochemistry*, 112(6), pp.1651–1660.
- Zhu, Z. et al., 2014. Lithium stimulates human bone marrow derived mesenchymal stem cell proliferation through GSK-3 β -dependent β -catenin/Wnt pathway activation. *FEBS Journal*, 281(23), pp.5371–5389.
- Zhuang, D. et al., 2006. Increased CCAAT enhancer-binding protein ?? (C/EBP??) expression and premature apoptosis in myeloid cells expressing Gfi-1 N382S mutant associated with severe congenital neutropenia. *Journal of Biological Chemistry*, 281(16), pp.10745–10751.

ANEXOS

Anexo 1. Artículo de revisión: Normal vs. Malignant hematopoiesis: the complexity of acute leukemia through systems biology.



Normal vs. Malignant hematopoiesis: the complexity of acute leukemia through systems biology

Jennifer Enciso^{1,2}, Luis Mendoza^{3†} and Rosana Pelayo^{1*†}

¹ Oncology Research Unit, Mexican Institute for Social Security, Mexico City, Mexico, ² Biochemistry Sciences Program, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico, ³ Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

Keywords: acute leukemia, early hematopoiesis, bone marrow, mathematical modeling, regulatory networks, systems biology

The Early Stages of Malignant Hematopoiesis: A Multi-cellular, Multi-compartment and Multi-factorial Challenging Study Model

OPEN ACCESS

Edited by:

Tim Wilhelm Nattkemper,
Bielefeld University, Germany

Reviewed by:

Xiaogang Wu,
Institute for Systems Biology, USA

Seth Corey,

Northwestern University, USA

Ingmar Glauche,

Technische Universität Dresden,
Germany

*Correspondence:

Rosana Pelayo,
rosanapelayo@gmail.com

[†]These authors have contributed
equally to this work.

Specialty section:

This article was submitted to
Bioinformatics and Computational
Biology,
a section of the journal
Frontiers in Genetics

Received: 12 May 2015

Accepted: 31 August 2015

Published: 11 September 2015

Citation:

Enciso J, Mendoza L and Pelayo R
(2015) Normal vs. Malignant
hematopoiesis: the complexity of
acute leukemia through systems
biology. *Front. Genet.* 6:290.
doi: 10.3389/fgene.2015.00290

Development of normal hematopoietic cells is an ordered multi-step process, tightly regulated by a complex network of intrinsic factors and microenvironmental cues that control cell fate decisions within the bone marrow (BM) (Pelayo et al., 2012; Purizaca et al., 2012; Boulais and Frenette, 2015). During malignant hematological disorders, including acute leukemias (AL), the uncontrolled differentiation of precursors of the lymphoid or myeloid series sustains tumor growth at the expense of normal blood cell production. Moreover, selection and dominance among leukemic clones occur while competing for niche resources and creating abnormal BM microenvironments that co-participate in the pathobiology of the disease (Colmone et al., 2008; Ayala et al., 2009; Purizaca et al., 2012; Kim et al., 2015; Vilchis-Ordoñez et al., 2015). Thus, due to the complexity and health impact of AL (Gupta et al., 2014), new strategies to better predict cell population dynamics according to genetics, microenvironmental and clinical heterogeneous contexts may contribute to understand its pathobiology and to guide strategies for decreasing overall mortality.

Mathematical modeling has emerged as a powerful tool in biomedical and health research because it enables the simulation of complex biological systems and the efficient generation of testable hypotheses. In recent years, leukemic cell dynamics has been addressed from the novel view of systems biology, resulting in helpful stochastic and deterministic models and providing clearer understanding of the disease by simplification of malignant clonal evolution processes (Vesely et al., 2011; Amir et al., 2013; Paguirigan et al., 2015). However, models fitted to experimental data must strike a balance between simplicity and reality, so that they can bring insights into clinical scenarios.

Here we discuss the importance and challenges of incorporating the BM microenvironment into AL modeling, as a key element that will control the interplay between cell populations and the selective pressure leading to leukemic or normal hematopoiesis progression. By developing integrative tools that better mimic and predict the behavior of heterogeneous and polyclonal cells in the context of abnormal microenvironments within leukemic bone marrow, we may learn about crucial mechanisms co-participating in the etiology and progression of the disease.

Normal vs. Leukemic Clones: Systems Biology in the Study of Acute Leukemia Complexity

Continuous dynamic modeling with differential equations (DEs) has been the most popular systems biology tool for the study of normal and leukemic hematopoiesis. This type of modeling is useful for the time evolving non-linear competition between normal and leukemic cell populations,

considering multiple compartments to simulate different maturation stages or multiclonal behavior (Catlin et al., 2005; Stiehl and Marciniak-Czochra, 2012; MacLean et al., 2013; Stiehl et al., 2014).

Of special interest, theoretical data suggests the existence of an initial “steady state” before the disease development, when co-existence of normal hematopoiesis with a limited number of pre-leukemic cells controls leukemia installation (Rubinow and Lebowitz, 1976; Stiehl and Marciniak-Czochra, 2012; Swaminathan et al., 2015). A sudden change in the homeostatic parameters may induce leukemic cell expansion leading to a progressive decrease of normal hematopoiesis, while perturbation of initial homeostatic state endows malignant cells with self-renewal and proliferation. Accordingly, the model by Rubinow and Lebowitz’s on competition advantage of leukemia cells proposed a higher value of their equilibrium number that refers to the maximum population size that can be supported within the niche. If the stop-expansion signal for malignant progenitors is not delivered before the equilibrium number is reached, a signal activating the slow-down of normal cells promotes the expansion of the leukemic population. High equilibrium numbers in leukemic compartments could be biologically interpreted as independence from the microenvironment, unbalanced proliferation/apoptosis rates, and further accumulation of blasts.

Using a stochastic model to simulate stem cell decisions, Abkowitz and colleagues have analyzed the behavior of individual components (HSC) acting collectively within a dynamical complex context (clonal diversity plus heterogeneous surrounding microenvironment). By tracking HSC replication, the expansion of the hematopoietic system was apparent from birth to adolescence, when steady-state levels are reached. Stochastic modeling of replication kinetics has shown to be useful to predict cell rebounding upon hematopoietic transplantation or under emerging conditions (Catlin et al., 2005, 2011). In contrast, agent-based deterministic modeling of HSC organization in health and hierarchical-related diseases, like chronic myeloid leukemia, are powerful for simulating additional heterogeneity scenarios to be considered, i.e., aging, HSC-niche interaction and therapy outcomes (Glauche et al., 2011). Unlike CML, AL cells show apparent dependence on their own “leukemic niche” (Veiga et al., 2006; Colmone et al., 2008; Basak et al., 2010; Jacamo et al., 2014). Recent models suggest additional feedback mechanisms assuming both, the leukemic and normal cell interdependence on the same growth factors (Stiehl et al., 2014).

In addition to the normal vs. leukemic competition, increasing evidence of genetic diversity supports the multiclonal evolution of AL (Choi et al., 2007; van Delft et al., 2011; Amir et al., 2013). Strikingly, rather than as a consequence of new acquired mutations, relapse could be explained as a deterministic clonal selection where high proliferative cells are eliminated by chemotherapy, while distinct slow-cycling or self-renewing cells stay protected and may re-emerge when the competing clones (leukemic high-proliferating cells) and their negative feedback (normal hematopoietic cells) have been eliminated. Similar to deterministic models of chemotherapy-dependent clonal selection, the stochastic modeling by Kimmel

and Corey drives to the conclusion on the co-existence of distinct clones and the extremely broad heterogeneity of cancer cells. However, the stochastic acquisition of mutations may provide theoretical evidence of the parallel evolving clones with unique proliferative potentials, and represent a suitable model for chronic chemotherapy-induced transition to secondary malignancy (Kimmel and Corey, 2013). Despite the fact that linear mutation structures can simplify the population dynamics, it is necessary to consider proliferation heterogeneity. Interestingly, the acquisition of *de novo* mutations is more probable during long treatment schemes (Lindsley et al., 2015).

Technological advances in RT-PCR, RNA-seq and mass cytometry methods for single cell analysis are providing highly specific clusterization of cell populations that allow the identification of experimentally unseen cell transition stages from the earliest steps of differentiation (Marco et al., 2014; Moignard et al., 2015). With new experimental models and molecular research progress, parameters and assumptions considered for the development of mathematical models, evolve to a more complex understanding of leukemogenesis. The view of two or more hematopoietic populations competing within compartments, plus the resulting regulation among compartments from the isolated feedback loops is too simplistic. Therefore, it is becoming of substantial importance to take into account additional intercellular interactions, including those with non-hematopoietic neighboring cells within the BM niches.

Modeling the Interplay Between Leukemia Cells and the Tumor Microenvironment

Tumor-microenvironment interplay is essential for the protection and progression of malignant cells, where a number of interactions mediated by integrins, cytokines and chemokines, extracellular matrix (ECM) proteins, and other molecules produced and expressed by niche cellular elements, may dictate the final fate decision (Raaijmakers, 2011). The recent multi-compartment model by Gerdes for T-cell lymphoma/leukemia, suggests that premalignant cells can get established in any available permissive niche, compensating their low affinity for specific interactions with an increased efficiency for resource utilization when compared to normal clones (Gerdes et al., 2013).

Closer to this multi-component interaction outlook has been the development of generic-cancer cell-automata models. This type of discrete modeling makes the evaluation of homogeneous or heterogeneous cell populations in a grid where every cell has a defined state and neighborhood possible. Strikingly, cell-automata modeling concede single-cell resolution and had become a very promising tool for the study of tissue development and tumors, including microenvironmental factors like ECM density and oxygen diffusion that control tumor size (Chen et al., 2014; Scott et al., 2014).

In spite of the power of these approaches, it is clear that the feedback existing between the BM microenvironmental components and the malignant cell decisions operates at a molecular level regulating intracellular pathways. How could we

mimic the complexity at cellular population and molecular levels at the same time? How could we address the multi-cellular system within systems complexity?

Simulation of One-cell Molecular Network Models with Multi-cellular Methods

Knowledge about the hematopoietic system has been benefited from the development of regulatory networks for early HSC differentiation, T lymphocyte development, plasticity and

signaling, among others (Albert and Wang, 2009; Naldi et al., 2010; Martínez-Sosa and Mendoza, 2013; Tian and Smith-Miles, 2014). Considering that every computational simulation with a specific initial state of an intracellular network represents a single cell dynamic profile, to simulate a multi-cellular process we must simultaneously simulate as many networks as cells within the system (Wu et al., 2009). Accordingly, Mendoza proposed a virtual culture of Th cells that simulate differentiation of naive CD4+ T cells to Th1, Th2, Th17, and Treg subsets. In this model, each cell phenotype is defined by molecular patterns of activation, while the input for each virtual cell at

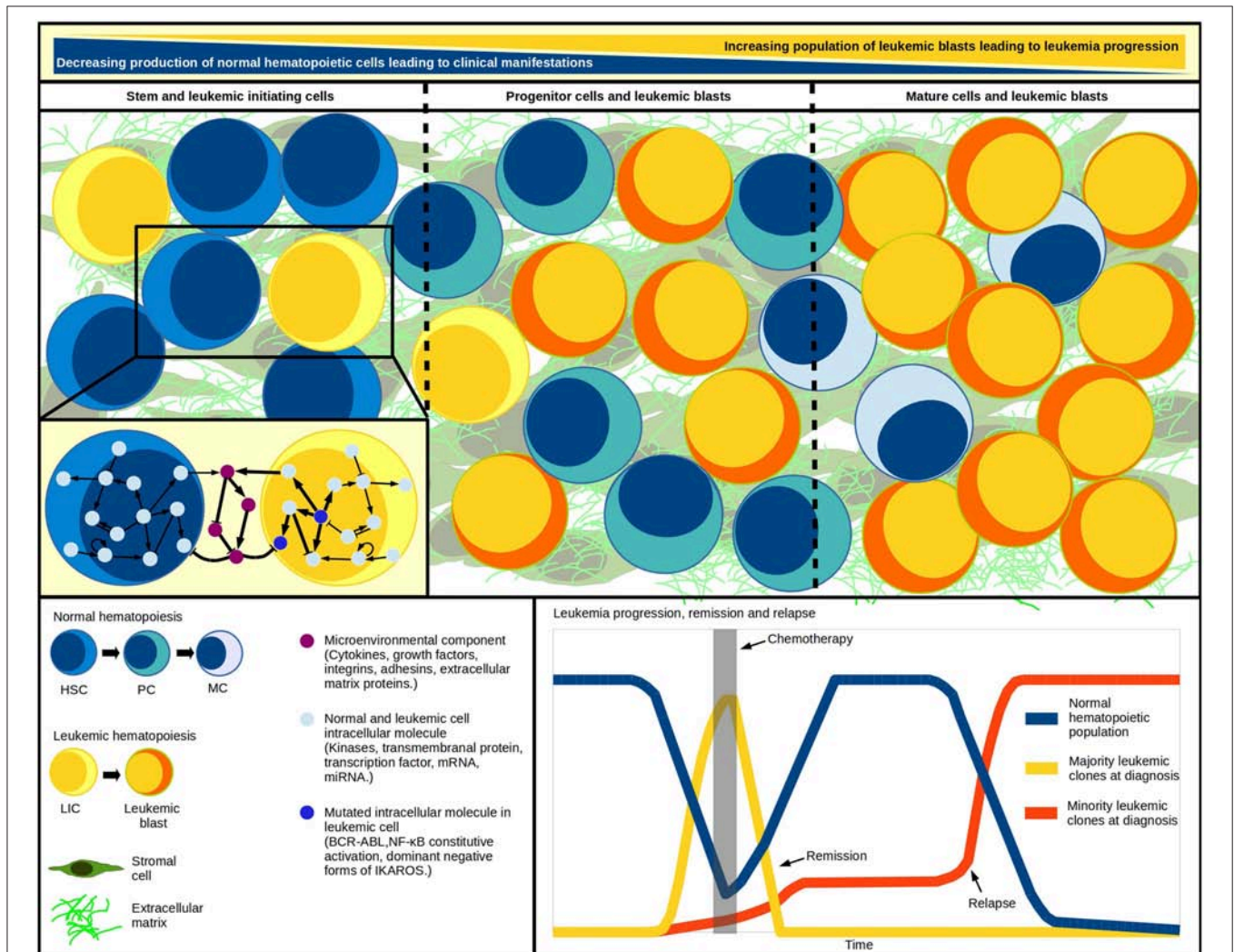


FIGURE 1 | Systems within a system. Leukemic initiation and progression is a tightly regulated competitive process, where at least three systems must work together: the normal hematopoietic differentiation, the leukemic cell production, and the hematopoietic microenvironment where malignant and normal cells competition takes place. As blast population increases, the normal cell abundance decreases. Cell population changes have been modeled through differential equations in multi-compartment continuous modeling, strategy that allows the representation of hematopoietic hierarchy with the assignation of different kinetic parameters values for cells within each compartment. The model mimics *in vivo* fundamental properties like quiescence in the stem-cells compartment and increasing proliferation in developing cells. Additional to regulatory feedback between normal and malignant hematopoietic populations, an abnormal microenvironment may play a crucial cooperating role in the inverse leukemic/normal relationship by disrupting the HSC-niche communication. The genetic diversity within the various leukemia-initiating cells and tumor cells highlights the multiclonal complexity of the disease, and suggests the existence of minor malignant clones—undetected at diagnosis—that become apparent upon chemotherapy and drive individuals to relapse. HSC, hematopoietic stem cell; HPC, hematopoietic progenitor cell; PC, precursor cell; MC, mature cell; LIC, leukemia initiating cell.

any time-step proceeds from the intercellular communication (Mendoza, 2013). More importantly, the dynamics of a given regulatory network respond to the concentration of regulatory cytokines produced by the cell itself and to neighbor signal intensities. Thus, applying tools like virtual cultures to malignant hematopoiesis may help to understand blast accumulation or the intercommunication between leukemia-initiating cells and an abnormal BM microenvironment (Figure 1). The recent demonstration of pro-inflammatory cytokines produced by ALL cells suggests that this condition may promote their own survival and account for the exhaustion of normal progenitor cells (Vilchis-Ordoñez et al., 2015). The pathological consequences of a pro-inflammatory microenvironment can be resumed in three potential principles: (a) leukemic cells showing aberrant expression of cytokines that perturb normal hematopoiesis, (b) mutated stromal cells favoring a permissive microenvironment for leukemia initiation, progression, and maintenance (Shalpour et al., 2010), or (c) normal hematopoietic cells responding to biological stress due to blast overcrowding by activating pro-inflammatory pathways. These three scenarios might act independently or synergistically by means of positive feedback.

To solve this, hybrid models are also mathematical tools with great potential to model microenvironment-dependent systems, allowing the scaling to tridimensional modeling and the consideration of discrete decisions on cell processes like migration and proliferation (Anderson, 2005; Scott et al., 2014). Although these dedicated models have considered microenvironmental factors for solid tumor progression, they still miss the direct feedback existing between extracellular factors and the intra-cellular signaling pathways that regulate cell fate decisions. Of note, an intracellular view would allow modeling of constitutive or null activation of specific pathway mediators and analyzing the putative consequent effects on disease dynamics. Virtual cultures make this possible, but the very high computational requirements when modeling excessive number of cells may represent by now a weakness of the strategy.

For any of the discussed modeling approaches, the importance of a rigorous experimental validation of mathematical modeling for complex processes is high and has been limited by

the experimental systems that are conventionally used to study human leukemogenesis. The combination of single-cell sequencing, 3-D organoid-like cultures and xenotransplantation would provide new information for malignant vs. normal cell discrimination and cell population dynamics within more natural microenvironmental structures. Furthermore, a proper validation of current and future investigations from the view of systems biology will benefit from longitudinal, prospective clinical studies.

To this extent, the use of “edge-technology” *in silico* strategies for multi-cellular (leukemic, hematopoietic, and stromal components), multi-compartment (differentiation stages), and agent-based (individual cells network) modeling of leukemia pathobiology is a promising tool for the study of feedback pathways in the searching of auxiliary strategies for leukemia treatment, normal hematopoiesis rebounding, and relapse delay. The construction of novel “systems within a system” integrative theoretical models (Figure 1) that better mimic and predict the behavior of the disease may transform our vision of malignant hematopoiesis and provide helpful platforms for new testable hypotheses.

Author Contributions

JE: Analysis of published data, discussion of the topic-related information, drafting, and writing the paper. LM and RP: Conception and design of the Opinion Article, analysis of published data, discussion of the related information, drafting, and writing the paper. Critical review of the intellectual content.

Acknowledgments

Our work is supported by the National Council of Science and Technology (CONACyT, Grant CB-2010-01-152695 to RP), the Mexican Institute for Social Security (IMSS, Grants FIS/IMSS/PROT/G13/1229, and FIS/IMSS/PROT/G14/1289 to RP), and Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM, Grant UNAM-DGAPA-PAPIIT IN200514 to LM). JE was awarded by the PRODESI-IMSS Program and is scholarship holder from CONACyT and IMSS.

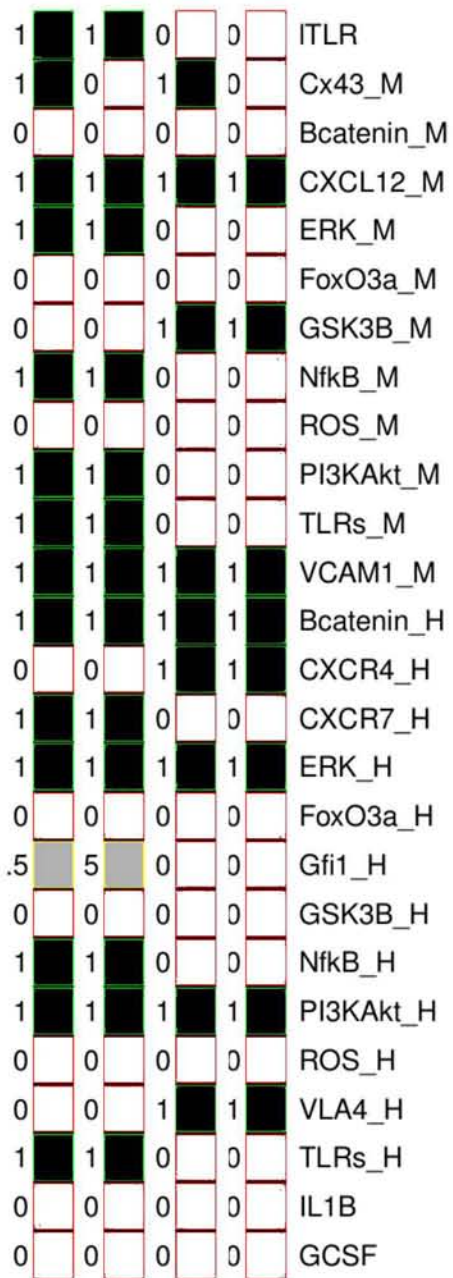
References

- Amir, el-A. D., Davis, K. L., Tadmor, M. D., Simonds, E. F., Levine, J. H., Bendall, S. C., et al. (2013). viSNE enables visualization of high dimensional single-cell data and reveals phenotypic heterogeneity of leukemia. *Nat. Biotechnol.* 31, 545–552. doi: 10.1038/nbt.2594
- Albert, R., and Wang, R. S. (2009). Discrete dynamic modeling of cellular signaling networks. *Methods Enzymol.* 467, 281–306. doi: 10.1016/S0076-6879(09)67011-7
- Anderson, A. R. (2005). A hybrid mathematical model for solid tumour invasion: the importance of cell adhesion. *Math. Med. Biol.* 22, 163–186. doi: 10.1093/imammb/dqi005
- Ayala, F., Dewar, R., Kieran, M., and Kalluri, R. (2009). Contribution of bone microenvironment to leukemogenesis and leukemia progression. *Leukemia* 23, 2233–2241. doi: 10.1038/leu.2009.175
- Basak, P., Chatterjee, S., Das, P., Das, M., Pereira, J. A., Dutta, R. K., et al. (2010). Leukemic stromal hematopoietic microenvironment negatively regulates the normal hematopoiesis in mouse model of leukemia. *Chin. J. Cancer.* 29, 969–979. doi: 10.5732/cjc.010.10431
- Boulais, P. E., and Frenette, P. S. (2015). Making sense of hematopoietic stem cell niches. *Blood* 125, 2621–2629. doi: 10.1182/blood-2014-09-570192
- Catlin, S. N., Busque, L., Gale, R. E., Guttorp, P., and Abkowitz, J. L. (2011). The replication rate of human hematopoietic stem cells *in vivo*. *Blood* 117, 4460–4466. doi: 10.1182/blood-2010-08-303537
- Catlin, S. N., Guttorp, P., and Abkowitz, J. L. (2005). The kinetics of clonal dominance in myeloproliferative disorders. *Blood* 106, 2688–2692. doi: 10.1182/blood-2005-03-1240
- Chen, D., Jiao, Y., and Torquato, S. (2014). A cellular automaton model for tumor dormancy: emergence of a proliferative switch. *PLoS ONE* 9:e109934. doi: 10.1371/journal.pone.0109934
- Choi, S., Henderson, M. J., Kwan, E., Beesley, A. H., Sutton, R., Bahar, A. Y., et al. (2007). Relapse in children with acute lymphoblastic leukemia involving selection of a preexisting drug-resistant subclone. *Blood* 110, 632–639. doi: 10.1182/blood-2007-01-067785

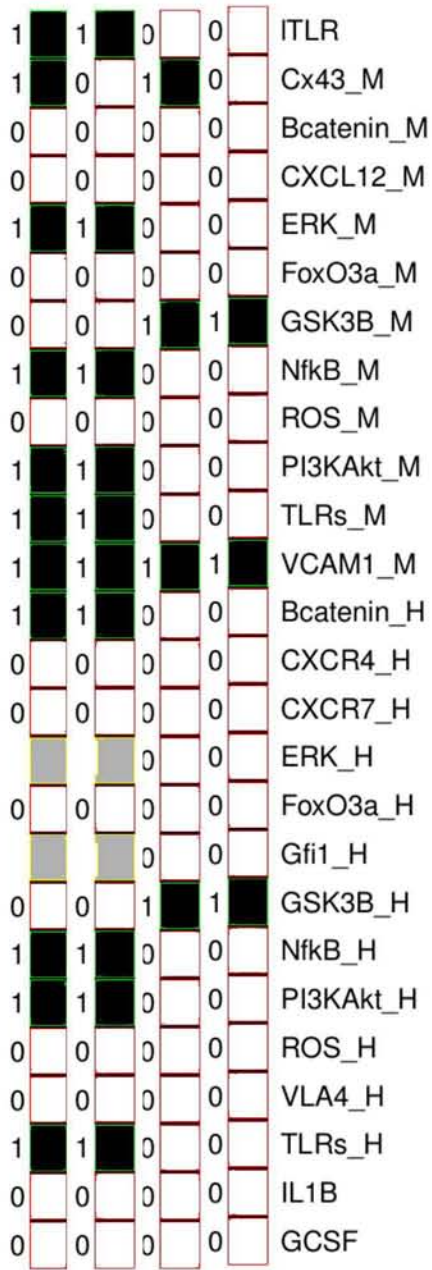
- Colmone, A., Amorim, M., Pontier, A. L., Wang, S., Jablonski, E., and Sipkins, D. A. (2008). Leukemic cells create bone marrow niches that disrupt the behavior of normal hematopoietic progenitor cells. *Science* 322, 1861–1865. doi: 10.1126/science.1164390
- Gerdes, S., Newrzela, S., Glauche, I., von Laer, D., Hansmann, M. L., and Roeder, I. (2013). Mathematical modeling of oncogenesis control in mature T-cell populations. *Front. Immunol.* 4:380. doi: 10.3389/fimmu.2013.00380
- Glauche, I., Thielecke, L., and Roeder, I. (2011). Cellular aging leads to functional heterogeneity of hematopoietic stem cell: a modelling perspective. *Aging Cell* 10, 457–465. doi: 10.1111/j.1474-9726.2011.00692.x
- Gupta, S., Rivera-Luna, R., Ribeiro, R. C., and Howard, S. C. (2014). Pediatric oncology as the next global child health priority: the need for national childhood cancer strategies in low- and middle-income countries. *PLoS Med.* 11:e1001656. doi: 10.1371/journal.pmed.1001656
- Jacamo, R., Chen, Y., Wang, Z., Ma, W., Zhang, M., Spaeth, E. L., et al. (2014). Reciprocal leukemia-stroma VCAM-1/VLA-4-dependent activation of NF- κ B mediates chemoresistance. *Blood* 123, 2691–2702. doi: 10.1182/blood-2013-06-511527
- Kim, J. A., Shim, J. S., Lee, G. Y., Yim, H. W., Kim, T. M., Kim, M., et al. (2015). Microenvironmental remodeling as a parameter and prognostic factor of heterogeneous leukemogenesis in acute myelogenous leukemia. *Cancer Res.* 75, 2222–2231. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3379
- Kimmel, M., and Corey, S. (2013). Stochastic hypothesis of transition from inborn neutropenia to AML: interactions of cell population dynamics and population genetics. *Front. Oncol.* 3:89. doi: 10.3389/fonc.2013.00089
- Lindsley, R. C., Mar, B. G., Mazzola, E., Grauman, P. V., Shareef, S., Allen, S. L., et al. (2015). Acute myeloid leukemia ontogeny is defined by distinct somatic mutations. *Blood* 125, 1367–1376. doi: 10.1182/blood-2014-11-610543
- MacLean, A. L., Lo Celso, C., and Stumpf, M. P. (2013). Population dynamics of normal and leukaemia stem cells in the haematopoietic stem cell niche show distinct regimes where leukaemia will be controlled. *J. R. Soc. Interface* 10:20120968. doi: 10.1098/rsif.2012.0968
- Marco, E., Karp, R. L., Guo, G., Robson, P., Hart, A. H., Trippa, L., et al. (2014). Bifurcation analysis of single-cell gene expression data reveals epigenetic landscape. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, E5643–E5650. doi: 10.1073/pnas.1408993111
- Martínez-Sosa, P., and Mendoza, L. (2013). The regulatory network that controls the differentiation of T lymphocytes. *BioSystems* 113, 96–103. doi: 10.1016/j.biosystems.2013.05.007
- Mendoza, L. (2013). A virtual culture of CD4+ T lymphocytes. *Bull. Math. Biol.* 75, 1012–1029. doi: 10.1007/s11538-013-9814-9
- Moignard, V., Woodhouse, S., Haghverdi, L., Lilly, A. J., Tanaka, Y., Wilkinson, A. C., et al. (2015). Decoding the regulatory network of early blood development from single-cell gene expression measurements. *Nat. Biotechnol.* 33, 269–276. doi: 10.1038/nbt.3154
- Naldi, A., Carneiro, J., Chaouiya, C., and Thieffry, D. (2010). Diversity and plasticity of Th cell types predicted from regulatory network modelling. *PLoS Comput. Biol.* 6:e1000912. doi: 10.1371/journal.pcbi.1000912
- Paguirigan, A. L., Smith, J., Meshinchi, S., Carroll, M., Maley, C., and Radich, J. P. (2015). Single-cell genotyping demonstrates complex clonal diversity in acute myeloid leukemia. *Sci. Transl. Med.* 7:281re2. doi: 10.1126/scitranslmed.aaa0763
- Pelayo, R., Dorantes-acosta, E., Vadillo, E., and Fuentes-pananá, E. (2012). “From HSC to B-lymphoid cells in normal and malignant hematopoiesis,” in *Advances in Hematopoietic Stem Cell Research*, ed R. Pelayo (Croatia: InTech), 277–298.
- Purizaca, J., Meza, I., and Pelayo, R. (2012). Early lymphoid development and microenvironmental cues in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Arch. Med. Res.* 43, 89–101. doi: 10.1016/j.armed.2012.03.005
- Raaijmakers, M. H. (2011). Niche contributions to oncogenesis: emerging concepts and implications for the hematopoietic system. *Haematologica* 96, 1041–1048. doi: 10.3324/haematol.2010.028035
- Rubinow, S. I., and Lebowitz, J. L. (1976). A mathematical model of the acute myeloblastic leukemic state in man. *Biophys. J.* 16, 897–910. doi: 10.1016/S0006-3495(76)85740-2
- Scott, J. G., Hjelmeland, A. B., Chinnaiyan, P., Anderson, A. R., and Basanta, D. (2014). Microenvironmental variables must influence intrinsic phenotypic parameters of cancer stem cells to affect tumourigenicity. *PLoS Comput. Biol.* 10:e1003433. doi: 10.1371/journal.pcbi.1003433
- Shalpour, S., Eckert, C., Seeger, K., Pfau, M., Prada, J., Henze, G., et al. (2010). Leukemia-associated genetic aberrations in mesenchymal stem cells of children with acute lymphoblastic leukemia. *J. Mol. Med.* 88, 249–265. doi: 10.1007/s00109-009-0583-8
- Stiehl, T., Baran, N., Ho, A. D., and Marciniak-Czochra, A. (2014). Clonal selection and therapy resistance in acute leukaemias: mathematical modelling explains different proliferation patterns at diagnosis and relapse. *J. R. Soc. Interface* 11:20140079. doi: 10.1098/rsif.2014.0079
- Stiehl, T., and Marciniak-Czochra, A. (2012). Mathematical modeling of leukemogenesis and cancer stem cell dynamics. *Math. Model. Nat. Phenomena* 7, 166–202. doi: 10.1051/mmnp/20127199
- Swaminathan, S., Klemm, L., Park, E., Papaemmanuil, E., Ford, A., Kweon, S. M., et al. (2015). Mechanisms of clonal evolution in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Immunol.* 16, 766–774. doi: 10.1038/ni.3160
- Tian, T., and Smith-Miles, K. (2014). Mathematical modeling of GATA-switching for regulating the differentiation of hematopoietic stem cell. *BMC Syst. Biol.* 8(Suppl. 1):S8. doi: 10.1186/1752-0509-8-S1-S8
- van Delft, F. W., Horsley, S., Colman, S., Anderson, K., Bateman, C., Kempski, H., et al. (2011). Clonal origins of relapse in ETV6-RUNX1 acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 117, 6247–6254. doi: 10.1182/blood-2010-10-314674
- Veiga, J. P., Costa, L. F., Sallan, S. E., Nadler, L. M., and Cardoso, A. A. (2006). Leukemia-stimulated bone marrow endothelium promotes leukemia cell survival. *Exp. Hematol.* 34, 610–621. doi: 10.1016/j.exphem.2006.01.013
- Vesely, M. D., Kershaw, M. H., Schreiber, R. D., and Smyth, M. J. (2011). Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu. Rev. Immunol.* 29, 235–271. doi: 10.1146/annurev-immunol-031210-101324
- Vilchis-Ordoñez, A., Contreras-Quiroz, A., Vadillo, E., Dorantes-Acosta, E., Reyes-López, A., Quintela-Nuñez del Prado, H. M., et al. (2015). Bone marrow cells in acute lymphoblastic leukemia create a proinflammatory microenvironment influencing normal hematopoietic differentiation fates. *Biomed Res. Int.* 2015:386165. doi: 10.1155/2015/386165
- Wu, M., Yang, X., and Chan, C. (2009). A dynamic analysis of IRS-PKR signaling in liver cells: a discrete modeling approach. *PLoS ONE* 4:e8040. doi: 10.1371/journal.pone.0008040

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

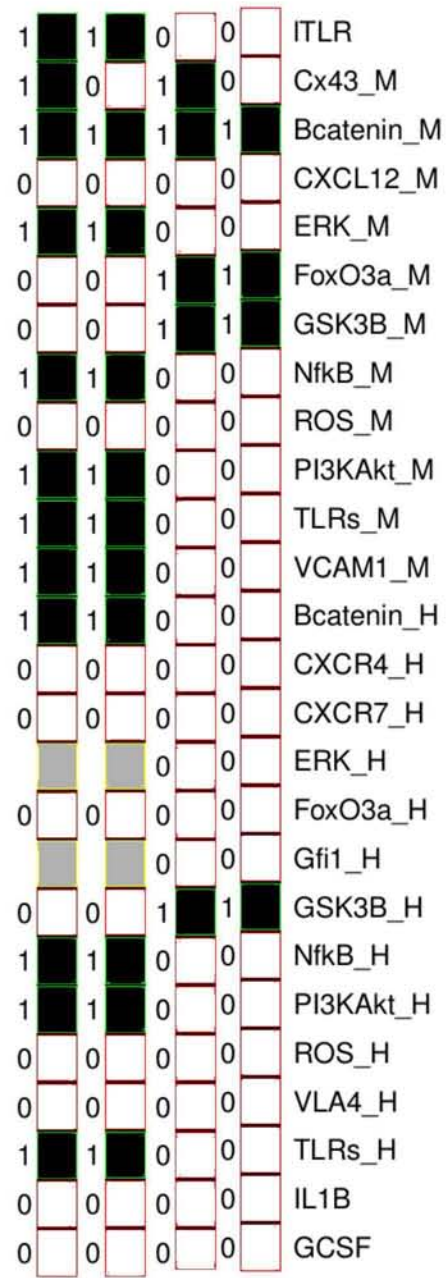
Copyright © 2015 Enciso, Mendoza and Pelayo. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



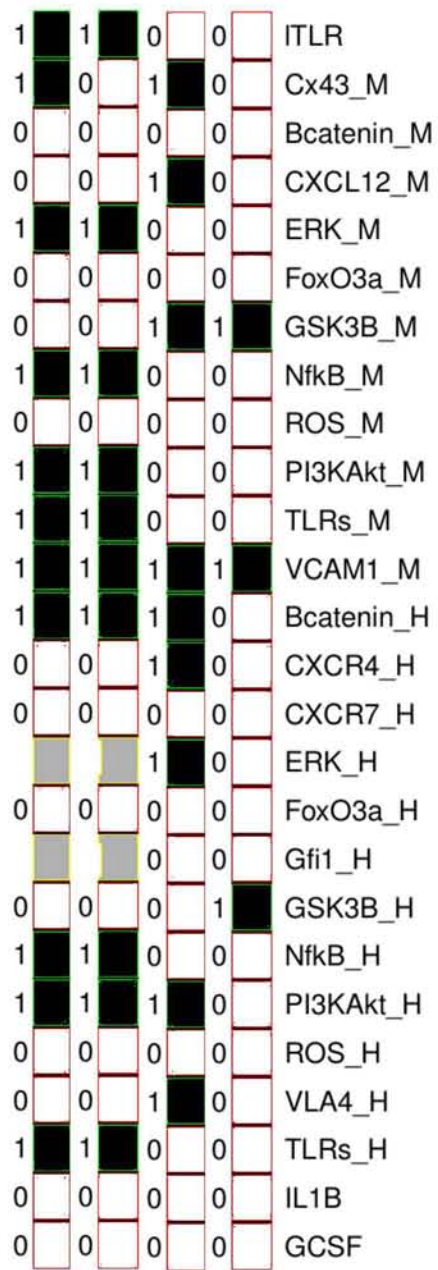
CXCL12 = 1



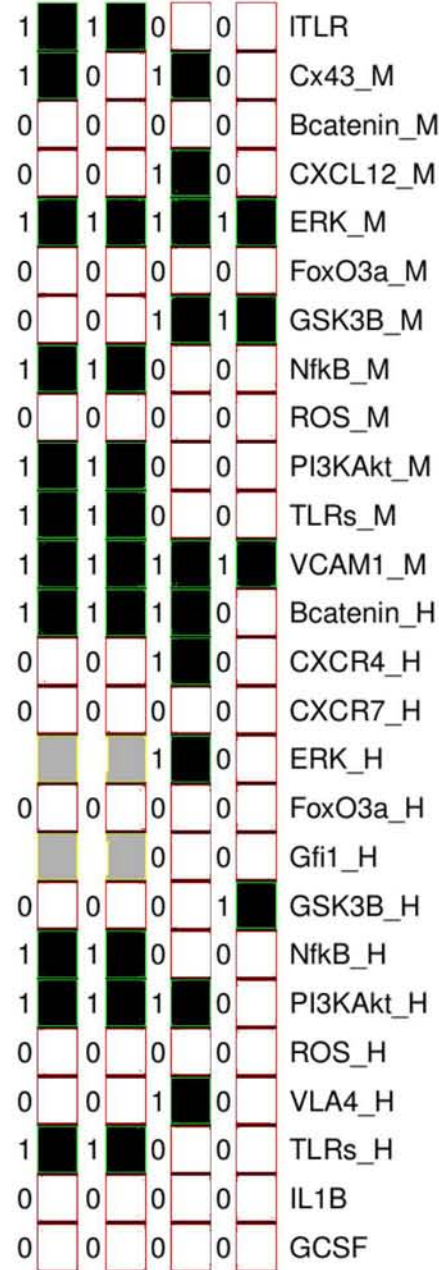
CXCL12 = 0



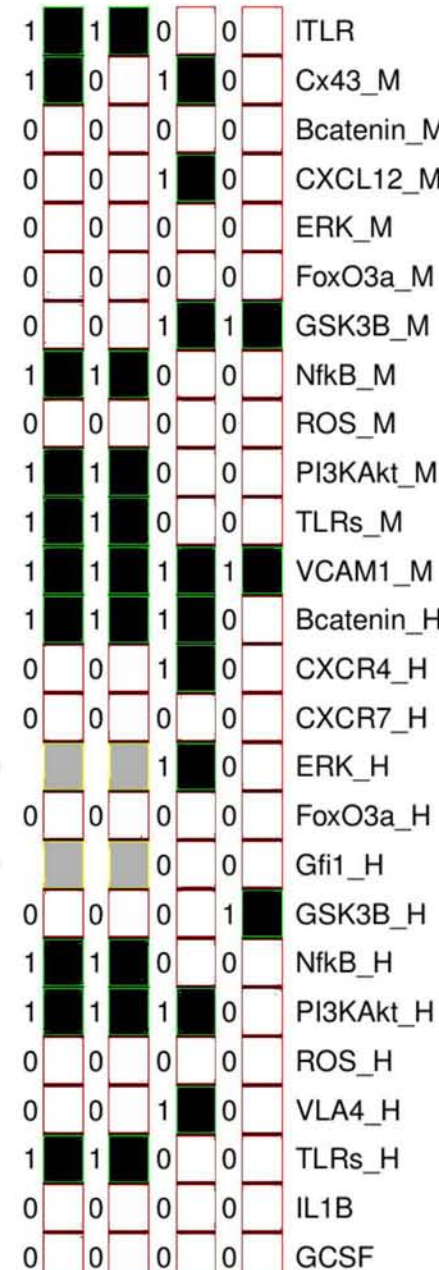
Bcatenin_M = 1



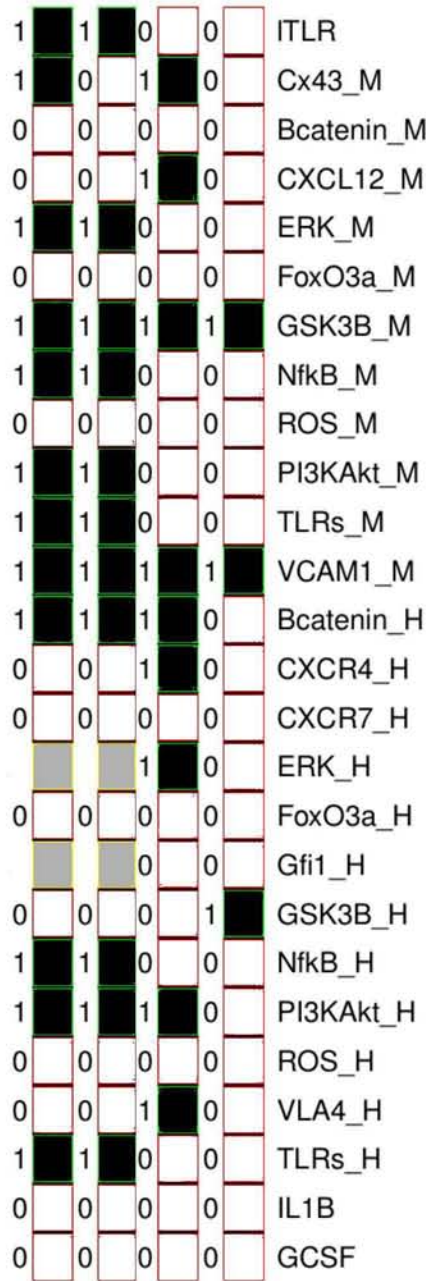
FoxO3a_M = 0



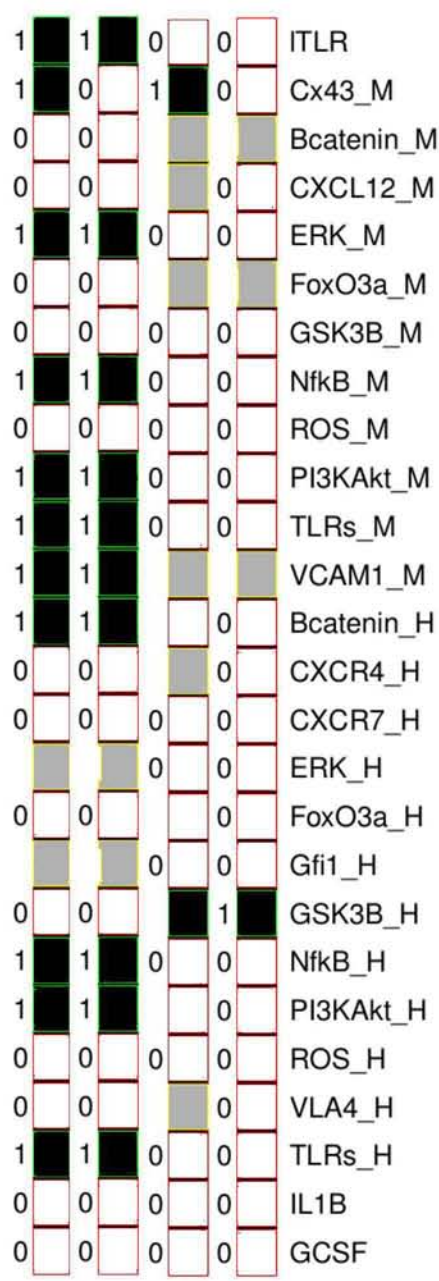
ERK_M = 1



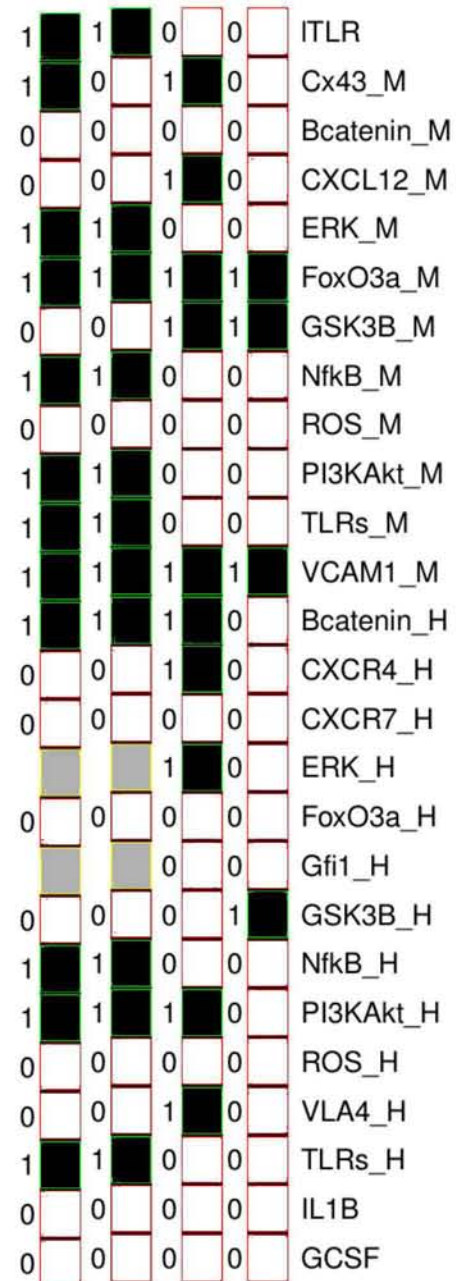
ERK_M = 0



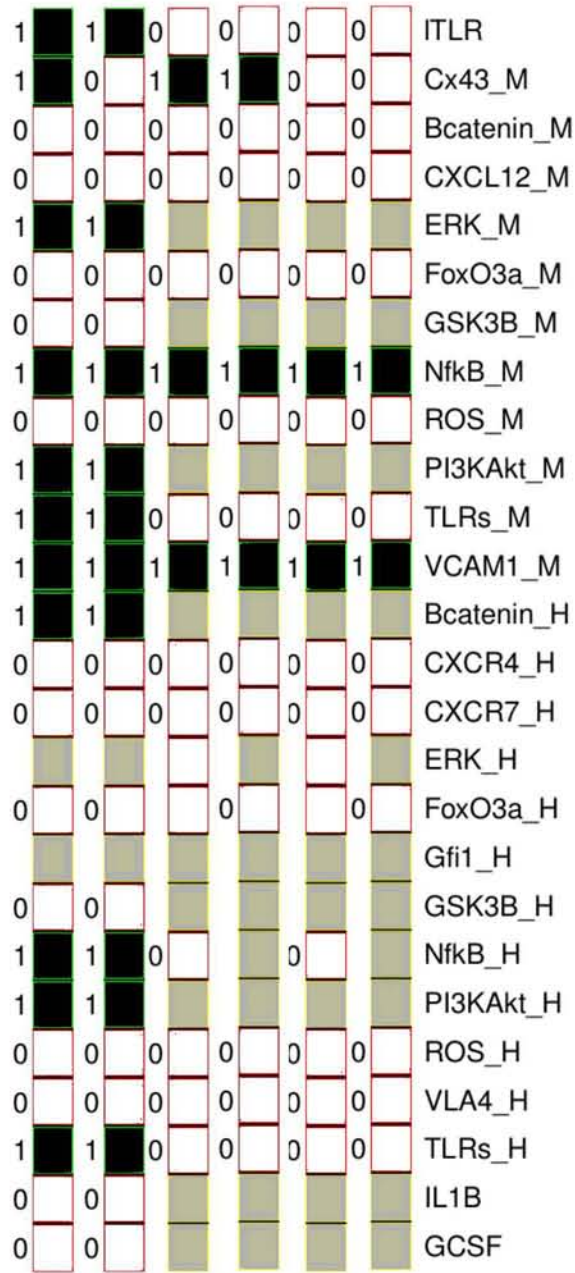
GSK3B_M = 1



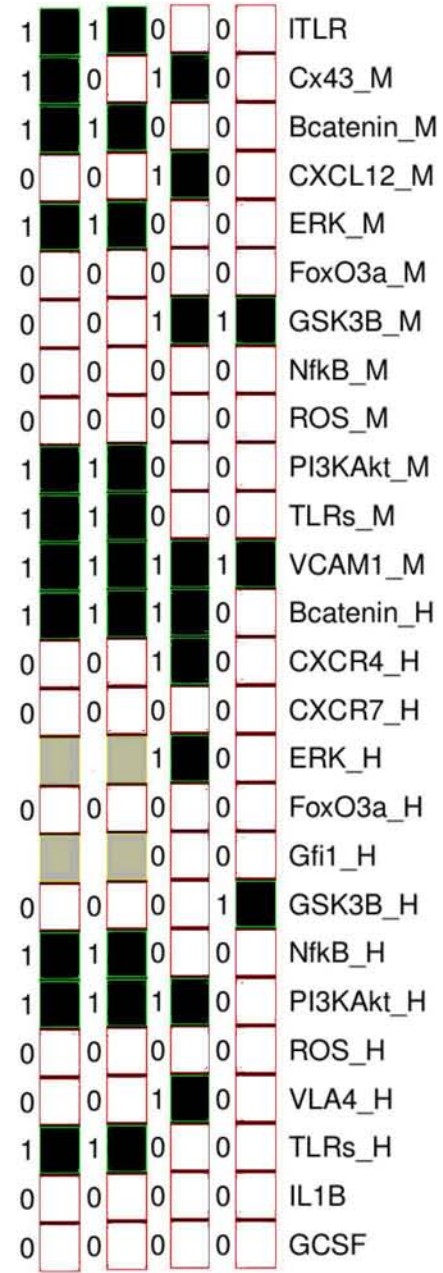
GSK3B_M = 0



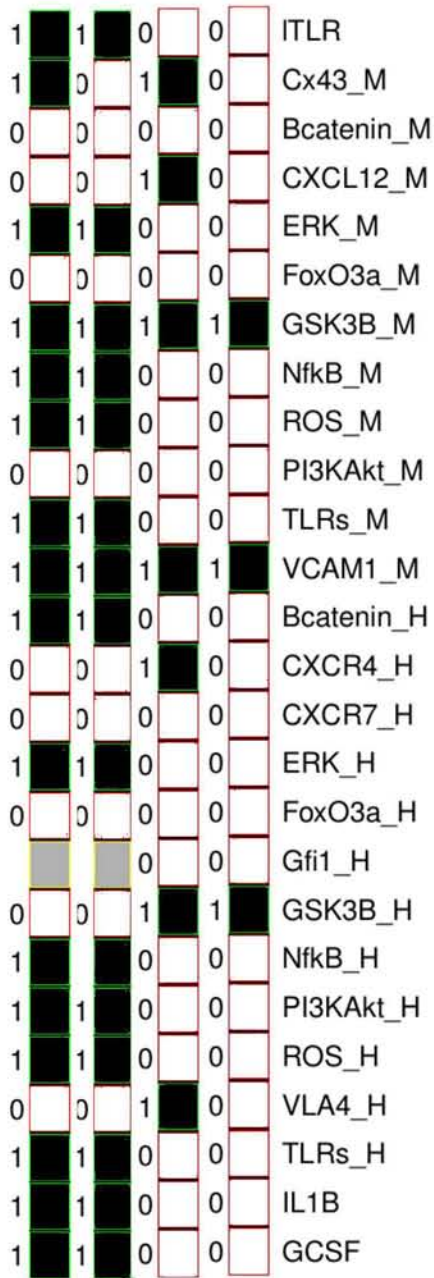
FoxO3a_M = 1



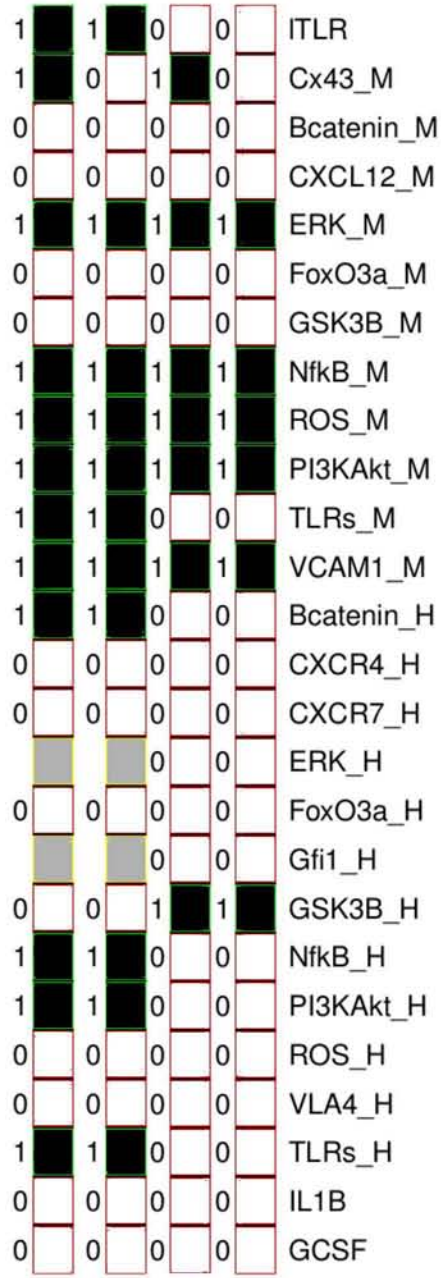
NfκB_M = 1 (Simulación síncrona)



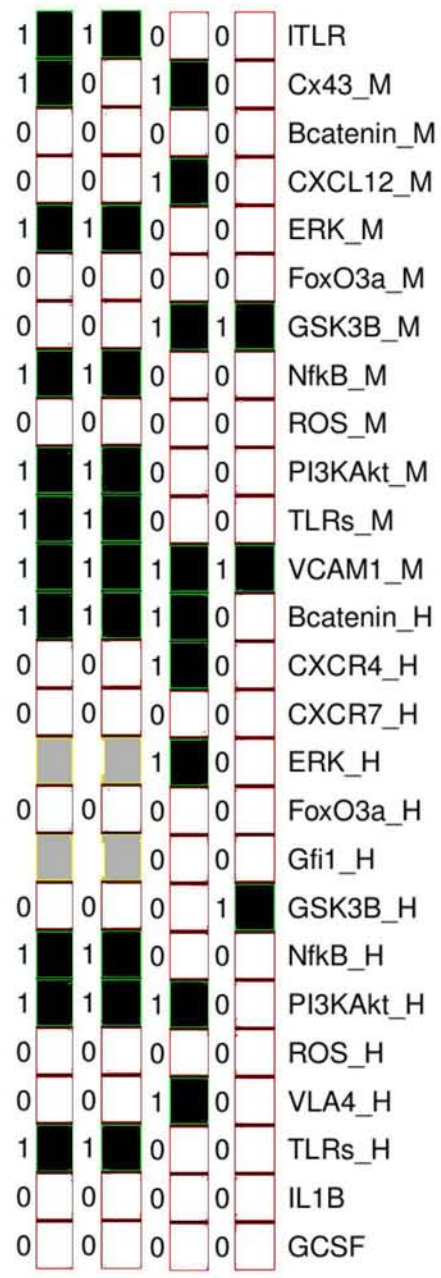
NfκB_M = 0



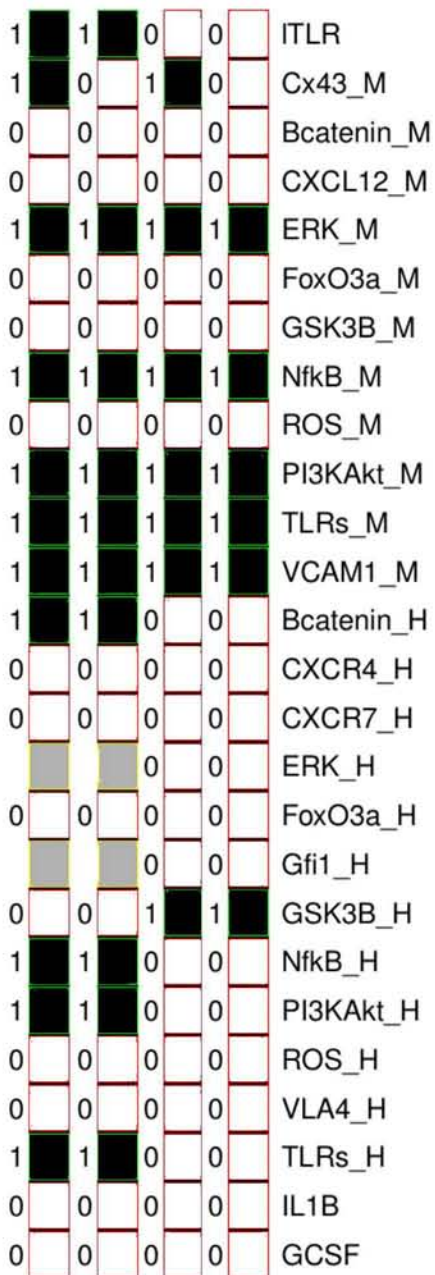
PI3KAkt_M = 0



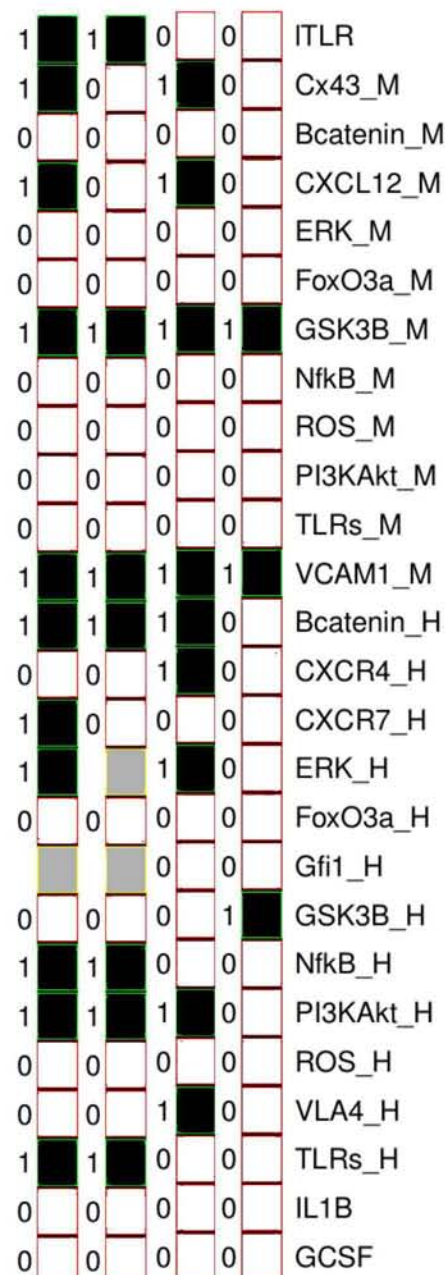
ROS_M = 1



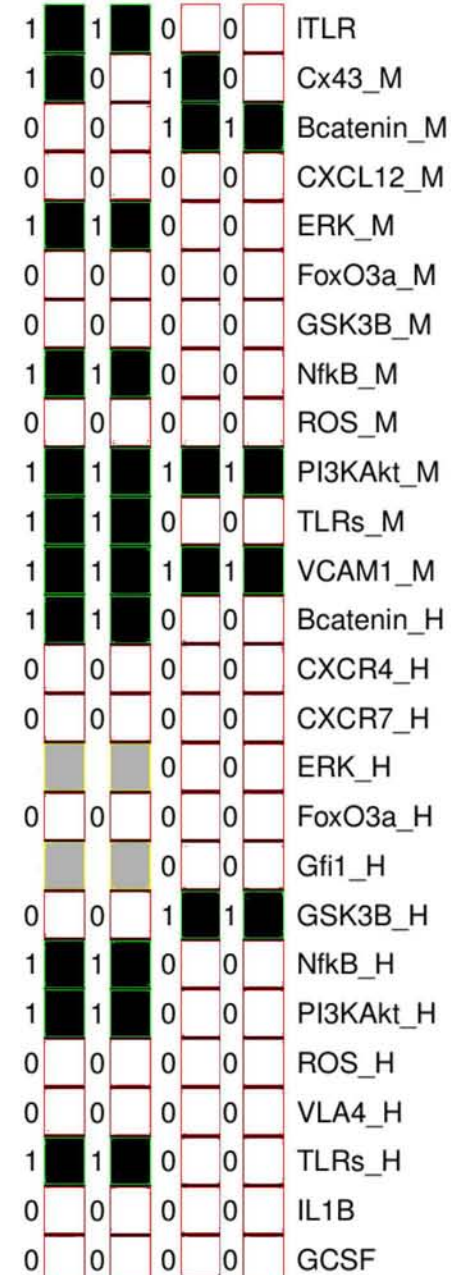
ROS_M = 0



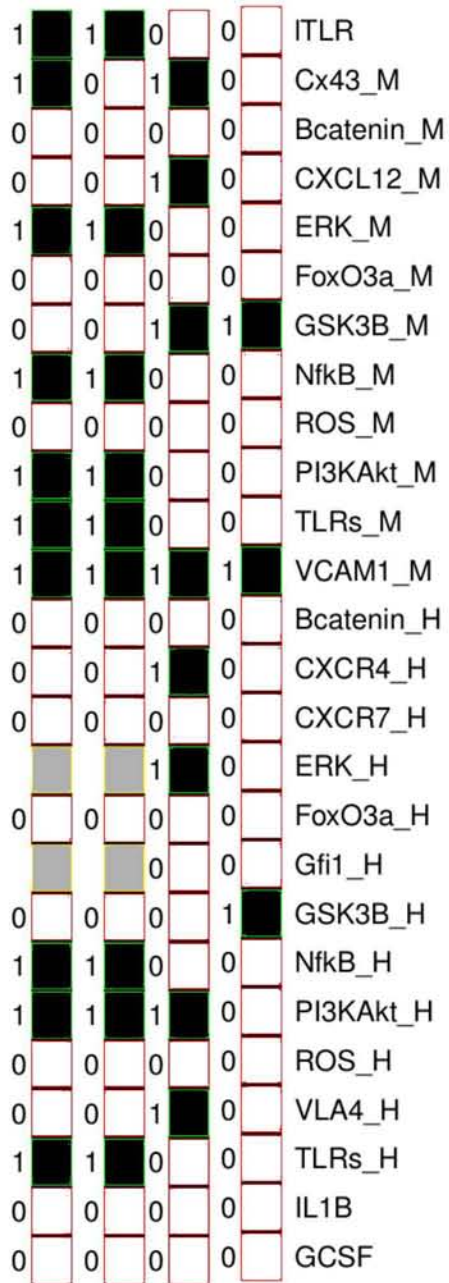
TLRs_M = 1



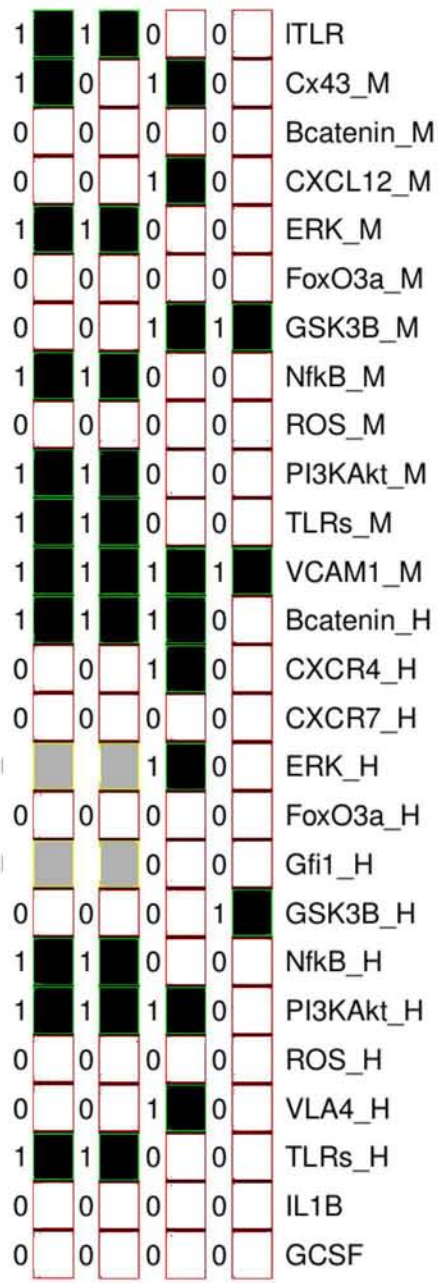
TLRs_M = 0



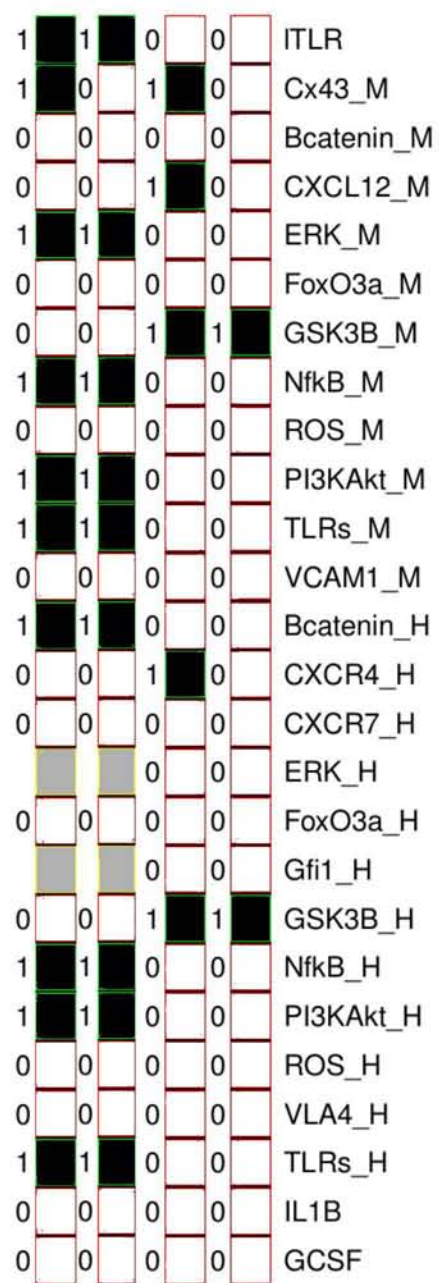
PI3KAkt_M = 1



Bcatenin_H = 0



VCAM1_M = 1



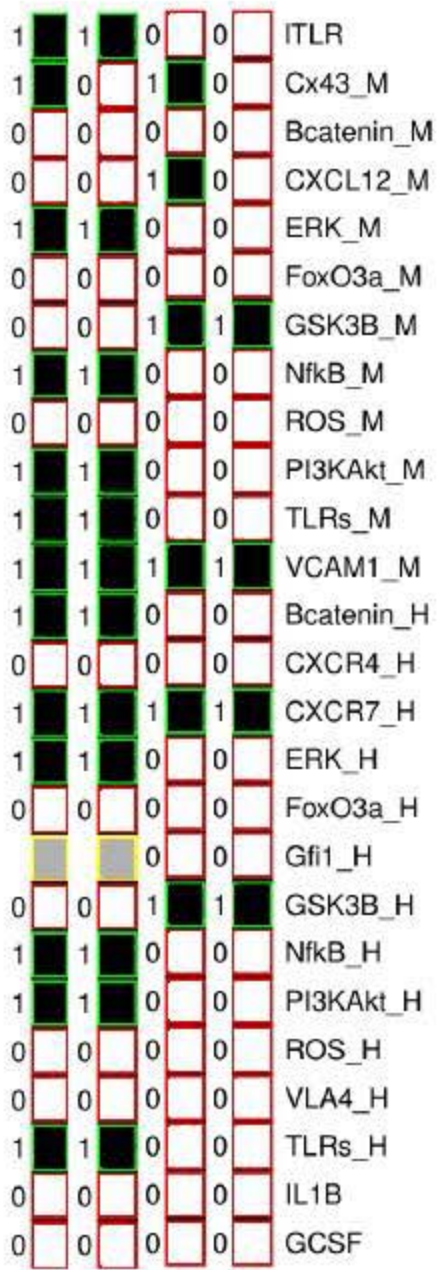
VCAM1_M = 0

1	1	0	0	ITLR
1	0	1	0	Cx43_M
0	0	0	0	Bcatenin_M
0	0	1	0	CXCL12_M
1	1	0	0	ERK_M
0	0	0	0	FoxO3a_M
0	0	1	1	GSK3B_M
1	1	0	0	NfkB_M
0	0	0	0	ROS_M
1	1	0	0	PI3KAkt_M
1	1	0	0	TLRs_M
1	1	1	1	VCAM1_M
1	1	0	0	Bcatenin_H
0	0	0	0	CXCR4_H
0	0	0	0	CXCR7_H
				ERK_H
0	0	0	0	FoxO3a_H
				Gfi1_H
0	0	1	1	GSK3B_H
1	1	0	0	NfkB_H
1	1	0	0	PI3KAkt_H
0	0	0	0	ROS_H
0	0	0	0	VLA4_H
1	1	0	0	TLRs_H
0	0	0	0	IL1B
0	0	0	0	GCSF

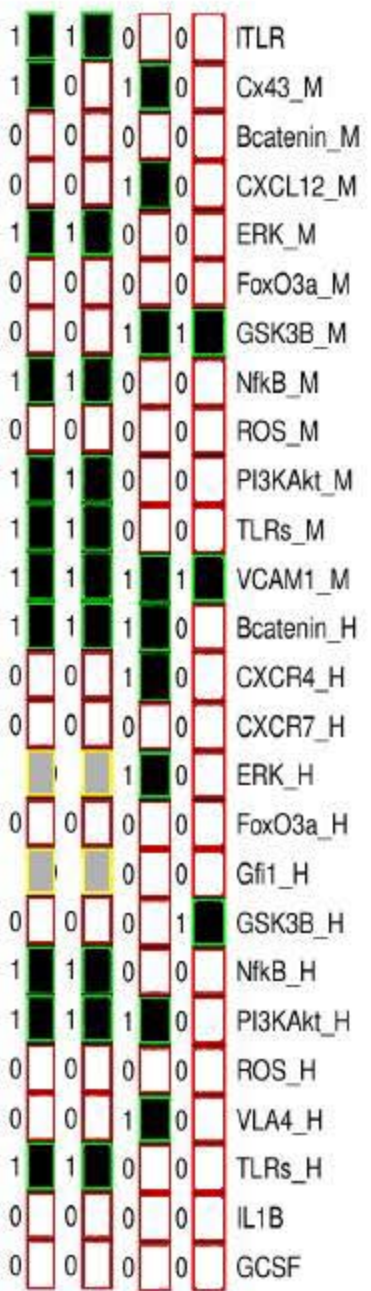
CXCR4 = 0

1	1	1	1	0	0	0	ITLR
1	1	0	0	1	1	0	Cx43_M
0	0	0	0	0	0	0	Bcatenin_M
0	0	0	0	1	1	0	CXCL12_M
1	1	1	1	0	0	0	ERK_M
0	0	0	0	0	0	0	FoxO3a_M
0	0	0	0	1	1	1	GSK3B_M
1	1	1	1	0	0	0	NfkB_M
0	0	0	0	0	0	0	ROS_M
1	1	1	1	0	0	0	PI3KAkt_M
1	1	1	1	0	0	0	TLRs_M
1	1	1	1	1	1	1	VCAM1_M
1	1	1	1	1	1	1	Bcatenin_H
0	0	0	0	1	1	0	CXCR4_H
0	0	0	0	0	0	0	CXCR7_H
							ERK_H
0	1	0	1	1	0	1	FoxO3a_H
							Gfi1_H
0	1	0	1	1	0	1	GSK3B_H
1	0	1	0	0	0	0	NfkB_H
1	0	1	0	0	1	0	PI3KAkt_H
0	0	0	0	0	0	0	ROS_H
0	0	0	0	1	1	0	VLA4_H
1	1	1	1	0	0	0	TLRs_H
0	0	0	0	0	0	0	IL1B
0	0	0	0	0	0	0	GCSF

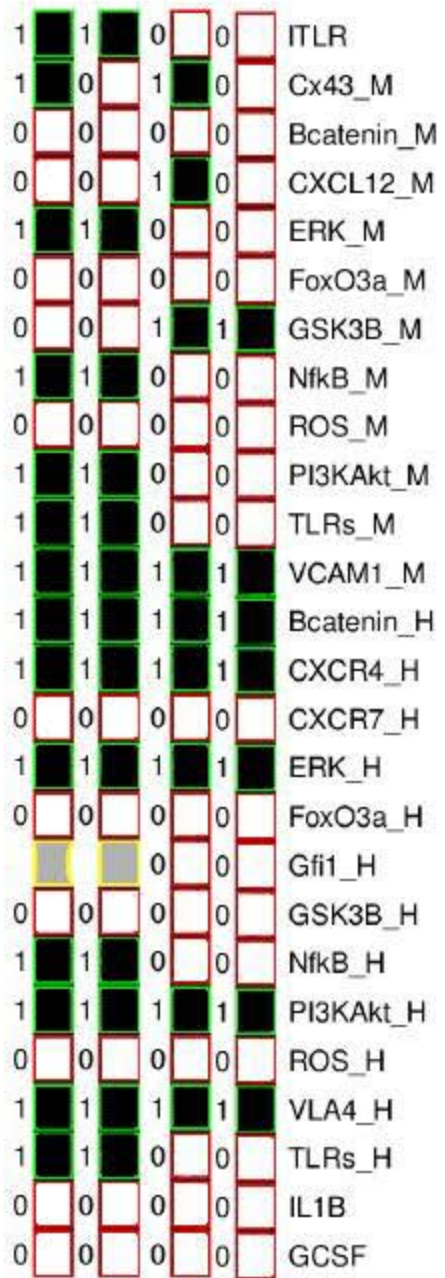
Bcatenin_H = 1



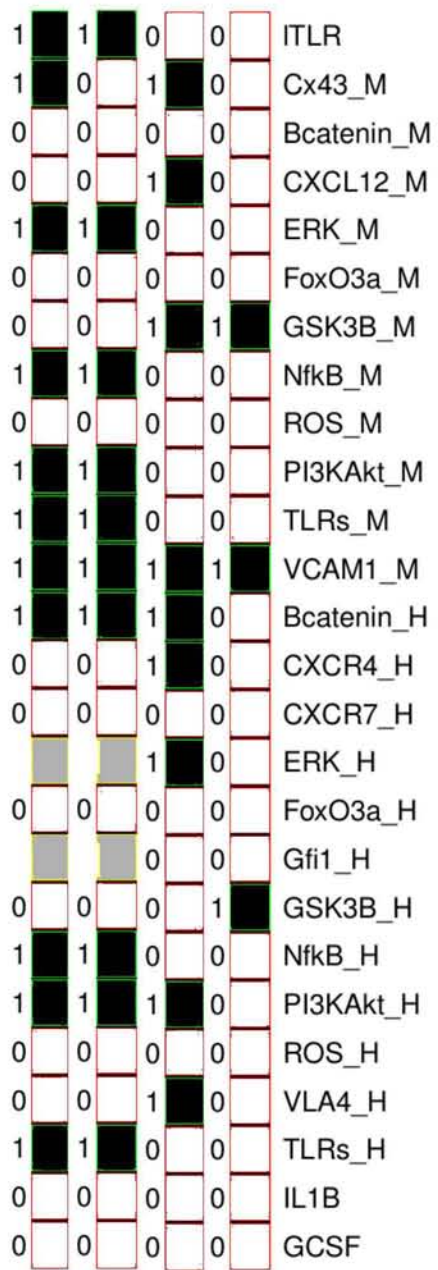
CXCR7 = 1



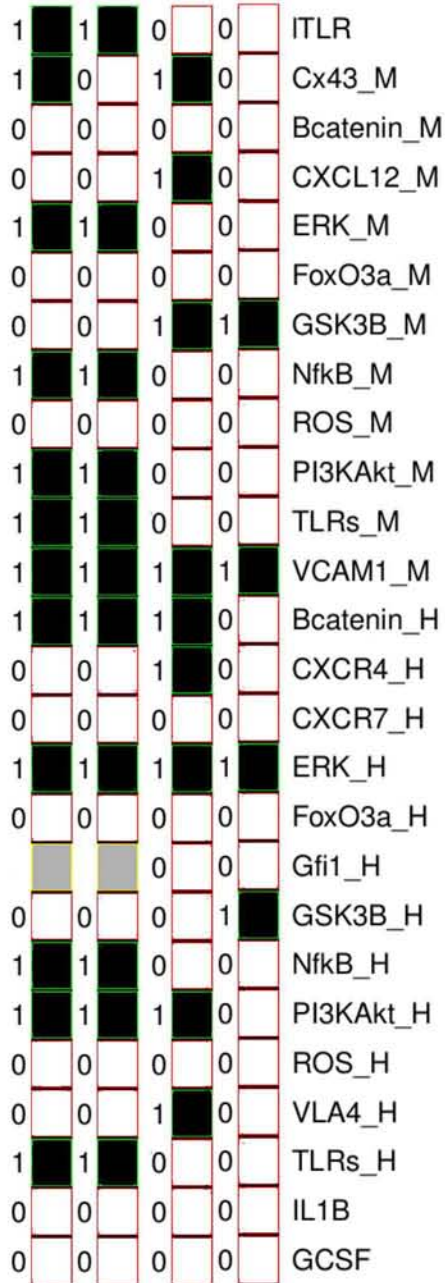
CXCR7 = 0



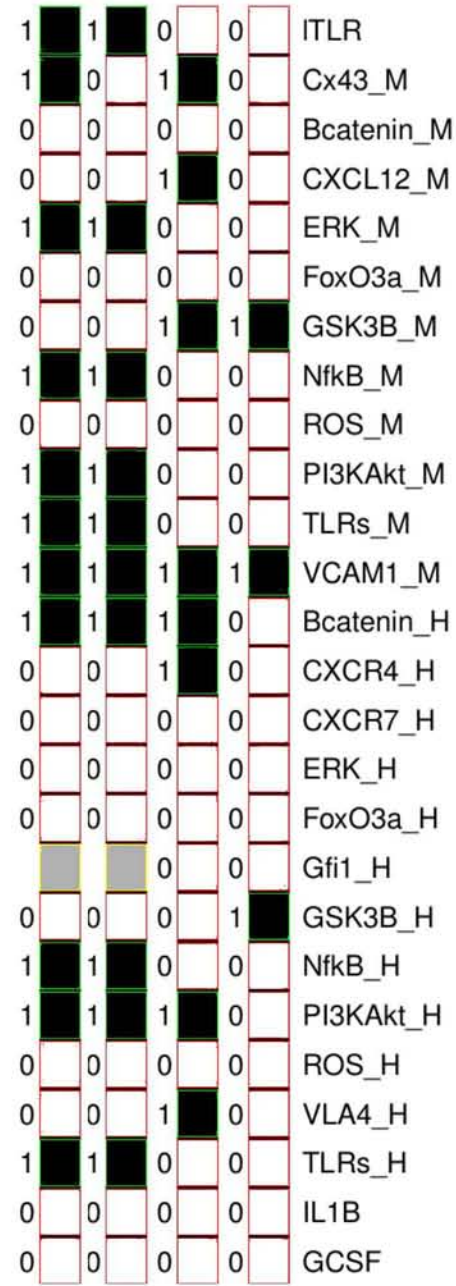
CXCR4 = 1



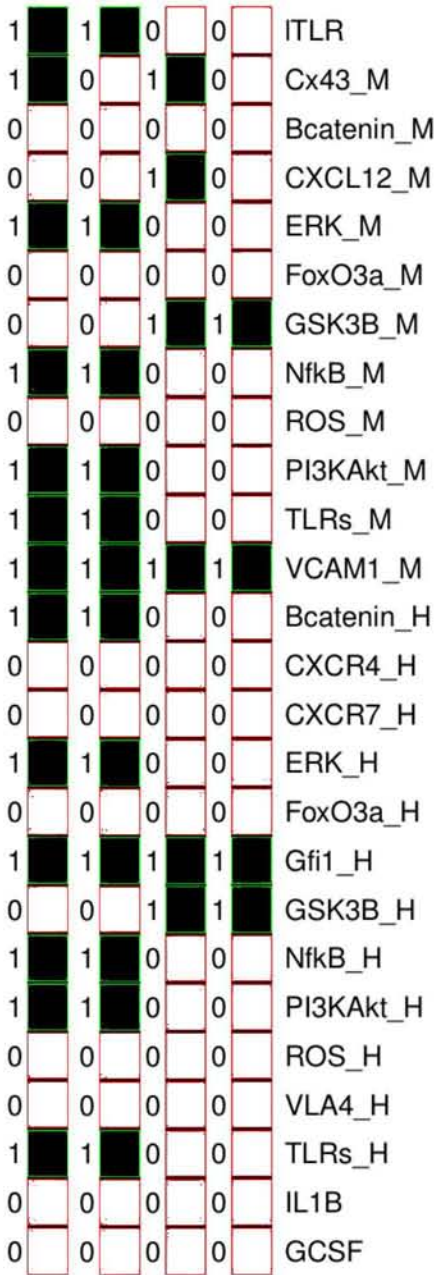
FoxO3a_H = 0



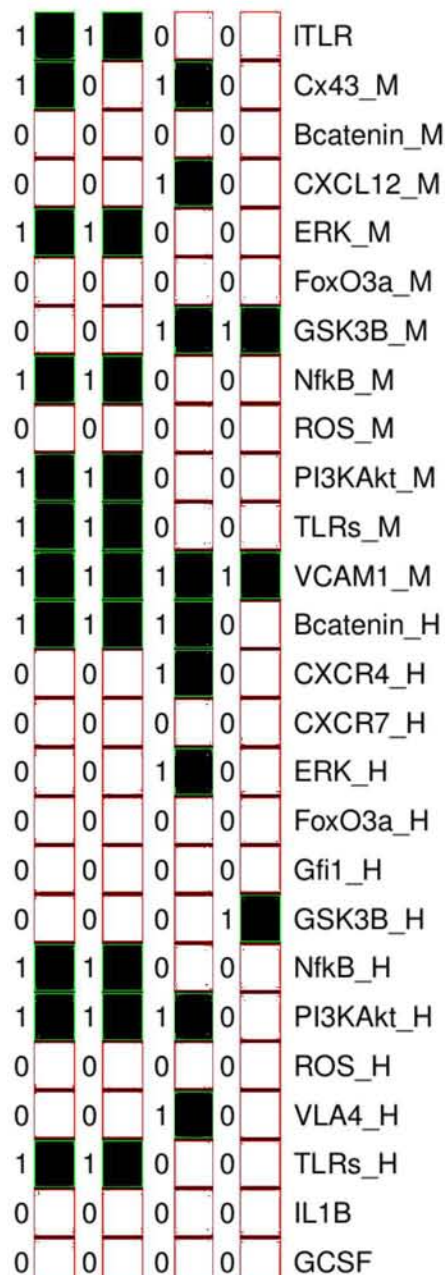
ERK_H = 1



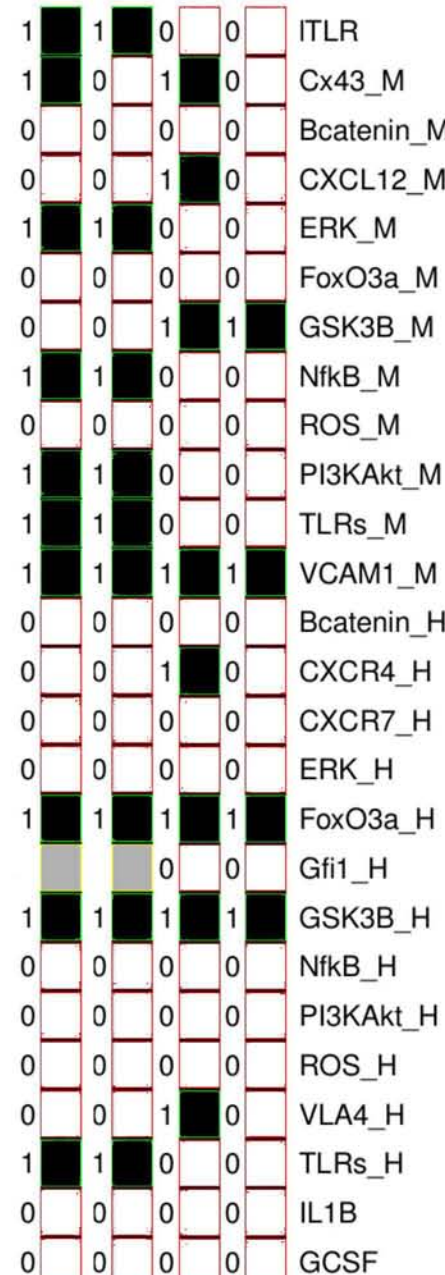
ERK_H = 0



Gfi1_H = 1



Gfi1_H = 0



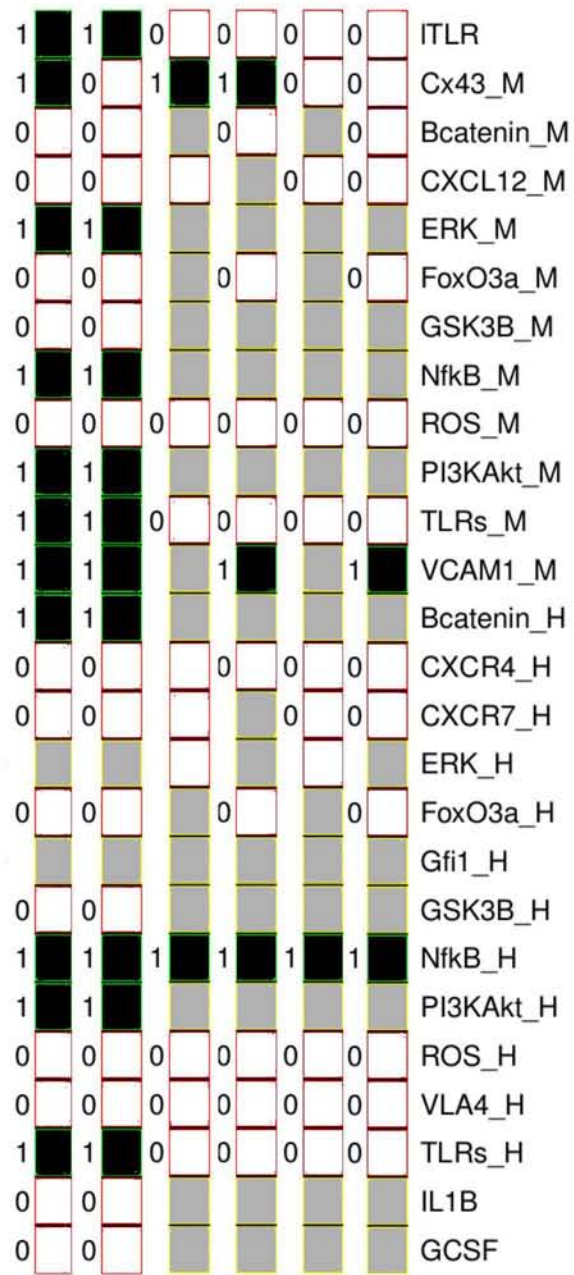
FoxO3a_H = 1

1	1	0	0	ITLR
1	0	1	0	Cx43_M
0	0	0	0	Bcatenin_M
0	0	1	0	CXCL12_M
1	1	0	0	ERK_M
0	0	0	0	FoxO3a_M
0	0	1	1	GSK3B_M
1	1	0	0	NfkB_M
0	0	0	0	ROS_M
1	1	0	0	PI3KAkt_M
1	1	0	0	TLRs_M
1	1	1	1	VCAM1_M
0	0	0	0	Bcatenin_H
0	0	1	0	CXCR4_H
0	0	0	0	CXCR7_H
0	0	0	0	ERK_H
0	0	0	0	FoxO3a_H
		0	0	Gfi1_H
1	1	1	1	GSK3B_H
1	1	0	0	NfkB_H
1	1	1	0	PI3KAkt_H
0	0	0	0	ROS_H
0	0	1	0	VLA4_H
1	1	0	0	TLRs_H
0	0	0	0	IL1B
0	0	0	0	GCSF

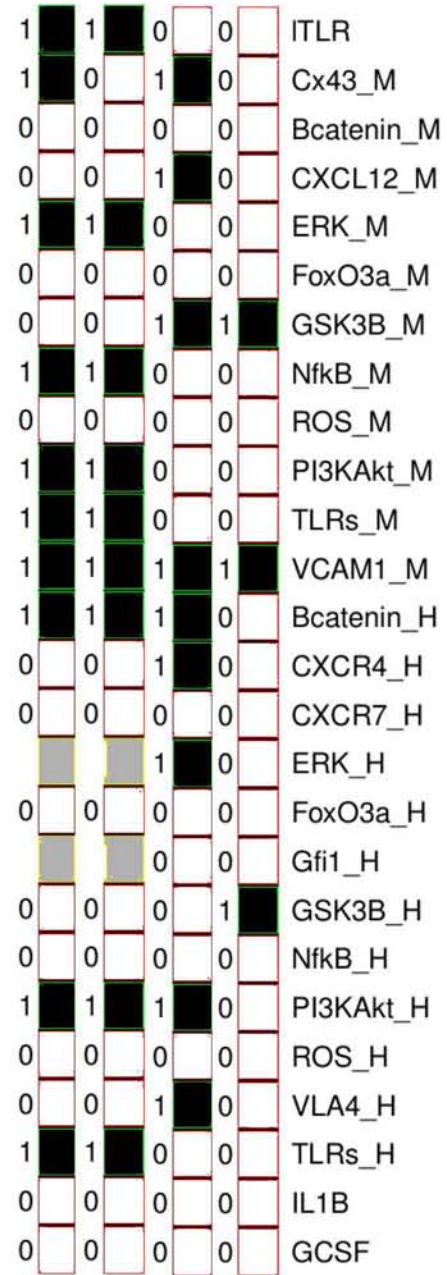
GSK3B_H = 1

1	1	1	1	0	0	0	ITLR
1	0	1	0	1	1	0	Cx43_M
0	0	0	0	0	0	0	Bcatenin_M
0	0	0	0	1	1	0	CXCL12_M
1	1	1	1	0	0	0	ERK_M
0	0	0	0	0	0	0	FoxO3a_M
0	0	0	0	1	1	1	GSK3B_M
1	1	1	1	0	0	0	NfkB_M
0	0	0	0	0	0	0	ROS_M
1	1	1	1	0	0	0	PI3KAkt_M
1	1	1	1	0	0	0	TLRs_M
1	1	1	1	1	1	1	VCAM1_M
1	1	1	1	1	1	1	Bcatenin_H
0	0	0	0	1	1	0	CXCR4_H
0	0	0	0	0	0	0	CXCR7_H
		0	0	0	1	0	ERK_H
0	0	1	1	1	0	1	FoxO3a_H
				0	0	0	Gfi1_H
0	0	0	0	0	0	0	GSK3B_H
1	1	0	0	0	0	0	NfkB_H
1	1	0	0	0	1	0	PI3KAkt_H
0	0	0	0	0	0	0	ROS_H
0	0	0	0	1	1	0	VLA4_H
1	1	1	1	0	0	0	TLRs_H
0	0	0	0	0	0	0	IL1B
0	0	0	0	0	0	0	GCSF

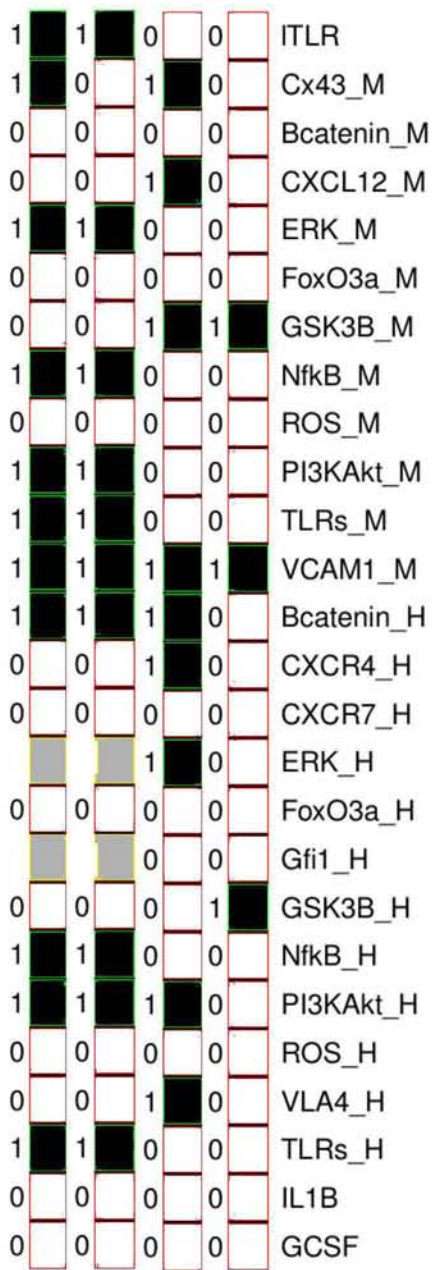
GSK3B_H = 0



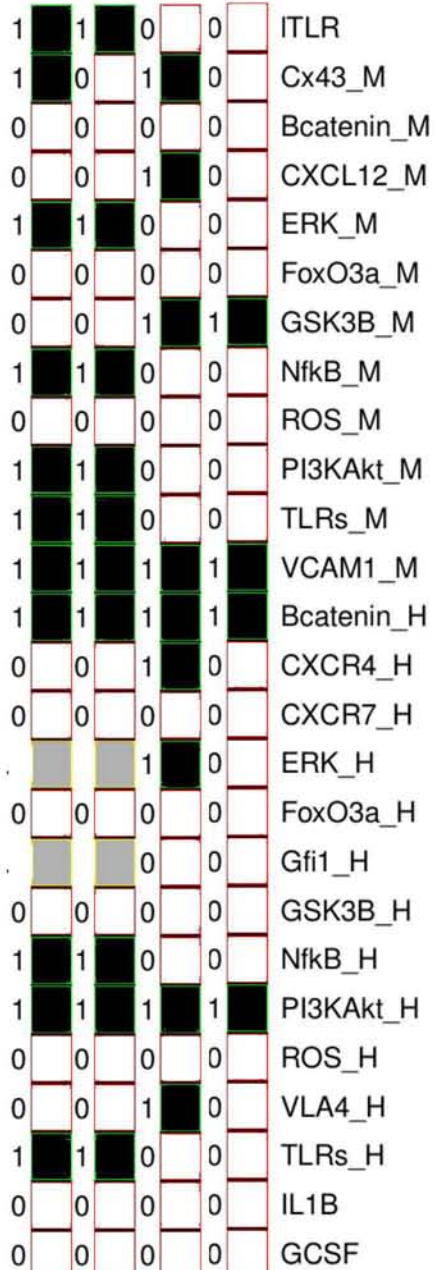
NfκB_H = 1 (Simulación síncrona)



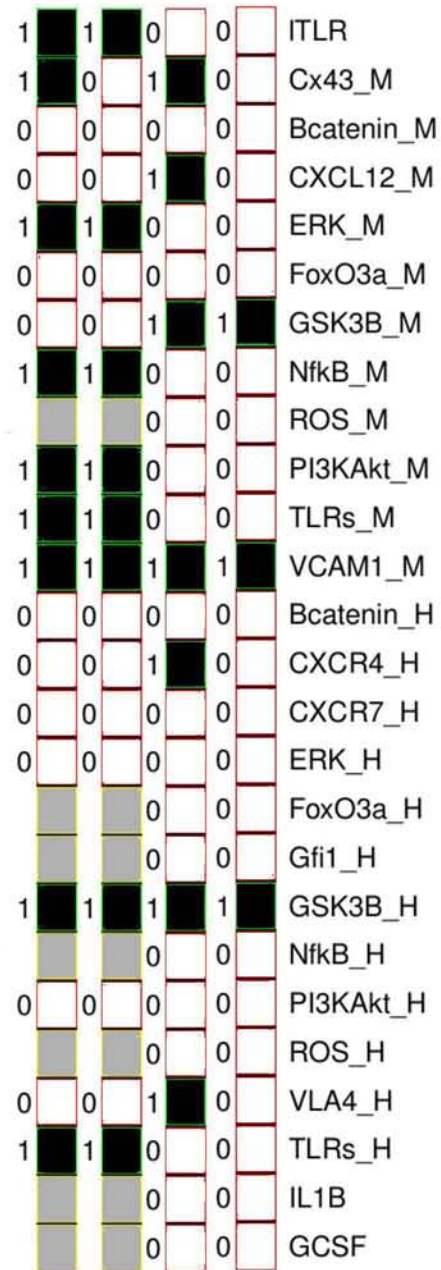
NfκB_H = 0



ROS_H = 0



PI3KAkt_H = 1



PI3KAkt_H = 0

1	1	0	0	ITLR
1	0	1	0	Cx43_M
0	0	0	0	Bcatenin_M
0	0	1	0	CXCL12_M
1	1	0	0	ERK_M
0	0	0	0	FoxO3a_M
0	0	1	1	GSK3B_M
1	1	0	0	NfkB_M
0	0	0	0	ROS_M
1	1	0	0	PI3KAkt_M
1	1	0	0	TLRs_M
1	1	1	1	VCAM1_M
1	1	0	0	Bcatenin_H
0	0	1	0	CXCR4_H
0	0	0	0	CXCR7_H
0	0	0	0	ERK_H
0	0	0	0	FoxO3a_H
0	0	0	0	Gfi1_H
0	0	1	1	GSK3B_H
1	1	0	0	NfkB_H
1	1	0	0	PI3KAkt_H
0	0	0	0	ROS_H
0	0	0	0	VLA4_H
1	1	0	0	TLRs_H
0	0	0	0	IL1B
0	0	0	0	GCSF

VLA4_H = 0

1	1	1	1	0	0	0	0	ITLR
1	1	0	0	1	1	0	0	Cx43_M
0	0	0	0	0	0	0	0	Bcatenin_M
0	0	0	0	0	1	0	0	CXCL12_M
1	1	1	1	1	0	1	0	ERK_M
0	0	0	0	0	0	0	0	FoxO3a_M
0	0	0	0	0	1	0	1	GSK3B_M
1	1	1	1	1	0	1	0	NfkB_M
0	1	0	1	0	0	0	0	ROS_M
1	1	1	1	1	0	1	0	PI3KAkt_M
1	1	1	1	0	0	0	0	TLRs_M
1	1	1	1	1	1	1	1	VCAM1_M
1	0	1	0	0	1	0	1	Bcatenin_H
0	0	0	0	0	0	0	0	CXCR4_H
0	0	0	0	0	1	0	0	CXCR7_H
1	0	1	0	0	1	0	1	ERK_H
0	1	0	1	1	0	1	0	FoxO3a_H
0	0	0	0	0	0	0	0	Gfi1_H
0	1	0	1	1	0	1	0	GSK3B_H
1	0	1	0	0	1	0	1	NfkB_H
1	0	1	0	0	1	0	1	PI3KAkt_H
1	1	1	1	1	1	1	1	ROS_H
0	0	0	0	0	0	0	0	VLA4_H
1	1	1	1	0	0	0	0	TLRs_H
0	1	0	1	1	0	1	0	IL1B
0	1	0	1	1	0	1	0	GCSF

ROS_H = 1

1	1	0	0	ITLR
1	0	1	0	Cx43_M
0	0	0	0	Bcatenin_M
0	0	1	0	CXCL12_M
1	1	0	0	ERK_M
0	0	0	0	FoxO3a_M
0	0	1	1	GSK3B_M
1	1	0	0	NfkB_M
0	0	0	0	ROS_M
1	1	0	0	PI3Kakt_M
1	1	0	0	TLRs_M
1	1	1	1	VCAM1_M
1	1	1	1	Bcatenin_H
0	0	0	0	CXCR4_H
0	0	1	0	CXCR7_H
		1		ERK_H
0	0	0	0	FoxO3a_H
				Gfi1_H
0	0	0	0	GSK3B_H
1	1	1	1	NfkB_H
1	1	1	1	PI3Kakt_H
0	0	0	0	ROS_H
0	0	0	0	VLA4_H
1	1	1	1	TLRs_H
0	0	0	0	IL1B
0	0	0	0	GCSF

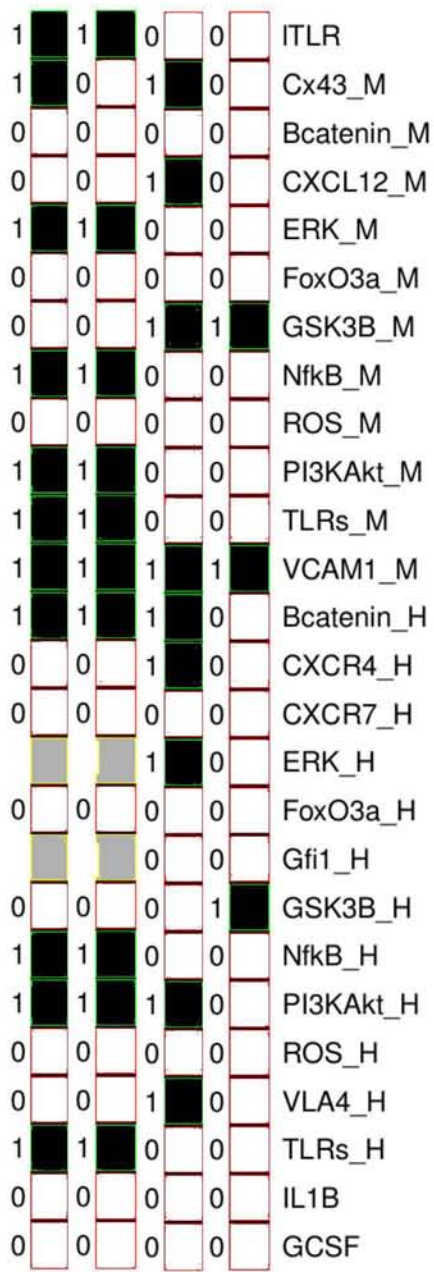
TLRs_H = 1

1	1	0	0	ITLR
1	0	1	0	Cx43_M
0	0	0	0	Bcatenin_M
0	0	1	0	CXCL12_M
1	1	0	0	ERK_M
0	0	0	0	FoxO3a_M
0	0	1	1	GSK3B_M
1	1	0	0	NfkB_M
0	0	0	0	ROS_M
1	1	0	0	PI3Kakt_M
1	1	0	0	TLRs_M
1	1	1	1	VCAM1_M
0	0	1	0	Bcatenin_H
0	0	1	0	CXCR4_H
0	0	0	0	CXCR7_H
0	0	1	0	ERK_H
0	0	0	0	FoxO3a_H
0	0	0	0	Gfi1_H
1	1	0	1	GSK3B_H
0	0	0	0	NfkB_H
0	0	1	0	PI3Kakt_H
0	0	0	0	ROS_H
0	0	1	0	VLA4_H
0	0	0	0	TLRs_H
0	0	0	0	IL1B
0	0	0	0	GCSF

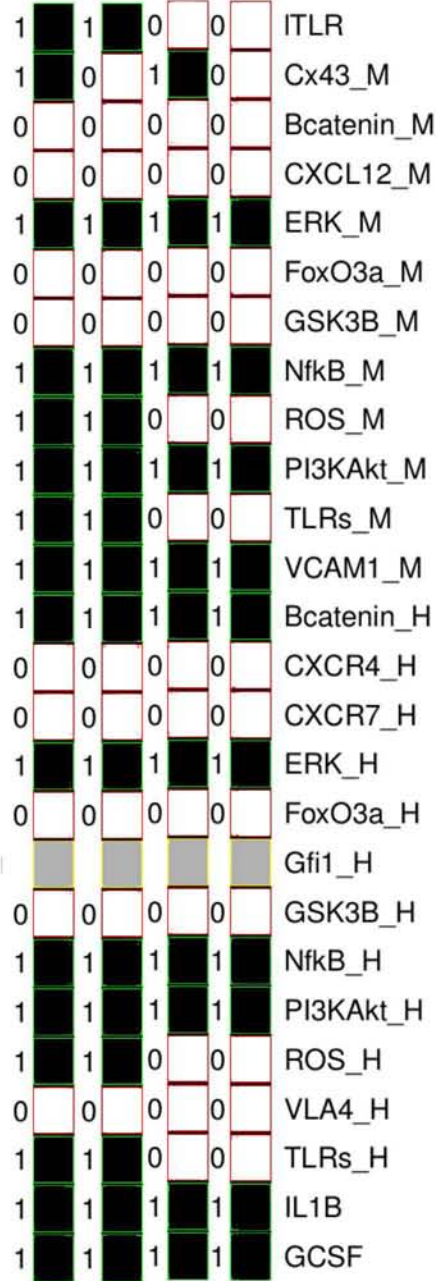
TLRs_H = 0

1	1	0	0	ITLR
1	0	1	0	Cx43_M
0	0	0	0	Bcatenin_M
0	0	1	0	CXCL12_M
1	1	0	0	ERK_M
0	0	0	0	FoxO3a_M
0	0	1	1	GSK3B_M
1	1	0	0	NfkB_M
0	0	0	0	ROS_M
1	1	0	0	PI3Kakt_M
1	1	0	0	TLRs_M
1	1	1	1	VCAM1_M
1	1	1	1	Bcatenin_H
0	0	1	0	CXCR4_H
0	0	0	0	CXCR7_H
1	1	1	1	ERK_H
0	0	0	0	FoxO3a_H
				Gfi1_H
0	0	0	0	GSK3B_H
1	1	0	0	NfkB_H
1	1	1	1	PI3Kakt_H
0	0	0	0	ROS_H
1	1	1	1	VLA4_H
1	1	0	0	TLRs_H
0	0	0	0	IL1B
0	0	0	0	GCSF

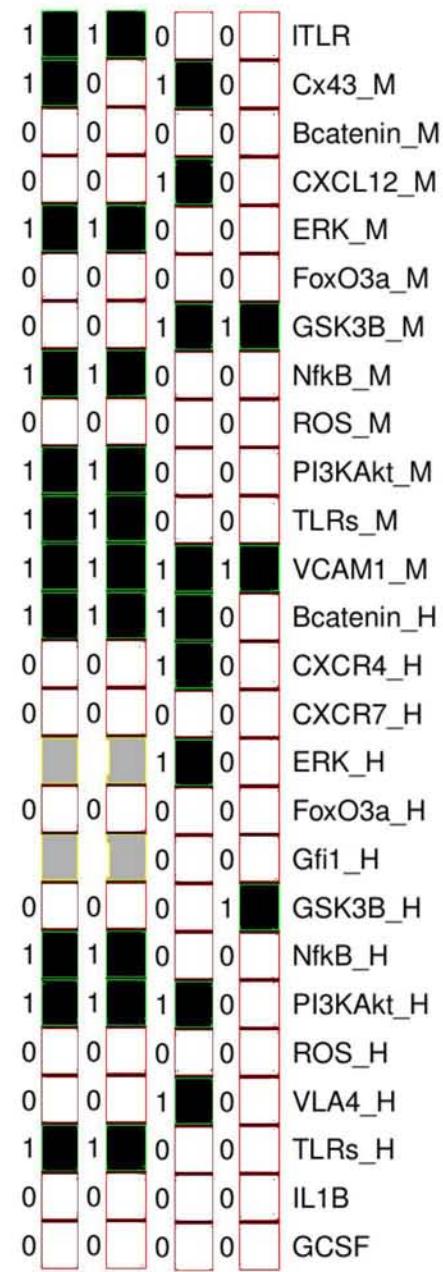
VLA4_H = 1



GCSF = 0



IL1B = 1



IL1B = 0

1	1	0	0	ITLR
1	0	1	0	Cx43_M
0	0	1	1	Bcatenin_M
0	0	0	0	CXCL12_M
1	1	1	1	ERK_M
0	0	0	0	FoxO3a_M
0	0	0	0	GSK3B_M
1	1	0	0	NfkB_M
0	0	0	0	ROS_M
1	1	1	1	PI3KAkt_M
1	1	0	0	TLRs_M
1	1	1	1	VCAM1_M
1	1	1	1	Bcatenin_H
0	0	0	0	CXCR4_H
0	0	0	0	CXCR7_H
1	1	1	1	ERK_H
0	0	0	0	FoxO3a_H
				Gfi1_H
0	0	0	0	GSK3B_H
1	1	0	0	NfkB_H
1	1	1	1	PI3KAkt_H
0	0	0	0	ROS_H
0	0	0	0	VLA4_H
1	1	0	0	TLRs_H
0	0	0	0	IL1B
1	1	1	1	GCSF

GCSF = 1

Anexo 3. Gráficas de análisis de transición adicionales

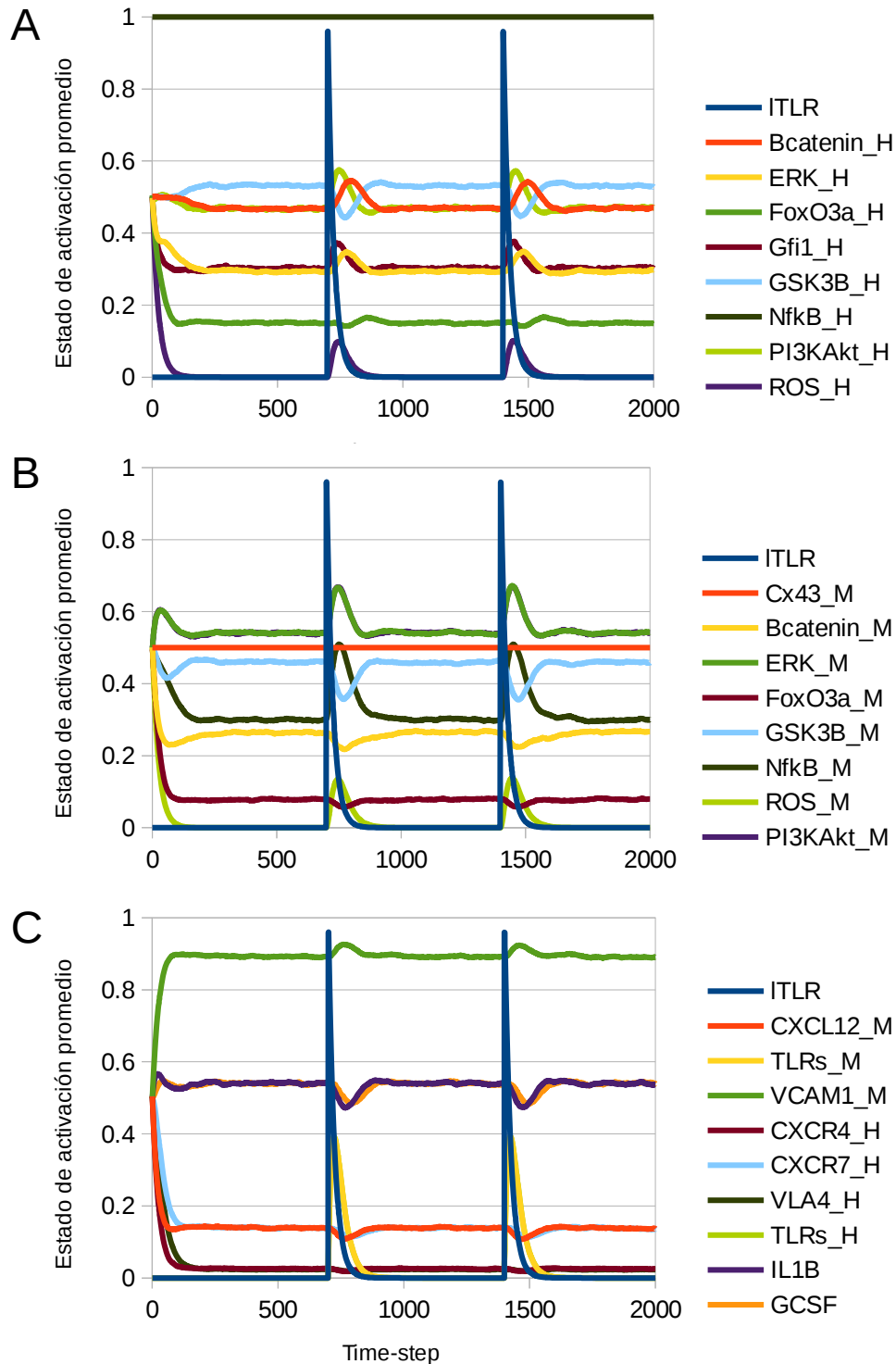


Figura 7. A Activación promedio para red mutante con ganancia de función en el nodo representativo de NFκB en HSPC (NfκB_H). Nodos intracelulares de HSPC (A), MSC (B) y nodos involucrado en la comunicación intercelular y microambiental (C). El promedio de estados de activación fue obtenido de 50,000 simulaciones a partir de estados iniciales al azar en los cuales únicamente se fijó a 0 el valor de ITLR, TLRs_H y TLRs_H.

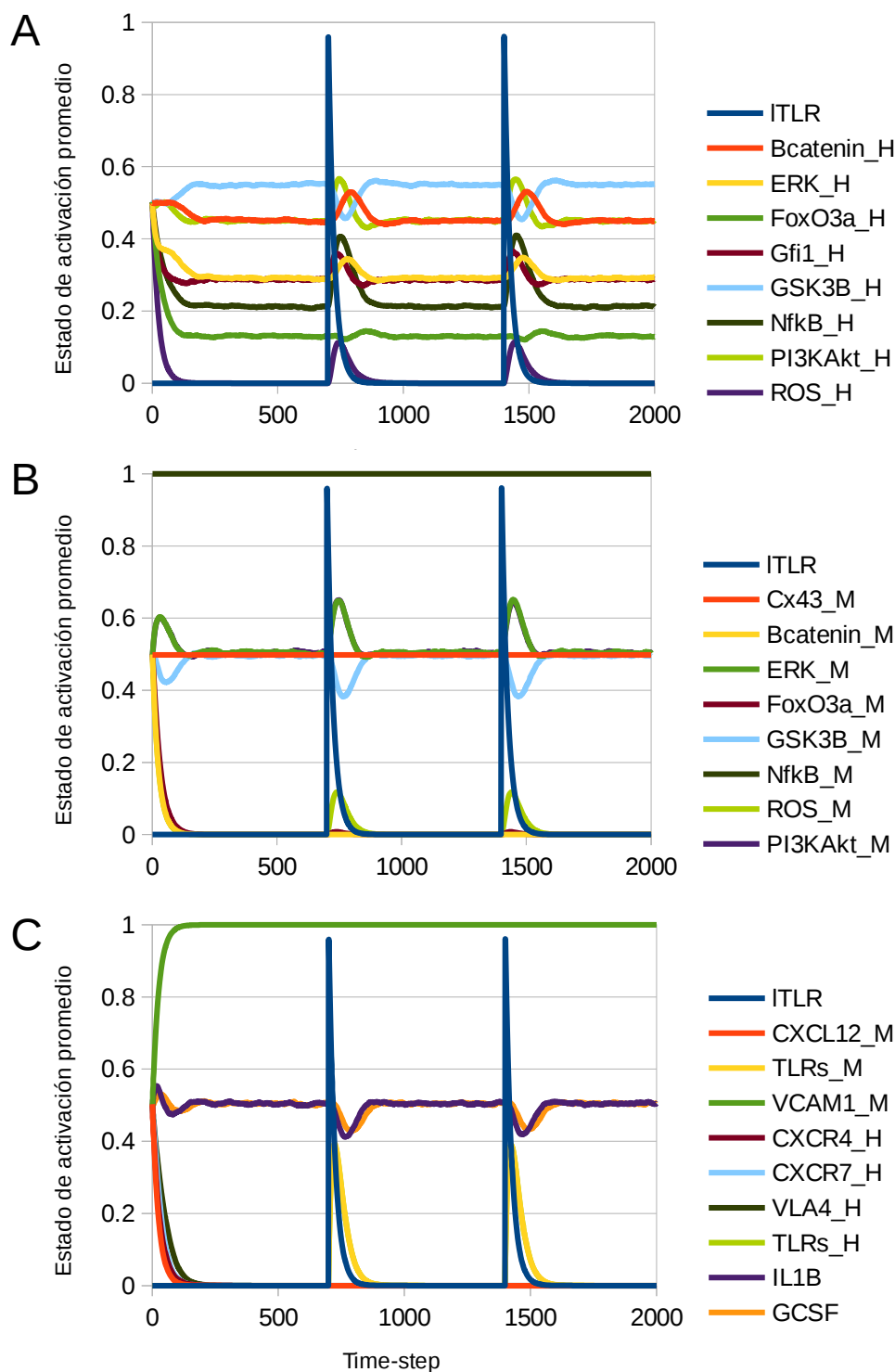


Figura 8. Activación promedio para red mutante con ganancia de función en el nodo representativo de NF κ B en MSC (NfkB_M). Nodos intracelulares de HSPC (A), MSC (B) y nodos involucrado en la comunicación intercelular y microambiental (C). El promedio de estados de activación fue obtenido de 50,000 simulaciones a partir de estados iniciales al azar en los cuales únicamente se fijó a 0 el valor de ITLR, TLRs_H y TLRs_H.

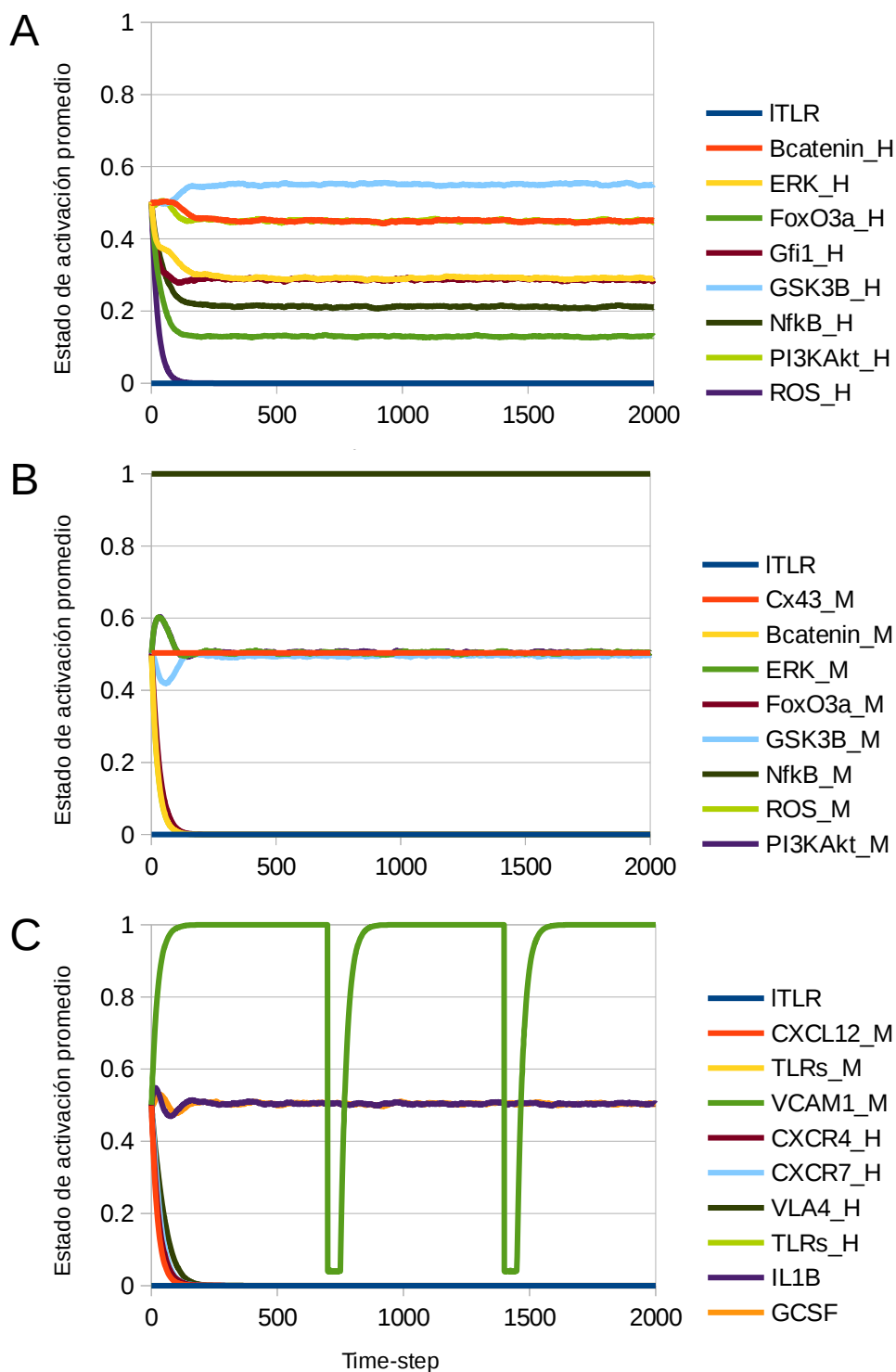


Figura 9. Activación promedio para red mutante con ganancia de función en el nodo representativo de NFkB en MSC (NfkB_M) e inhibición de VCAM-1 en el paso de tiempo 700 y 1400. Nodos intracelulares de HSPC (A), MSC (B) y nodos involucrado en la comunicación intercelular y microambiental (C). El promedio de estados de activación fue obtenido de 50,000 simulaciones a partir de estados iniciales al azar en los cuales únicamente se fijó a 0 el valor de ITLR, TLRs_H y TLRs_H.

Anexo 4. Funciones programadas en R para análisis de simulaciones

analyzeStability(network, attractors, number_Attractors, no_perturbations)

Código en R para evaluar la estabilidad de los atractores de punto fijo ante todas las perturbaciones posibles (igual al número de nodos) en el valor de activación de uno o dos nodos .

Función auxiliar: *compare_vector_States()*

```
#Input:
#network: network downloaded with the BoolNet function loadNetwork()
#attractors: attractores obtained with BoolNet function getAttractors(), it
will only works for single state attractors.
#number of attractors: number of attractors will allow, if their exist cyclic
attractors, to tell the function only to analyse the first attractors that
will correspond to the single states.
#no_perturbations: 1 for node by node perturbation or 2 if additionally to the
single perturbation you want to test the perturbation of 2 by 2 nodes.

analyzeStability <- function(network, attractors, number_Attractors,
no_perturbations){
  sameAtts = 0
  totalTests = 0
  m <- matrix(0,1,length(network$genes))
  colnames(m) <- network$genes
  for (j in 1:number_Attractors){
    initialState1 <- getAttractorSequence(attractors,j)
    sameAttsSA = 0
    totalTestsSA = 0
    for (k in 2:length(network$genes)){
      initialState <- initialState1
      initialState[k] <- abs(initialState[k]-1)
      newAttTS <- getPathToAttractor(network,initialState)
      newAtt <- newAttTS[nrow(newAttTS),]
      evaluation <- compare_vector_States(newAtt,initialState1)
      if (evaluation==TRUE){
        sameAtts = sameAtts + 1
        sameAttsSA = sameAttsSA + 1
      }
    }
  }
}
```

```

}
if (evaluation==FALSE){
  m <- rbind(m,newAtt)
  rownames(m)[nrow(m)] <- paste0('att',j,',',network$genes[k])
}
totalTests = totalTests + 1 #Counter for total perturbations
totalTestsSA = totalTestsSA + 1
if (no_perturbations == 2){ #Evaluation of 2 by 2 perturbation, if
required
  if ((k+1) <= length(network$genes)){
    for (i in (k+1):length(network$genes)){
      testState <- initialState
      testState[i] <- abs(initialState[i]-1)
      newAttTS <- getPathToAttractor(network,testState)
      newAtt <- newAttTS[nrow(newAttTS),]
      evaluation <- compare_vector_states(newAtt,initialState1)
      if (evaluation==TRUE){
        sameAtts = sameAtts + 1
        sameAttsSA = sameAttsSA + 1
      }
      if (evaluation==FALSE){
        m <- rbind(m,newAtt)
        rownames(m)[nrow(m)] <-
paste0('att',j,',',network$genes[k], '/' ,network$genes[i])
      }
      totalTests = totalTests + 1
      totalTestsSA = totalTestsSA + 1
    }
  }
}
}
cat('\n')
print(paste0('Stability of ', 'attractor ',j,' = ',
sameAttsSA/totalTestsSA))
}
cat('\n')

```



```

    m <- m[-1,]
    return(m)
}
#####

```

analyzeTsWithINT(net, tStates=1000, it=1000, iSetNodes=list(), iSetValues=list(), stimulus=NULL, sTime = 1, sType = 1, intermitation=700)

Obtiene los estados de transición por un número de time-steps igual a *tStates* partiendo de un número de estados al azar igual a *it*. La función permite fijar un valor de activación para los nodos establecidos en *iSetNodes* al generar el estado inicial para cada simulación. Si se desea cambiar el valor de un nodo en un punto específico de la simulación y por un tiempo determinado, se establecen con *stimulus*, *sTime*, *sType* e *intermitation*.

```

#Inputs:
#net = loaded network to analyze
#tStates = number of time steps running each simulation (default value=1000)
#it = number of simulations (default value set to 1000)
#iSetNodes= list of nodes wanted to have an specific value at the initial
state
#iSetValues = list of values associated for iSetNodes
#stimulus = node wanted to be stimulated at an specific value, time steps and
specific range of time steps
#sTime = range of time for the establishment of the stimulus
#sType = value associated to the stimulation of the desired node
#intermitation = recursive time step at which the stimulus will be established

analyzeTsWithINT <- function(net, tStates=1000, it=1000, iSetNodes=list(),
iSetValues=list(), stimulus=NULL, sTime = 1, sType = 1, intermitation=700) {
  nodesNames <- net$genes
  noNodes <- length(nodesNames)
  rangeSt = (0:sTime)
  itP = 0
  s <- match(stimulus, nodesNames) #acquire the index of the node for
stimulation
  final <- matrix(0, nrow=tStates, ncol=noNodes) #empty matrix for the output

```

```

Porct1 = 0 #counter for the printing of perecentage of progress
cat('START ')
for(i in 1:it) {
  x <- sample(0:1, noNodes, replace=T)
  if(length(iSetNodes) != 0){ #Change the initial random state keeping the
iSetNodes with their associated values
    for(a in 1:length(iSetNodes)){
      x[match(iSetNodes[a],nodesNames)] <- iSetValues[a]
    }
  }
  finalTemp <- matrix(0, nrow=tStates, ncol=noNodes) #Temporal matrix
  finalTemp[1,] <- x
  for(j in 2:tStates) {
    if((TRUE%in%(j%%intermitation == rangeSt)) == TRUE){
      x[s] <- sType
    }
    x <- stateTransition(net, state = x, type = 'asynchronous')
    x <- as.vector(x)
    finalTemp[j,] <- x
  }
  final = final + finalTemp
  itP = itP + 1
  Porct2 = round((itP/it)*100)
  if (Porct2 != Porct1) {
    cat('... ')
    cat(Porct2)
  }
  Porct1 = Porct2
}
finalGraph = final/itP
colnames(finalGraph) <- nodesNames
cat(' END')
return(finalGraph)
}
#####

```

asyncAtt(net, noInitialStates, attractors).

Código en R para determinar la cuenca de atracción de los atractores de punto fijo determinados a partir de un esquema de actualización asíncrono.

Función auxiliar: ***compare_vector_States()***

```
#asyncAtt will return a matrix with the attractors, their basin of attraction
and the percentage respect to the basin and the total number of random initial
states (asynchronous update).
```

```
#input: network, noInitialStates = (50,000 default), attractors, number of
attractors.
```

```
asynchAtt <- function(net, noInitialStates=50000, attractors,
number_Attractors){
  matrix1 <- matrix(0, number_Attractors, 3)
  for(b in 1:noInitialStates){
    att <- try(getAttractorSequence(getAttractors(net, 'asynchronous',
'random', startStates = 1),1), silent=TRUE)
    for(c in 1:number_Attractors){

      if(compare_vector_States(att,getAttractorSequence(attractors,c))==TRUE){
        matrix1[c,2] <- matrix1[c,2]+1
      }
    }
  }
  matrix1[,3] <- (matrix1[,2]/sum(matrix1[,2]))*100
  for(a in 1:number_Attractors){
    matrix1[a,1] <- toString(getAttractorSequence(attractors,a))
  }
  colnames(matrix1) <- c('Attractor', 'Basin', 'Percentage')
  return(matrix1)
}
#####
```

compare_vector_States(vector1, vector2)

Compara dos vectores de la misma longitud, devolviendo TRUE si son idénticos y FALSE si difieren en al menos un valor.

```
compare_vector_States <- function(vector1, vector2){
  truth_Evaluation <- vector1 == vector2
  for (i in 1:length(truth_Evaluation)){
    if (truth_Evaluation[i] == FALSE){
      return(FALSE)
    }
  }
  return(TRUE)
}
```

```
#####
```

createTXT(synchAttractorsInfo, asynchAttractorsInfo, asynchBasins, FileName)

Crea un archivo de extensión .txt con la información de los atractores obtenidos a partir de una simulación empleando esquema de actualización síncrono y asíncrono.

```
createTXT <- function(synchAttractorsInfo, asynchAttractorsInfo, asynchBasins
= 'Complex attractors', FileName){
  sink(paste0(FileName, '.txt'))
  cat("Synchronous attractors\n")
  print(synchAttractorsInfo)
  cat("\n\n=====\n\n")
  cat("Asynchronous attractors\n")
  print(asynchAttractorsInfo)
  print(asynchBasins)
  sink()
}
```

```
#####
```

getMutants(net).

Código en R para realizar las simulaciones de todas las mutantes posibles (mutante nula y mutante de sobreexpresión para cada nodo) y obtener los atractores para su evaluación.

Función auxiliar: ***createTXT()***, ***compare_vector_States()***, ***plotAttractors()***, ***testAsynch()***

```
getMutants<- function(net, initialState_Asynch){
```

```

IS = initialStates_Asynch
networkSize<-length(net[[2]])
cat('##### Wild type network\n')
#Get and plot synchronous attractors of wild type network
attrSynch<-getAttractors(net,'synchronous',method='random',startStates = IS)
plotAttractorsCM(attrSynch, 'WildType_Synch', 'Synch')
#Get asynchronous attractors of wild ctype network
attrAsynch<-getAttractors(net,'asynchronous',method='random',startStates =
IS)
#Get number of non complex asynchronous attractors, basin size and plot
attrsNo <- testAsynch(attrAsynch)
if(attrsNo != 0){
  try(basinsOfAs <- asynchAtt(net, IS, attrAsynch, number_Attractors =
attrsNo), silent=TRUE)
  plotAttractorsCM(attrAsynch, 'WildType_Asynch', 'Asynch', basinInfoAsynch
= basinsOfAs)
}
#Create txt file
createTXT(attrSynch, attrAsynch, basinsOfAs, 'WildType')
#Simulate mutants
dir.create('Mutants')
setwd('Mutants/')
for(b in 0:1){
  for(i in 1:networkSize){
    print(paste0('##### ', b, " Mutant in ", net$genes[i]))
    netMut<-fixGenes(net,i,b)
    #Get and plot synchronous attractors of wild type network
    attrSynch<-
getAttractors(netMut,'synchronous',method='random',startStates = IS)
    plotAttractorsCM(attrSynch, paste0(net$genes[i], '_', b, 'Synch'),
'Synch')
    #Get asynchronous attractors of wild type network
    attrAsynch<-
getAttractors(netMut,'asynchronous',method='random',startStates = IS)
    #Get number of non complex asynchronous attractors, basin size and plot
    attrsNo <- testAsynch(attrAsynch)

```

```

    if(attrsNo != 0){
      try(basinsOfAs <- asynchAtt(net, IS, attrAsynch, number_Attractors =
attrsNo), silent=TRUE)
      plotAttractorsCM(attrAsynch, paste0(net$genes[i], '_', b, 'Asynch'),
'Asynch', basinInfoAsynch = basinsOfAs)
    }
    #Create txt file
    createTXT(attrSynch, attrAsynch, basinsOfAs, paste0(net$genes[i], '_',
b))
  }
}
}
#####

```

plotAttractors(attractorsInfo, outputFileName)

Despliega de forma gráfica en un archivo de extensión .pdf, los atractores obtenidos a partir de simulaciones con esquema de actualización síncrono. En caso de existir atractores de más de un estado, el valor de los nodos en los estados que componen al atractor son promediados.

```

plotAttractorsCM <- function(attractorsInfo, outputFileName,
SynchOrAsynch='Synch', basinInfoAsynch = matrix()){
  n = 0
  pdf(paste0(outputFileName, '.pdf'), width = 7, height = 4)
  repeat{
    n=n+1
    mat1 <- matrix()
    try(mat1 <- getAttractorSequence(attractorsInfo, n), silent = TRUE)
    mat2 <- as.matrix(colSums(mat1)/nrow(mat1))
    if(length(mat2) == 1) {
      dev.off()
      break
    }
    else{
      par(mar=c(13,2,6,2))
      image(1:nrow(mat2), 1:ncol(mat2), mat2, col=c('red2', 'yellow1',
'yellow1', 'yellow1', 'green2'), axes= FALSE, xlab="", ylab="")
    }
  }
}

```

```

grid(nx=nrow(mat2), ny=ncol(mat2), col="black", lty="solid")
axis(side=3, at = 1:nrow(mat2), labels=rownames(mat2), tick = FALSE,
line=-      0.7, las=2, cex.axis=0.8)
axis(side=1, at = 1:nrow(mat2), labels=mat2[,1], tick = FALSE, line=-
0.9,      las=2, cex.axis=0.8)
if(SynchOrAsynch == 'Asynch'){
  mtext(paste0('Attractor ', n, ', involved states = ',
              length(attractorsInfo$attractors[[n]]$involvedStates) ,
', basin size = ',      basinInfoAsynch[n,2]), side=3, line=4.5)
}
else{
  mtext(paste0('Attractor ', n, ', involved states = ',
              length(attractorsInfo$attractors[[n]]$involvedStates) ,
', basin size = ',      attractorsInfo$attractors[[n]]$basinSize), side=3,
line=4.5)
}
}
}
}
#####

```

testAsynch(asynchAttInfo)

Determina el número de atractores de punto fijo obtenidos a partir de una simulación con esquema de actualización asíncrono.

```

testAsynch <- function(asynchAttInfo){
  n=0
  repeat{
    n=n+1
    attractor = 1
    try(attractor <- getAttractorSequence(asynchAttInfo, n), silent = TRUE)
    if(length(attractor) == 1){
      return(n-1)
    }
  }
}
#####

```