



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

**PARTICIPACIÓN DE LOS PATRONES MOLECULARES ASOCIADOS A DAÑO
(DAMPs) EN LOS CUADROS DE NEUTROPENIA Y FIEBRE DE LA LEUCEMIA
LINFOBLÁSTICA AGUDA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

PÉREZ FIGUEROA GLORIA ERANDI

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARIA DEL CARMEN MALDONADO BERNAL
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DRA. VILMA ARACELI MALDONADO LAGUNAS
INSTITUTO DE MÉDICINA GENOMICA
DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM**

MÉXICO, CD. MX., MAYO, 2016.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

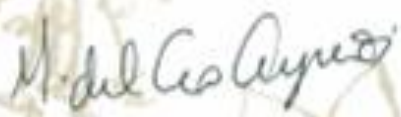
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 15 de febrero de 2016, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **PÉREZ FIGUEROA GLORIA ERANDI** con número de cuenta 509014993 con la tesis titulada **"PARTICIPACIÓN DE LOS PATRONES MOLECULARES ASOCIADOS A DAÑO (DAMPs) EN LOS CUADROS DE NEUTROPENIA Y FIEBRE DE LA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. MARIA DEL CARMEN MALDONADO BERNAL**.

- Presidente: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN
- Vocal: DRA. MARIA ANTONIETA CHÁVEZ GONZÁLEZ
- Secretario: DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO
- Suplente: DRA. MARTHA ESTHELA PÉREZ RODRÍGUEZ
- Suplente: DRA. VILMA ARACELI MALDONADO LAGUNAS

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 20 de abril de 2016



DRA. MARIA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA





UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

**PARTICIPACIÓN DE LOS PATRONES MOLECULARES ASOCIADOS A DAÑO
(DAMPs) EN LOS CUADROS DE NEUTROPENIA Y FIEBRE DE LA LEUCEMIA
LINFOBLÁSTICA AGUDA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

PÉREZ FIGUEROA GLORIA ERANDI

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARIA DEL CARMEN MALDONADO BERNAL
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. VILMA ARACELI MALDONADO LAGUNAS
INSTITUTO DE MÉDICINA GENOMICA
DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

MÉXICO, CD. MX., MAYO, 2016.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, por la formación que me brindó durante mis estudios para obtener el grado de Doctora en Ciencias.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por brindarme el apoyo económico durante mi formación en posgrado. 220266 (número de becario)

Agradecimiento a la Dra. María del Carmen Maldonado Bernal, por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, por su dirección y asesoría de mi tesis.

Agradecimiento al Dr. Enrique Ortega Soto y Dra. Vilma Maldonado Lagunas por su valiosa asesoría y apoyo para el desarrollo de mi tesis.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Agradezco a mis padres por su inmenso apoyo y cariño.

Agradezco a Héctor por todo su amor y apoyo incondicional.

Agradezco a todas las mujeres de ojos grandes que he tenido la fortuna de tener en mi vida.

Agradezco a Vic por ser mi cómplice en muchas aventuras de la vida y de la ciencia.

Agradezco a la Dra. Alejandra Contreras y al Dr. Alejandro Gómez por su invaluable apoyo en la parte experimental y de análisis estadístico para éste trabajo.

Agradezco a amigos y personal de laboratorio de los diferentes laboratorios de investigación: Biología del Desarrollo, Infectología y Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Bacteriología Intestinal y UIEO. Por permitirme trabajar y aprender de ellos y hacer más ameno cada día.

Agradezco a la fundación Terry Fox por el financiamiento económico al Proyecto de Investigación HIM/2010/076.

DEDICATORIA

A Alejandro con todo mi amor

A Héctor por su comprensión y apoyo

A mis padres por ser mi ejemplo de vida

A Juan y Judha por hacer más completa mi vida

A mi mis tíos Lucía y Marcos, mi primera inspiración y ejemplo de vida académica

A María de Jesús y Mauricio, por llegar y estar presentes en mi vida

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS	i
ABREVIATURAS	ii
1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	3
3. INTRODUCCIÓN	5
3.1 Leucemia linfoblástica aguda	5
3.2 Fiebre y neutropenia en niños con LLA	6
3.3 Patrones moleculares asociados a daño (DAMPs)	8
3.4 Mecanismos de activación del sistema inmune por DAMPs	14
3.5 Mecanismos moleculares de activación del Inflamasoma y su participación en LLA	17
3.6 Citocinas proinflamatorias inductoras de fiebre	18
3.7 Muerte celular en neutrófilos	20
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
5. JUSTIFICACION	22
6. HIPÓTESIS	23
7. OBJETIVOS	23
8. DISEÑO DEL ESTUDIO	24
9.METODOLOGÍA	25
9.1 Población de estudio	25
9.2 Obtención y conservación de la muestra biológica	25
9.3 Determinación de mediadores inflamatorios: citocinas, quimiocinas, en leucemia linfoblástica aguda	26

9.4 Determinación de DAMPs: Proteínas de choque térmico (HSPs), S100A8, ácido úrico y HMGB1 en leucemia linfoblástica aguda	27
9.5 Expresión del inflamasoma NLRP3 en las líneas celulares RS4 y Reh	27
9.6 Determinación de los mecanismos de muerte celular de los neutrófilos de pacientes con LLA	30
9.7 Análisis Estadístico	30
10. RESULTADOS	33
10.1 Concentración de las citocinas inductoras de fiebre (IL-1 β , TNF- α , IL-6) y asociación con la fiebre de los pacientes con LLA al diagnóstico sin infección aparente	36
10.2 Perfil de citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias en pacientes con LLA al diagnóstico sin infección clínica aparente	37
10.3 Citocinas séricas tipo Th1 y Th2 en pacientes con LLA al diagnóstico, sin infección clínica aparente.	40
10.4 Citocinas inmunoreguladoras en pacientes con LLA al diagnóstico, sin infección clínica aparente	43
10.5 Citocinas inflamatorias asociados a la fiebre de pacientes con LLA	45
10.6 Concentración de DAMPs en pacientes con LLA	49
10.7 Análisis de asociación de DAMPs con LLA	57
10.8 Expresión de los componentes del Inflamasoma NLRP3.	60
10.9 Mecanismos de Muerte celular de los neutrófilos de pacientes con LLA	77
10.10 Activación de caspasas en pacientes con LLA	80
10.11 Expresión de vacuolas autofagocíticas en LLA	81

11. DISCUSIÓN	82
12. RESUMEN DE RESULTADOS	93
13. CONCLUSIONES	94
14. PERSPECTIVAS	95
15. LITERATURA CITADA	97
ANEXO: ARTÍCULO DE REQUISITO	113

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

- Figura 1.** Estructura de DAMPs.
- Figura 2.** Reconocimiento de DAMPs por diferentes PRRs.
- Figura 3.** Inmunofenotipos de pacientes con LLA.
- Figura 4.** Frecuencia de pacientes con Fiebre y Neutropenia al diagnóstico sin infección aparente.
- Figura 5.** Concentración de citocinas séricas asociadas a fiebre en pacientes con LLA.
- Figura 6.** Incremento de citocinas séricas pro-inflamatorias en pacientes con LLA.
- Figura 7.** Incremento de quimiocinas en pacientes con LLA.
- Figura 8.** Incremento de citocinas tipo Th1 en pacientes con LLA.
- Figura 9.** Citocinas tipo Th2 en pacientes con LLA.
- Figura 10.** Incremento de citocinas reguladoras en pacientes con LLA
- Figura 11.** Graficas ROC para citocinas.
- Figura 12.** Desregulación en el balance de citocinas séricas en pacientes con LLA sin infección clínica aparente.
- Figura 13.** Disminución de proteínas de choque térmico en suero de pacientes con LLA y controles.
- Figura 14.** Proteínas de choque térmico en pacientes con LLA con fiebre y sin fiebre.
- Figura 15.** S100 A8/Calgranulina en pacientes con LLA y fiebre.
- Figura 16.** Ácido úrico en pacientes con LLA
- Figura 17.** HMGB-1 en pacientes con LLA.

- Figura 18.** Graficas ROC para DAMPs.
- Figura 19.** Producción de IL-1 β en líneas celulares deLLA.
- Figura 20.** Expresión de los componentes del Inflamasoma NLRP3 en líneas celulares de LLA.
- Figura 21.** Colocalización de los componentes del Inflamasoma NLRP3 en MN totales del grupo control.
- Figura 22.** Colocalización de los componentes del Inflamasoma NLRP3 en MN totales de pacientes con LLA.
- Figura 23.** Expresión de los componentes del inflammasoma NLRP3 en células MN totales.
- Figura 24.** Colocalización de los componentes del Inflamasoma NLRP3 en PMN del grupo control.
- Figura 25.** Colocalización de los componentes del Inflamasoma NLRP3 en PMN de pacientes con LLA.
- Figura 26.** Expresión de los componentes del inflammasoma NLRP3 en PMN.
- Figura 27.** Determinación de Muerte celular en neutrófilos de pacientes con LLA.
- Figura 28.** Apoptosis temprana en neutrófilos de pacientes con LLA.
- Figura 29.** Caspasas activas en neutrófilos de pacientes con LLA.
- Figura 30** Expresión de vacuolas autofágicas/lisosomales
- Figura 31** Esquema representativo del micro ambiente inflamatorio en la LLA.
- Tabla 1.** Características demográficas del grupo de estudio.
- Tabla 2.** Frecuencia de LLA por grupos de edad de la población de estudio.
- Tabla 3.** Valores de corte para las citocinas.
- Tabla 4.** Odd Ratio y valores de significancia para presentar fiebre en

pacientes con LLA, sin infección clínica aparente.

Tabla 5. Sensibilidad y Especificidad estimadas para cada citocina como prueba diagnóstica para fiebre sin infección aparente.

Tabla 6. Valores de corte para DAMPs

Tabla 7. Odd Ratio y valores de significancia para los diferentes DAMPs en LLA.

Tabla 8.. Sensibilidad y Especificidad estimadas para cada DAMP.

Tabla 9. Coeficientes de colocación de componentes del inflammasoma en células MN totales.

Tabla 10. Colocalización de componentes del inflammasoma en PMN.

ABREVIATURAS

ASC	Proteína que contiene un dominio de reclutamiento y activación de caspasas; CARD
DAMPs	Patrones moleculares asociados a daño
FAB	Franco-Americano-Británica
FUO	Fiebre de origen desconocido
HMGB1	por sus siglas en ingles High mobility group box 1
HSPs	Proteínas de choque térmico
IFN-γ	Interferon gama
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
IL-17	Interleucina 17
IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos
MN	Mononucleares
NLR	Receptores tipo-Nod
NO	Oxido nítrico
PFA	Proteínas de fase aguda
PMN	Polimorfonucleares
PRRs	Receptores de reconocimiento patrón
TGF-β	Factor transformante beta
TNF-α	Factor alfa de necrosis tumoral
TLRs	Receptores tipo-Toll
ROC	por sus siglas en inglés Receiver Operating Characteristic
ROS	Especies reactivas de oxígeno
FAP	Factor activador de plaquetas

NETs

Trampa extracelular de neutrófilos

OR

Por sus siglas en inglés Odd Ratio

1. RESUMEN

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es el cáncer más frecuente en la niñez. Los pacientes pediátricos con esta neoplasia pueden presentar neutropenia y fiebre de manera frecuente, lo que se considera una de las causas de hospitalización más común. En los pacientes pediátricos con LLA con cuadros de neutropenia y fiebre, hasta en un 60-70 % de los casos no hay foco infeccioso evidente. Actualmente se sabe que los Patrones Moleculares Asociados a Daño (DAMPs) como: HSPs, ácido úrico, proteínas S100 y HMGB1, pueden activar el sistema inmune a través de su interacción con diferentes receptores de reconocimiento patrón (PRRs), en los que se ha incluido a un complejo proteico llamado inflamasoma; dando origen a una respuesta inflamatoria a través de la síntesis y secreción de interleucinas inflamatorias e inducción de apoptosis. La hipótesis de este trabajo fue que en ausencia de microorganismos infecciosos, los cuadros de fiebre pueden atribuirse a los DAMPs que se generan por la misma leucemia y que producen una respuesta inflamatoria. Por lo que, fue de suma importancia identificar los DAMPs que estuvieran asociados al desarrollo de los cuadros de fiebre de niños con leucemia linfoblástica aguda. Se realizó un estudio transversal de casos y controles, en el Hospital Infantil de México Federico Gómez y Hospital Pediátrico Moctezuma, en el que se incluyeron 99 pacientes con diagnóstico de LLA sin infección clínica aparente y 48 pacientes no oncológicos (controles) en el periodo del 2011 al 2014 para la cuantificación de 13 mediadores inflamatorios séricos y 7 DAMPs (HSPs, ácido úrico, proteínas S100 y HMGB1). Así mismo en neutrófilos de los pacientes y controles se evaluó la expresión del inflamasoma como mecanismo de maduración de IL-1 β y los mecanismos de muerte celular tales como: apoptosis, necrosis y autofagia. Los resultados obtenidos muestran que los pacientes con LLA al diagnóstico presentan un perfil inflamatorio con incremento significativo de TNF- α , IL-6, IL-8, MCP-1, IFN- γ , IL-12 e IL-10 y disminución en la producción de TGF- β . Así como, concentraciones elevadas de los DAMPs: HMGB1 y ácido úrico y

concentraciones menores de todas las HSPs. También observamos que las concentraciones elevadas de TNF- α , IL-6, IL-8, e IL-10 son factores de riesgo para desarrollar fiebre en los pacientes con LLA, mientras que las bajas concentraciones de TGF- β , son un factor protector y que los DAMPs no están asociados a la generación de fiebre de éstos pacientes. Sin embargo, observamos que HMGB1 es un factor de riesgo para LLA., ésto implica una posible participación en el proceso inflamatorio e inducción de muerte en los neutrófilos.

Determinamos la expresión de los diferentes componentes del inflamasoma NLRP3 en células mononucleares y polimorfonucleares de los pacientes, demostrando que se incrementó su expresión y su ensamblaje en la LLA. También, demostramos la susceptibilidad de los neutrófilos de pacientes con LLA a la muerte celular por la formación de vacuolas autofágicas y por apoptosis temprana y tardía, con la presencia de caspasas activas, sugiriendo que puede ser una de las causas de la neutropenia que cursan los pacientes con LLA.

Por lo tanto, podemos concluir que en los pacientes con LLA sin infección clínica aparente, existe un ambiente inflamatorio, con activación del inflamasoma NLRP3 y un incremento de DAMPs, como HMGB-1 y ácido úrico y que la fiebre de los pacientes con LLA, está asociada a las citocinas inflamatorias TNF- α , IL-6, IL-8, e IL-10, pero no a los DAMPs estudiados. También que las concentraciones elevadas de HMGB-1 son un factor de riesgo para LLA y que la neutropenia se debe a una mayor sensibilidad de los neutrófilos a muerte celular por apoptosis temprana y autofagia.

2. ABSTRACT

Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) is the most common childhood cancer. Pediatric patients affected with this cancer may have constant neutropenia and fever, considering this one the most common causes of hospitalization. On pediatric patients, up to 60-70% of cases, didn't show obvious source of infection. It is now known that damage associated molecular patterns (DAMPs) such as HSPs, uric acid, protein S100 and HMGB1 can activate the immune system through its interaction with different Pattern Recognition Receptors (PRRs), which include a protein complex called inflammasome; giving rise to an inflammatory response mediated by the synthesis and secretion of inflammatory interleukins and induction of apoptosis.

Therefore, it is extremely important to identify DAMPs which are involved in the development of fever in children with acute lymphoblastic leukemia. The study was conducted at the Children's Hospital of Mexico "Federico Gómez" and at the Pediatric Hospital "Moctezuma" in Mexico City. For the study, 99 serums from patients without apparent clinical diagnosis and 48 from non-oncological patients (controls) were analyzed in the period from 2011 to 2014. We confirmed that patients with ALL included in this study, had no apparent clinical infection at diagnosis. We analyzed their serum for the determination of inflammatory mediators and different DAMPs (HSPs, uric acid, and HMGB1 protein S100). The expression of inflammasome, cells death and active caspase of neutrophils from patients with ALL were evaluated. The presence of autophagic vacuoles was evaluated also.

The results show that patients with ALL at diagnosis have an inflammatory profile, with an association of fever at risk for developing high would find cytokines: TNF- α , IL -8 and IL -10 and TGF- β protection association regarding the febrile process in ALL. We found Elevated DAMPs, HMGB1 and uric acid were found in the serum patients with ALL; implying a possible role in the

inflammatory process. However, no association of molecules were found associated with fever; we also determined the expression of the different components of the inflammasome NLRP3 in polymorphonuclear and mononuclear cells of patients, showing that expression of its components and possibly its assembly in ALL.

Finally, we demonstrated the susceptibility of neutrophils in patients with ALL to cell death via caspases, also, of the formation of autophagic vacuoles suggesting that it may be a cause of neutropenia that present some patients with ALL.

Therefore, we can conclude that in patients with ALL without apparent clinical infection, there is an inflammatory environment, with activation of the inflammasome NLRP3 and increased DAMPs, as HMGB-1 and uric acid. Also, the fever patients LLA, is associated with inflammatory cytokines TNF- α , IL-6, IL-8, and IL-10, but not to DAMPs studied. Finally, that high concentrations of HMGB-1 are a risk factor for LLA neutropenia and increased sensitivity to neutrophil cell death it is due early apoptosis and autophagic.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Leucemia Linfoblástica Aguda

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es una alteración citogenética mono/oligo clonal que origina la proliferación anormal de células precursoras de la serie linfoide (1). Es la neoplasia maligna más frecuente en la edad pediátrica con una incidencia a nivel mundial entre 3 y 4 pacientes por cada 100,000 habitantes por año (2, 3). En México, la incidencia es mayor. Se estima 49.5 casos nuevos por millón de habitantes al año, la edad de inicio es alrededor de tres a cinco años (4, 5).

Existen algunas enfermedades en las cuales la incidencia de la LLA es mayor, como en el síndrome de Down, el síndrome de Bloom, la anemia de Fanconi y el síndrome de ataxia-telangiectasia (6). Así mismo, algunos factores se han considerado predisponentes a LLA, como son la exposición a insecticidas, a radiaciones y al humo del tabaco durante la gestación (2).

El cuadro clínico de la LLA es variable. Sin embargo, los signos y síntomas más comunes son la palidez de tegumentos¹, la presencia de hematomas², petequias³ y hepatomegalia⁴, neutropenia y fiebre. En los estudios de laboratorio se observan alteraciones en la biometría hemática (anemia, trombocitopenia, leucopenia o leucocitosis) y pueden existir datos de lisis tumoral, que se caracteriza por que los pacientes con LLA presentan, hiperuricemia, hiperpotasemia, hiperfosfatemia, hipocalcemia y uremia (7).

¹ Tegumento: Revestimiento epitelial que sirve de protección externa al cuerpo de un animal

² Hematoma: Colección de sangre extravasada incluida en los tejidos de la piel o en un órgano

³ Petequias: (*petechiae*) Mancha muy pequeña de color rojo o púrpura en la piel y corresponde a una hemorragia localizada en la dermis.

⁴ Hepatomegalia: (*hepatomegaly*) Aumento de tamaño del hígado.

El diagnóstico se hace con base en las manifestaciones clínicas, exploración física y hallazgos de laboratorio. El diagnóstico de certeza se establece al encontrar más del 25% de blastos de características linfoides en la médula ósea y se clasifica con base en los siguientes aspectos (6,8):

Morfológico. En base a los criterios internacionales de la agrupación Franco-Americano-Británica (FAB).

Inmunológico. De acuerdo al porcentaje de positividad de los marcadores celulares: precursoras de células B (pre B tempranas, pre B y pre B transicional); B maduras o de células T.

Citogenética. Alteraciones numéricas, en grupos de ploidía y alteraciones estructurales que se dividirán en traslocaciones, deleciones e inversiones.

3.2 Fiebre y neutropenia en niños con LLA.

Los pacientes pediátricos con LLA presentan neutropenia y fiebre de manera frecuente, considerándose una de las causas de hospitalización más comunes. La definición de neutropenia en pacientes oncológicos corresponde a la cuenta de neutrófilos menor a 500 células/mm^3 . La disminución en la cuenta de neutrófilos no se sabe con certeza a que se deba, es probable que pueda deberse a la inadecuada producción en la médula ósea o la elevada destrucción de éstos en la circulación, incrementándose por fármacos que activan a los procesos de apoptosis o necrosis (9). En los pacientes pediátricos, hasta en un 60-70 % de los casos no hay foco infeccioso evidente, cerca de la mitad de los pacientes con neutropenia y fiebre se dice que tienen una infección establecida oculta y alrededor del 10% al 30% tienen bacteriemia. Distintos factores predisponen al desarrollo de una infección; la neutropenia es por sí misma, el principal factor de riesgo. Además del número de neutrófilos circulantes, la tasa de disminución de la cuenta absoluta de neutrófilos y la duración de la neutropenia, son factores importantes. Una disminución rápida y prolongada (cuenta de neutrófilos menor a $500/\text{mm}^3$ en 10 días) es un factor de riesgo muy importante para infecciones. Además de los cambios cuantitativos de los neutrófilos, las anormalidades en la función

fagocítica u otras deficiencias de la respuesta inmune, pueden aumentar el riesgo de infección en el hospedero neutropénico (10,11).

La fiebre en el paciente oncológico se define como la temperatura oral mayor o igual a 38.3 °C en una sola toma o el aumento de la temperatura corporal por arriba de 38 °C grados por un lapso mayor o igual a una hora. Es un fenómeno común en los pacientes con cáncer. Es la manifestación más frecuente de una infección. Sin embargo, también puede ser producida por trastornos vasculares, como embolia pulmonar e infarto de miocardio, por enfermedades inmunes, por fármacos y por trastornos del tejido conectivo, por neoplasias, en especial en linfomas y tumores sólidos, y puede presentarse en enfermedades metabólicas como crisis tiroidea y en traumatismos. También existe fiebre de origen desconocido (por sus siglas en ingles FUI) (12, 13).

La producción de fiebre en los seres humanos es un fenómeno complejo, mediado por la liberación de varias citocinas pro-inflamatorias, principalmente interleucina 1 (IL-1), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e IL-6. Éstas citocinas, además de inducir fiebre, comparten algunas otras propiedades: inducen la síntesis hepática de reactantes de fase aguda y activan células T y B; y estimulan la producción de otras interleucinas, que a su vez inducen la activación de neutrófilos y linfocitos. Así mismo estimulan la migración de monocitos y activan las funciones de los neutrófilos maduros, como la quimiotaxis, la fagocitosis y la destrucción bacteriana. Así mismo, la IL-1 y el TNF- α participan en el choque séptico (14).

En los pacientes oncológicos se considera que la fiebre puede estar causada por otros factores además de la infección, como son la administración de medicamentos (bleomicina y arabinósido C), la misma actividad neoplásica, las reacciones alérgicas y la administración de productos sanguíneos. Sin embargo, no existe suficiente evidencia científica que lo avale y existen algunos datos que orientan hacia un proceso infeccioso, como dolores musculoesqueléticos mal definidos, inflamación e incremento de moléculas de fase aguda (13, 15).

Recientemente se ha descrito que la inflamación que lleva al síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, a la sepsis y a la falla orgánica múltiple, puede estar mediada no solo por microorganismos infecciosos sino por factores propios del hospedero en los que se incluyen microorganismos de flora normal y alarminas. Las alarminas son todos los productos liberados durante la necrosis y la destrucción celular, denominándose a todos ellos, Patrones Moleculares Asociados a Daño (DAMPs) (14).

3.3 Patrones moleculares asociados a daño (DAMPs)

Los DAMPs ó alarminas son moléculas endógenas que son liberadas rápidamente por las células del organismo, después de una muerte celular no programada, situación de estrés ó daño tisular. Se sabe que las células del sistema inmune también pueden ser inducidas a producir y liberar DAMPs sin morir, mediante el uso de sistemas de secreción especializados o por el retículo endoplasmático (ER) y vía de secreción aparato de Golgi. Estas moléculas pueden reclutar y activar células de la respuesta inmune innata y promover respuestas de inmunidad adaptativa (16,17). Ejemplo de DAMPs son: Proteínas de choque térmico, proteínas S100, ácido úrico y HMGB1 (Figura 1).

Los DAMPs pueden ser de origen proteico ó lipídico, e incluye a azúcares, metabolitos y ácidos nucleicos y pueden ser detectados por el sistema inmune y producir una respuesta inflamatoria al ser reconocidos por los receptores de reconocimiento patrón (PRRs), entre los que se encuentran los receptores tipo-Toll (TLRs) y los receptores tipo NOD (NLRs). Los NLRs pueden estar formando parte de un complejo proteico denominado inflamasoma, en el cual se lleva a cabo la maduración de la citocina proinflamatoria IL-1 β , la cual se sabe es causante de fiebre (17, 18). Sin embargo, a la fecha no se conoce la participación de los DAMPs en la inducción de la neutropenia y la fiebre y el mecanismo involucrado en estos procesos.

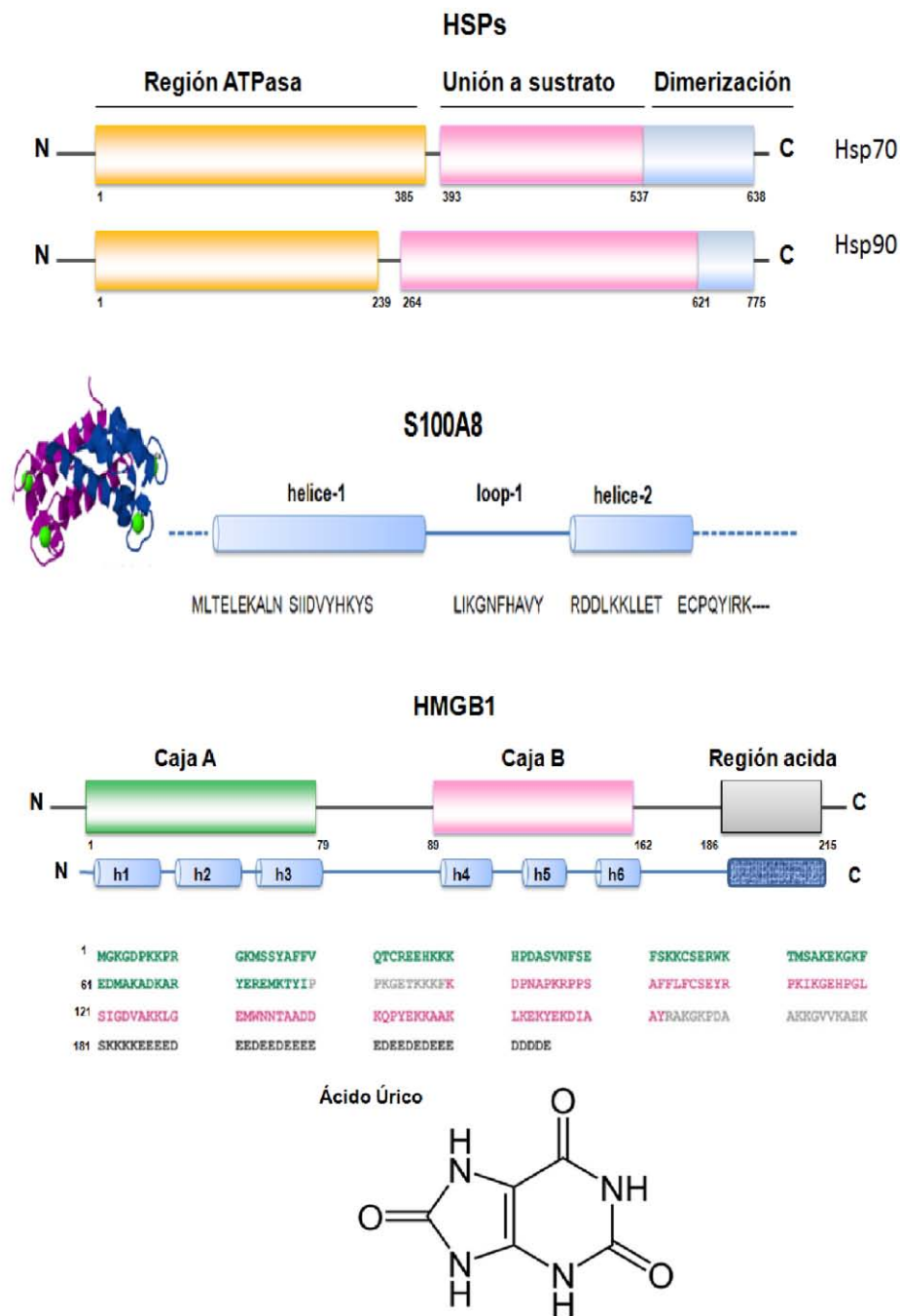


Figura 1. Estructura de DAMPs. Representación de la estructura proteica de S100A8, HMGB1, HSPs y la estructura química del ácido úrico (Modificado de 19-23).

3.3.1 Proteínas de Choque Térmico (HSP)

Las HSP son una familia de proteínas que están presentes en la mayoría de las células y se clasifican según su peso molecular (p. ej., Hsp70 por su peso de 70 kDa). Estas proteínas se producen en grandes cantidades por las células como respuesta al estrés mecánico, a la estimulación con citocinas o a las altas temperaturas, ésto como mecanismo de protección frente a estas diferentes condiciones adversas (24). Además, en condiciones normales las HSP actúan como chaperonas, facilitando el ensamblaje correcto de las proteínas, así como la translocación de oligómeros, pero también favorecen la eliminación de las proteínas que están dañadas de forma irreversible.

Las proteínas de choque térmico son consideradas “alarminas” cuando son liberadas en diferentes situaciones de stress (traumatismo, cirugía mayor y quemadura). Se ha reportado que las Hsp60, Hsp70 y Hsp90 tienen la capacidad de activar la respuesta inmune induciendo la liberación de citocinas como TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-12, y la liberación de óxido nítrico (NO) y quimiocinas C-C por monocitos, macrófagos y células dendríticas (25). Además, puede inducir la maduración de células dendríticas (26).

Por ejemplo, en pacientes con sepsis se encuentran niveles altos de Hsp70, pero niveles elevados significativamente también fueron encontrados en el cerebro de pacientes muertos y en pacientes con arresto cardiaco resucitados. En un grupo de pacientes los niveles fueron similares entre sobrevivientes y pacientes que murieron después de desórdenes neurológicos, mientras que niveles significativamente altos fueron detectados en pacientes que murieron de un shock refractario. En esos pacientes se observó una correlación entre HSP70 y endotoxina, IL-6, IL-8, sTREM-1 o el receptor soluble del TNF- α . No hubo correlación con IL-10, lactato, o la existencia de infección. Sin embargo, existen datos que indican que las HSPs confieren protección contra ARDS (por sus siglas en inglés Acute respiratory distress syndrome), daño por reperfusión-izquemia y daño pulmonar inducido por sepsis (27, 28).

Dentro de las HSP, la Hsp90 es una proteína chaperona que participa en el correcto ensamblaje de múltiples proteínas, incluidos mediadores de señales de transducción y reguladores transcripcionales (29) y Hsp72 es inducible bajo condiciones de estrés (30). Se ha descrito que la expresión de Hsp72 en células tumorales o células infectadas por virus, es importante para la generación de respuesta inmune celular específica (31). Hsp72 se expresa en la membrana plasmática de células tumorales de diferentes tipos de cáncer y estimula de forma específica la respuesta inmune. Estas observaciones sugieren que esta proteína modula una vigilancia inmune que activa linfocitos T, proporciona una línea de defensa adicional contra la infección y transformación maligna y aumenta la sensibilidad a lisis mediada por células NK efectoras (32). Adicionalmente, se ha evaluado la expresión de Hsp72 relacionada con infecciones virales. Se ha descrito un incremento en la expresión de Hsp72 en linfocitos B transformados por el virus de Epstein Barr (EBV), dependiente de la presencia del virus (32). Sin embargo, en estos estudios no son claras las diferencias en la expresión de Hsp72 entre células infectadas y no infectadas, y es posible que Hsp72 esté alterada como consecuencia del estrés dado por la infección viral o por la transformación neoplásica (34).

Por otro lado la función principal de la Hsp27 es proporcionar termotolerancia, citoprotección, y supervivencia celular bajo condiciones de estrés. Sin embargo la expresión de Hsp27 se incrementa en algunas células tumorales, de forma que se ha especulado que las concentraciones plasmáticas de Hsp27 pueden ser útiles para evaluar la progresión de la enfermedad teniendo un papel importante en algunas neoplasias (35). La Hsp27 disminuye la actividad proinflamatoria del TNF- α actuando como un regulador negativo de la vía del NF- κ B (36). El papel citoprotector de la HSP27 se manifiesta también en el ámbito cardíaco, ya que animales transgénicos que sobreexpresan la Hsp27 humana, presentan una protección frente a la lesión por isquemia/reperfusión cardíaca.

Hsp60 en eucariotas se considera normalmente una chaperona mitocondrial (también llamado Cpn60), pero en los últimos años se ha observado que también se produce en el citosol, en la superficie de la célula, en el espacio extracelular y se encuentra en la sangre periférica. En modelos murinos se ha comprobado que Hsp60 contribuye a la proliferación celular y al proceso de invasión en el cáncer de mama (37).

3.3.2 Proteínas S100

Las proteínas S100 son proteínas de tamaño molecular pequeño, unidas a calcio, que actúan como reguladores intracelulares en la fosforilación mediada por proteínas cinasas y en la actividad enzimática, además funcionan como proteínas de señalización extracelular en los procesos de diferenciación, apoptosis, homeostasis de Ca^{2+} , metabolismo energético, inflamación, migración e invasión a través de la interacción con una variedad de proteínas, incluyendo enzimas, subunidades del citoesqueleto, receptores, factores de transcripción y ácidos nucleicos (38).

Como señales extracelulares, se ha demostrado que las proteínas S100 regulan la proliferación celular, la diferenciación, la supervivencia y la migración en condiciones normales y patológicas, a través de la activación de receptores de superficie, actuando de manera autocrina y paracrina. Se han descrito más de 20 miembros de esta familia de proteínas, pero tres de ellas, S100A8, S100A9 y S100A12 están específicamente unidas a las funciones de la inmunidad innata por su expresión en el citoplasma de los fagocitos. Son liberadas por fagocitos en respuesta a estrés celular. Algunas funciones extracelulares están relacionadas a los mecanismos anti-infecciosos de defensa del hospedero, pero la principal característica de las proteínas S100 específicas de fagocitos es ser liberadas por estímulos pro-inflamatorios. S100A8 y S100A9 inducen una respuesta inflamatoria y trombogénica en células endoteliales humanas. Adicionalmente, inducen numerosas citocinas inflamatorias, así como también moléculas de adhesión, tales como: VCAM-1 e ICAM-1. Están significativamente sobre-expresadas en el sitio de

inflamación y existe una fuerte correlación entre sus concentraciones en suero y la inflamación (36).

3.3.3 Ácido Úrico

El ácido úrico es un compuesto orgánico de carbono, nitrógeno, oxígeno e hidrógeno. Es un producto de desecho del metabolismo de nitrógeno en el cuerpo humano y se encuentra en la orina en pequeñas cantidades. La mayor parte del ácido úrico se disuelve en la sangre y viaja a los riñones, desde donde sale a través de la orina. Si el cuerpo produce demasiado ácido úrico o no lo elimina eficientemente, puede generar alteraciones en el organismo (39). Los altos niveles de ácido úrico en el cuerpo se denominan hiperuricemia y recientemente se identificó a los cristales de urato monosódico como “señales de peligro ó alarminas”. Éstos cristales son liberados de células muertas (27). En enfermedades como artritis reumatoide juvenil y gota se ha demostrado que el ácido úrico juega un papel importante en el desencadenamiento de fiebre de origen desconocido, debido a la hiperuricemia (40, 41). Se demostró que los mecanismos moleculares de la inflamación inducida por cristales de urato monosódico involucran al inflamasoma NALP3 activado por la caspasa-1, resultando en la producción de IL-1 β e IL-18 activas (29).

3.3.4 HMGB-1

HMGB-1 es una proteína nuclear altamente conservada que en condiciones normales se une al DNA. Existe en forma membranal y extracelular, interactúa con plasminógeno y con un activador de plasminógeno de tipo tisular. La HMGB-1 se produce durante el stress celular y se encuentra en el plasma. Actúa como una molécula de señal de peligro interna o “alarmina”. HMGB-1 es un mediador tardío de la sepsis, funciona como una citocina y estimula la liberación de numerosas citocinas pro-inflamatorias. En monocitos humanos se ha demostrado que desempeñan un papel importante en la respuesta a la lesión estéril, tal como el choque hemorrágico y la lesión por isquemia/reperfusión (42). HMGB1 se libera de forma activa por los

macrófagos, y puede tener modificaciones postraduccionales, como acetilación, fosforilación y metilación (43, 44). También, pueden sufrir modificaciones redox en cisteínas, que regulan su actividad de liberación (activa y pasiva), la interacción con su receptor y la señalización de eventos subsiguientes. La oxidación de HMGB1 se produce en las células necróticas, y también durante la apoptosis, que se asocia con la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) por las mitocondrias (45). Otra característica de HMGB1, es que al igual que las endotoxinas bacterianas, activa los leucocitos a través del TLR4. Parece ser el mediador que une la apoptosis y la letalidad durante la sepsis (29).

3.4 Mecanismos de activación del sistema inmune por DAMPs

Las células del organismo están equipadas por un gran número de receptores de reconocimiento patrón, entre los que se encuentran los TLRs, los NLRs, los receptores tipo lectina C, y RAGE (por sus siglas en inglés receptor for advanced glycation endproducts), que tienen la capacidad de reconocer diferentes PAMPs y de manera interesante algunos DAMPs aumentando y activando la respuesta inflamatoria (46,47) (Figura 2).

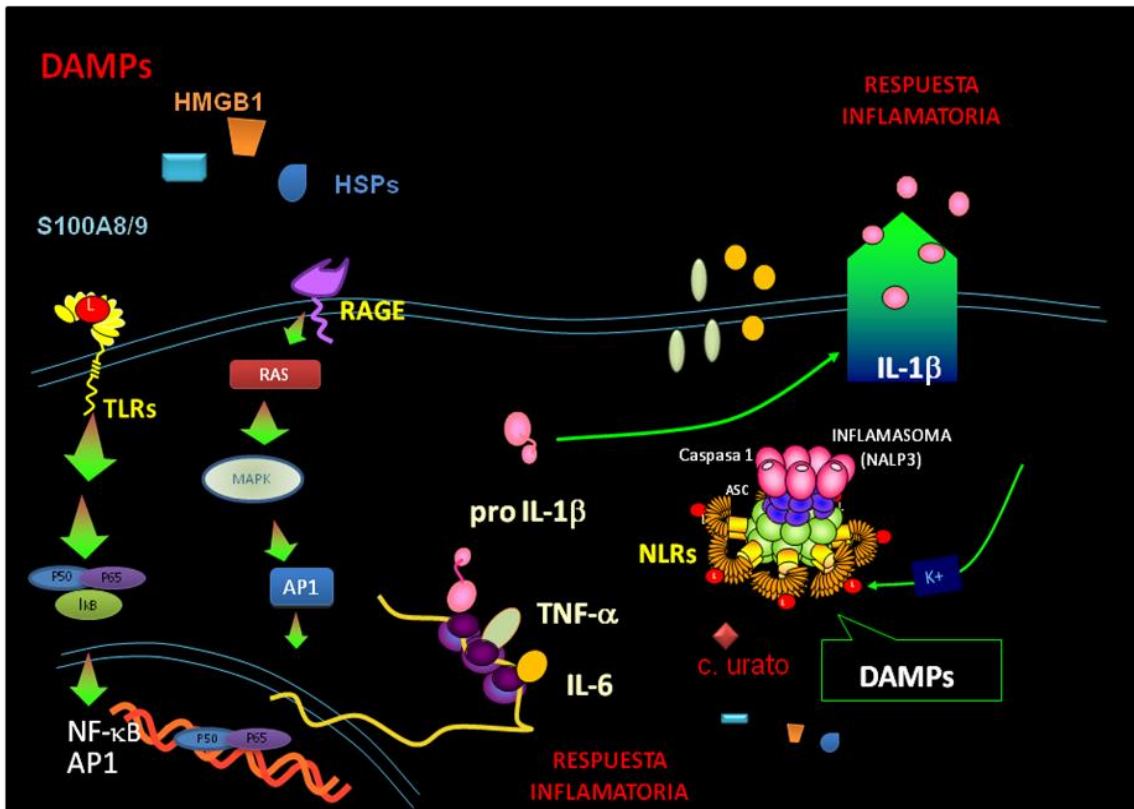


Figura 2. Reconocimiento de DAMPs por diferentes PRRs. El reconocimiento de los DAMPs por los PRRs de manera análoga puede activar la respuesta inmune y aumentar el proceso de inflamación a través de la inducción de citocinas.

3.4.1 Inflamasoma

Los NLRs pertenecen a una familia de receptores citoplasmáticos compuesta de 22 miembros los cuales incluyen a los 5 receptores de la subfamilia de NOD, 14 miembros de la subfamilia NALP, IPAF (Factor activador de proteasas ICE), NAIP (Proteína inhibidora de apoptosis neuronal) y CIITA (Transactivador del complejo principal de histocompatibilidad clase II). La familia de los NLRs tiene una composición estructural única, con un dominio central de unión a nucleótidos (NBS o NOD) denominado NATCH (dominio de oligomerización), el cual se encuentra entre un dominio N-terminal de unión a proteínas [CARD (dominio de reclutamiento a caspasas)], PYD (dominio pirina) o BIR (del inglés Baculovirus IAP repeat) y un dominio C-terminal con repeticiones de 22-28 residuos ricos en leucina (LRR), el cual es el dominio de reconocimiento del ligando (48-50). Los dominios CARD y PYD también son miembros de la superfamilia de muerte (DF), por sus siglas en inglés domain-fold, que incluye a los dominios de muerte así como también a sus efectores y

se caracterizan por tener 6 α -hélices que están altamente empaquetadas, ambos dominios median interacciones homofílicas entre otras moléculas atraídas por estos motivos (51, 52).

Recientemente se observó que la subfamilia de los NALPs, pertenecientes a la superfamilia de los receptores NLR, forman un complejo multiproteico de aproximadamente 700 kDa denominado inflammasoma, cuando interactúan con la caspasa 1 y la molécula ASC (del inglés Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD). Estos complejos proteicos se expresan en células del sistema inmune tales como granulocitos, monocitos, células dendríticas, linfocitos B y T (52). En el inflammasoma se lleva a cabo la activación de las caspasas inflamatorias (caspasa 1 y caspasa 5) que participa en la maduración de las citocinas proinflamatorias IL-1 β , IL-18, IL-33 (48, 49, 54).

3.4.2 Inflammasoma NLRP2/3

NLRP3 ó NALP2/3 está conformado por NALP2 ó 3 y CARDINAL (CARD inhibidor de ligandos que activan NF- κ B). El Inflammasoma NALP3 (también conocido como cryopyrin, NLRP3, CIASI, PYPAF1 y CLRL1) se ha visto distribuido en tejidos y su expresión es más restringida, se expresa principalmente en células mononucleares, neutrófilos, en piel y ojos (51). Entre los ligandos descritos para este receptor se encuentran el LPS, la peptidoglicana, el DNA de bacterias y virus, toxinas microbianas y en general bacterias (*S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes*) o virus (Sendai, Influenza) y DAMPs tales como: especies reactivas del oxígeno, ATP (vía receptores P2X7) etc. También se ha reportado al urato de monosódico (MSU) y dihidrato fosfatasa de calcio (PPD) como ligandos que pueden activar el inflammasoma NLRP3. (48, 49, 55).

3.5 Mecanismos moleculares de activación del Inflamasoma y su participación en LLA

En la leucemia linfoblástica aguda (LLA) se conoce que IL-1 β se produce bajo condiciones de infección. Sin embargo, hasta el momento no se ha descrito la participación y los mecanismos de activación del inflamasoma en esta y otras patologías. En estudios recientes de nuestro laboratorio encontramos que en los pacientes con LLA existe producción de IL-1 β en ausencia de infecciones clínicamente declaradas. Se ha propuesto que el inflamasoma puede ser activado de manera directa o indirecta, en base a los diferentes ligandos que éste complejo proteico tiene; dando idea de cómo pudiera estar funcionando dicho complejo en la LLA. Un modelo implicado en la activación del inflamasoma es la activación de los receptores P2X7R, los cuales son canales de iones dependientes de ATP, que conducen potasio a través de la membrana y que a su vez pueden abrir poros de panexina 1, generando de esta manera especies reactivas de oxígeno, así como también altas concentraciones de potasio intracelular; que son detectados por el inflamasoma y generan la oligomerización de receptores NLRs y reclutamiento de ASC y caspasa 1 o 5 (48). En el caso de LLA se sabe que hay altas concentraciones de ácido úrico así como otros DAMPs por lo que consideramos que estos DAMPs podrían estar induciendo la activación del inflamasoma.

3.6 Citocinas proinflamatorias inductoras de fiebre

3.6.1 Factor alfa de necrosis tumoral (TNF- α)

El TNF- α fue la primera citocina identificada en la patogénesis del choque séptico. Desde el punto de vista estructural es una proteína entre 21.5-28 kDa, producida principalmente por los macrófagos y tiene la capacidad de activar monocitos, macrófagos y neutrófilos y de inducir la producción de proteínas de fase aguda por medio de la IL-6 (56).

Dos receptores diferentes en la superficie celular han sido descritos para el TNF- α . El tipo I tiene un peso molecular de 55 kDa y el tipo II un peso molecular de 75 kDa. La estimulación de esos receptores produce citotoxicidad, activación del factor de transcripción NF-kB así como la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales. Ambos receptores también se presentan en forma soluble y conservan su afinidad por el TNF- α . Los receptores solubles compiten con los receptores de la superficie celular por la unión al TNF- α libre, este es inactivado cuando se une al receptor soluble. La generación de estos receptores solubles representa un mecanismo de respuesta antiinflamatoria (57); Numerosos estudios han demostrado la presencia de concentraciones elevadas de TNF- α en la sepsis clínica y en el choque séptico. (58, 59), y hasta la fecha no existen evidencias de que ésta citocina se encuentre en suero en ausencia de infección. TNF- α en humanos induce fiebre, escalofríos, acidosis metabólica, leucopenia, trombocitopenia, taquicardia e hipotensión con decremento de la resistencia vascular periférica. En condiciones de daño por reperfusión isquémica hay un incremento ésta citocina inflamatoria por el DNA mitocondrial liberado generando un ambiente inflamatorio importante (60).

3.6.2 Interleucina 1 beta (IL-1 β)

La interleucina-1beta (IL-1beta) es un polipéptido de 17 kDa producido por los fagocitos mononucleares y los neutrófilos. Actualmente a la IL-1 β y al TNF- α se les reconoce un papel protagónico en la cascada de citocinas que se liberan en la sepsis. La mayoría de los efectos biológicos que induce el TNF- α son también reproducibles con la IL-1 β . La liberación de IL-1 β se incrementa en los modelos experimentales de sepsis y choque séptico, tanto en animales como en humanos (58), y estos niveles elevados de ambas citocinas se correlacionan también con una mortalidad elevada. Al igual que sucede con la endotoxina, la administración de TNF- α a humanos y animales se acompaña de concentraciones circulantes incrementadas de IL-1 β (61). Las concentraciones elevadas de IL-1 β se han observado en pacientes con sepsis meningocócica y esto se ha correlacionado con la severidad de la meningococemia, el choque séptico y la muerte (62).

3.6.2 Interleucina-6 (IL-6)

La IL-6 es una proteína de 21 kDa producida por los monocitos activados, macrófagos, células endoteliales, fibroblastos y linfocitos B y T activados. Cuando esta citocina se administra a los animales produce síntomas clínicos ligeros (fiebre y escalofríos), pero estos no se acompañan de las alteraciones hemodinámicas ni la toxicidad observada con el TNF- α y la IL-1 β .

La IL-6 no activa a las células endoteliales pero en la presencia de su receptor soluble, que se encuentra en el plasma, induce quimiocinas como la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1) y la IL-8 que estimulan el reclutamiento de los neutrófilos (63). También en modelos experimentales de isquemia-reperfusión inducida en ratones se han detectado efectos nocivos de la IL-6. Estos efectos adversos que produce la IL-6, pueden ser la explicación de por qué muchos investigadores han señalado que los niveles circulantes elevados de esta citocina, se correlacionan con la severidad de la

sepsis y el pronóstico de muerte en los pacientes; muchos consideran a la IL-6 como una citocina proinflamatoria (56, 63).

La mayoría de las actividades de la IL-6 están asociadas con el control de la inflamación como resultado de su capacidad potente de inducir la producción de proteínas de fase aguda por el hígado (64) las cuales, son esencialmente protectoras y limitan el proceso inflamatorio a través de su actividad antiproteasa y su capacidad de secuestrar. La IL-6 también libera el antagonista del receptor de la IL-1 β y en ese contexto, es interesante destacar que éste ha sido identificado recientemente como un producto de los hepatocitos y regulado por las citocinas proinflamatorias, al igual que las proteínas de fase aguda (PFA), como la proteína C reactiva, la alfa1 anti tripsina y la glicoproteína ácida alfa1, entre otras. por lo cual al antagonista del receptor de la IL -1 β se le considera hoy día también como una PFA (65). Las PFA protegen contra la endotoxina meningocócica e inclusive pueden reducir la letalidad del TNF- α . Además, la IL-6 puede producir resorción ósea, atrofia muscular, anemia y puede estimular a los neutrófilos para la producción del factor activador de las plaquetas (FAP) y del anión superóxido.

3.7 Muerte celular en neutrófilos

Los neutrófilos, también denominados micrófagos o polimorfonucleares (PMN), son el tipo de leucocito más abundante en sangre periférica en el ser humano, constituyendo del 40 al 70% de los en condiciones normales (66). Los neutrófilos al igual que los macrófagos y monocitos, son participes de la aparición, progresión y resolución de la inflamación, (67). Son la primera línea de defensa del sistema inmune; se caracterizan por su capacidad antimicrobiana y antifúngica otorgada por sus componentes celulares; como péptidos antimicrobianos y enzimas proteolíticas específicas de neutrófilos. Actualmente se sabe que las proteasas derivadas de los neutrófilos pueden activar a diferentes citocinas, como la familia de IL-1 e IL-36 para dar inicio al proceso inflamatorio (68).

Los procesos de muerte que se conocen hasta el momento que llevan a cabo los neutrófilos son la apoptosis, la necrosis y especialmente la NETosis, la cual es una forma especial de la muerte ejecutada por los neutrófilos, en el que la cromatina nuclear, las histonas, y proteínas antimicrobianas son liberadas de la célula, formando lo que conocemos como trampas extracelulares de neutrófilos (NETs). La NETosis se induce por estímulos tales como los agentes patógenos y especies reactivas de oxígeno (ROS), sin embargo las citocinas IFN- α , IL- 8, IL-1 β , PAF, y TNF- α también pueden inducirla (69, 70).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los cuadros de neutropenia y fiebre representan la complicación más común en el tratamiento de los pacientes con LLA. La morbilidad de estos pacientes es elevada, el costo del tratamiento es alto y se disminuye la calidad de vida, retrasando la aplicación de la quimioterapia y aumentando el riesgo de tener una respuesta inflamatoria sistémica. Lo que representa un problema grave en el grupo de niños que padecen la neoplasia más común en la infancia. En estos pacientes está indicado suspender la quimioterapia y utilizar antibióticos y anti-fúngicos de manera empírica, para prevenir complicaciones graves. Sin embargo, en estos pacientes hasta en un 60-70 % de los casos no hay foco infeccioso evidente, por lo que es necesario determinar los factores que desencadenan la fiebre, en ausencia de microorganismo infecciosos y el mecanismo mediante el cual se genera la neutropenia.

5. JUSTIFICACIÓN

Los factores que desencadenan la neutropenia y fiebre en los pacientes con LLA, aún no se han determinado claramente. La identificación de patrones moleculares asociados a daño, denominados también “alarminas” o ligandos endógenos de los PRR, que pueden generar una respuesta inflamatoria en los niños con LLA, causando fiebre y neutropenia, es muy importante, ya que permitirá establecer el riesgo de los pacientes a desarrollar una respuesta inflamatoria sistémica en ausencia de agentes infecciosos. Lo cual puede ayudar a mediano o largo plazo a tomar medidas oportunas para disminuir el retraso en la aplicación de la quimioterapia, mejorando la supervivencia.

6. HIPOTESIS

Los patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) participarán en la generación de los cuadros de fiebre en la leucemia linfoblástica aguda y la neutropenia estará asociada a mayor muerte celular.

7. OBJETIVOS

Objetivo General

Identificar los Patrones Moleculares Asociados a Daño (DAMPs) que estén involucrados en el desarrollo de los cuadros de fiebre de niños con leucemia linfoblástica aguda y determinar los mecanismos de muerte celular de los neutrófilos.

Objetivos Particulares

- Determinar la concentración de citocinas pro-inflamatorias asociadas a fiebre (IL-1 β , TNF- α e IL-6) en el suero de los pacientes pediátricos con LLA.
- Determinar la concentración de citocinas y quimiocinas involucradas en el proceso inflamatorio (IFN γ , IL-10, IL8, MCP-1, IL-17, IL-4, IL-12, IL-2, TGF β) en suero de pacientes pediátricos con LLA.
- Determinar la concentración de DAMPs (HMGB1, Hsp27, Hsp60, Hsp70, Hsp90, proteínas S100 y ácido úrico) en pacientes pediátricos con LLA y su asociación con los cuadros de fiebre.
- Evaluar la participación del inflammasoma en la producción de la IL-1 β , en muestras de pacientes con LLA, y en líneas celulares de leucemia.
- Determinar los mecanismos de muerte celular de los neutrófilos.

8. DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio transversal de casos y controles.

Criterios de inclusión para casos:

- Cualquier género
- Menores de 18 años
- Pacientes que acudan al HIMFG ó al HM a partir del 2011 y cuyo diagnóstico sea de LLA.
- Que acepten participar en el estudio

Criterios de inclusión para controles

- Cualquier género
- Menores de 18 años
- Pacientes no oncológicos que acudan al HIMFG a partir del 201?? a estudios preoperatorios para corrección Ortopédica u Oftalmológica.
- Que acepten participar en el estudio

Criterios de exclusión para casos y controles:

- Pacientes que hayan recibido tratamiento con quimioterapia o radioterapia
- Pacientes con inmunodeficiencias primarias o secundarias.
- Pacientes con infecciones pre-existentes

9. METODOLOGÍA

9.1 Población de estudio

Se incluyeron pacientes con LLA del Hospital Infantil de México Federico Gómez y del Hospital Pediátrico Moctezuma en la Ciudad de México. El protocolo de Investigación fue aprobado por los Comités de Ética de ambas instituciones. El estudio se realizó en el HIMFG e incluyó a 99 niños con LLA (recién diagnóstico) del Departamento de Oncología de los dos hospitales, y 48 pacientes no oncológicos (controles) de los departamentos de Ortopedia y Oftalmología del Hospital Infantil de México Federico Gómez que acudieron a consulta y/o análisis preoperatorio.

Se confirmó que los pacientes incluidos en el presente estudio no tuvieran ningún tratamiento ó infección al diagnóstico, esto se confirmó mediante la revisión detallada de sus expedientes; confirmando que las muestras de pacientes con LLA fueran negativas para todas las pruebas microbiológicas de sangre, orina y líquido cefalorraquídeo (LCR) mediante cultivo ó PCR, durante un periodo de al menos un mes como tiempo mínimo para observar que no desarrollaran ninguna prueba positiva a microorganismo infeccioso.

9.2 Obtención y conservación de la muestra biológica.

Se tomó una muestra de sangre venosa periférica en tubos con y sin anticoagulante (BD Vacutainer®) a pacientes recién diagnosticados con LLA y antes de cualquier tratamiento y a pacientes no oncológicos (controles) incluidos en el estudio. El suero de los pacientes se obtuvo mediante centrifugación del tubo sin anticoagulante a 1,500 rpm por 10 min, la fase

sérica se recolectó en alícuotas de 500 μ l en tubos eppendorf y se almacenó a -70° C hasta su utilización.

La muestra de sangre periférica obtenida con anticoagulante, se utilizó para separar células mononucleares totales (MN) y polimorfonucleares (PMN) mediante gradiente de densidad con Lymphoprep™ (Nycomed, Oslo, Norway). Brevemente, la sangre se diluyó en una proporción 1:2 con solución salina estéril (NaCl al 0.9%) y se depositó en tubos cónicos de 15 mL estériles y libres de pirógenos, en una proporción 1:3 con Lymphoprep (Nycomed, Oslo, Norway). Se centrifugó a 1,500 rpm durante 30 min a temperatura ambiente, con desaceleración y aceleración mínima.

La fase correspondiente a los polimorfonucleares y eritrocitos, se lavo con solución de lisis (NH_4Cl 155 mM, NaHCO_3 10 mM y EDTA 0.1 mM) dos veces, a una velocidad de 1,200 rpm por 10 min, para la eliminar los eritrocitos. Finalmente, se realizó un lavado adicional con solución salina, seguido de una centrifugación a 1,200 rpm durante 5 min a temperatura ambiente.

9.3 Determinación de mediadores inflamatorios: citocinas, quimiocinas, en leucemia linfoblástica aguda.

A partir del suero de los pacientes con LLA y de los controles (pacientes no oncológicos), se determinaron las concentraciones de los siguientes mediadores inflamatorios: $\text{IL-1}\beta$, $\text{TNF}\alpha$, IL-6, $\text{IFN}\gamma$, IL-10, IL8, MCP-1, IL-17, IL-4, IL-12, IL-2, $\text{TGF}\beta$, mediante ensayo inmunoenzimático (ELISA) o mediante Ensayo Múltiple de Proteínas (xMAP), empleando kits comerciales y

siguiendo las instrucciones del fabricante (ELISAs^{et}, cat.559119, BDPharminge; HCYTOMAG-60K, Milliplex Human Cytokine USA).

9.4 Determinación de DAMPs: Proteínas de choque térmico (HSPs), S100A8, ácido úrico y HMGB1 en leucemia linfoblástica aguda.

Se cuantifico la concentración de las proteínas HSP27(Total), HSP(ps78/Ps82), HSP60, HSP70 (HSP72) y HSP90 α , mediante el análisis múltiple de proteínas (xMAP), siguiendo las instrucciones del fabricante (5-Plex Heat Shock Protein,48-615MAG, USA). La determinación de la concentración de S100A8 y HMGB1 se realizó mediante ELISA (MBS701378, ENZO, USA). Las determinaciones se realizaron por duplicado.

9.5 Expresión del inflamasoma NLRP3 en las líneas celulares RS4 y Reh.

9.5.1 Cultivo y activación de células leucémicas.

Las células RS4;⁵ (ATCC® CRL-1873™) y Reh⁶ (ATCC® CRL-8286™) fueron cultivadas en botellas de 25 cm² con medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco BRL, Life Technologies) complementado con 5,000 U/mL de penicilina-estreptomicina y 5% de suero fetal bovino (SFB, Gibco BRL, Life Technologies) hasta confluencia del 80%. Se analizó la viabilidad celular mediante la tinción con azul tripán; posteriormente, se sembraron las líneas celulares RS4 y Reh en placas de cultivo de 12 pozos a una densidad de 1x10⁶ células/mL en medio). Las células se incubaron a 37°C en un ambiente

⁵ RS4: Línea celular humana derivada de médula ósea de un paciente con leucemia linfoblástica aguda con morfología linfoblástica (ATCC)

⁶ Reh: Línea celular humana derivada de sangre periférica de un paciente con leucemia linfoblástica aguda con morfología linfoblástica (ATCC).

de 5% de CO₂ y 5% de humedad. Las células posteriormente fueron estimuladas con LPS (*Escherichia coli* 0111: B4) a las concentraciones de 10, 100 y 200 ng/ml por 18 horas.

9.5.2 Separación de proteínas por electroforesis.

Al término de cada tiempo de incubación las células estimuladas fueron lisadas con la solución de lisis 10X (Cell Signaling) complementado con los inhibidores de proteasas DTT 200mM y PMFS 100mM. El lisado fue centrifugado a 14,000 g por 10min a 4°C, se guardó el sobrenadante y las proteínas fueron cuantificadas por medio el método de Bradford con el reactivo Protein Assay (Coomassie® Brilliant Blue G-250, Bio-Rad, USA). Posteriormente las muestras obtenidas se guardaron a -80°C hasta su futuro análisis por Western-Blot.

Una vez separadas las proteínas por su peso molecular, se transfirieron del gel de acrilamida a una membrana de polivinilideno (PVDF por sus siglas en ingles) mediante transferencia húmeda. La detección de nlrp3, ASC y Caspasa 1 se realizó con el anticuerpo primario hecho en ratón anti- humano NLRP3 (ALX-804-818, Enzo Life Sciences, San Diego, CA), el anticuerpo hecho en conejo anti- humano ASC (SC-30153, Santa Cruz Biotechnology, CA) y el anticuerpo monoclonal hecho en ratón anti-humano Caspasa-1 (210-804-C100, Enzo Life Sciences, San Diego) durante 24 h a 4° C. Posteriormente se añadió el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de acuerdo a cada anticuerpo primario (Santa Cruz Biotechnology ,USA, CA).

La detección de las proteínas de interés se realizó mediante quimioluminiscencia. Las membranas una vez incubadas con los anticuerpos,

se incubaron con luminol (sc-2048, Santa Cruz Biotechnology, USA, CA). Como controles se utilizaron lisados de la línea celular pre-monocítica THP-1⁷.

9.5.3 Determinación de los componentes del inflamasoma NLRP3 por Inmunofluorescencia.

Las células mononucleares y polimorfonucleares obtenidas de pacientes con LLA y controles se colocaron en portaobjetos mediante la técnica de goteo a una densidad de 1×10^4 células y se fijaron con formaldehído al 4% por 20 min. Una vez fijadas las laminillas fueron hidratadas con PBS 1X durante 10 min, al momento de la inmunotinción. La inespecificidad fue reducida empleando bloqueador universal (Biogenex, EEUU) y entre cada incubación se realizaron lavados con PBS 1X-tween. El anticuerpo primario anti-ASC se incubó a la concentración de 1:500 durante 3 h en una cámara humedad. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se lavó y se empleó anti-especie acoplado a Alexa 488, como anticuerpo secundario. Posterior a los lavados, se incubó el anti-NALP3 (1:400) ó anti-Caspasa1 (1:200), según el caso. Los segundos anticuerpos primarios fueron reconocidos con el anti-especie acoplado a Alexa 594. Los núcleos fueron diferenciados con DRAQ7 (BioStatus, EEUU). Finalmente, se empleó PBS-glicerol como medio de montaje y se guardaron a -4 °C hasta su análisis en el microscopio confocal. Las muestras fueron analizadas en un microscopio confocal (Zeiss, Jena, Germany); Cada micrografía fue capturada usando un objetivo de 40X, zoom de 1.5, y los laser 488nm y 630 nm.

⁷ THP: Línea celular humana derivada de sangre periférica con morfología monocítica (ATCC)

9.6 Determinación de los mecanismos de muerte celular de los neutrófilos de pacientes con LLA.

9.6.1 Determinación de apoptosis y/o necrosis de neutrófilos de pacientes con LLA.

Se analizó la muerte celular de neutrófilos de pacientes por apoptosis y/o necrosis mediante citometría de flujo, empleando un anticuerpo anti-CD16b conjugado con ficoeritrina (APC) como marcador específico de los neutrófilos y anexina-ioduro de propidio para determinar el tipo de muerte celular. Se incubó 10 minutos y se hicieron las lecturas en el citómetro de flujo FACS scan Aria. Adicionalmente se evaluó la muerte celular mediante el kit de detección de Annexin V & muerte celular (Muse™ MCH100105, EDM Millipore) de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

9.6.2 Determinación de apoptosis por el método de TUNEL.

Se obtuvo células polimorfonucleares de pacientes con LLA y pacientes no oncológicos (controles); se prepararon laminillas por el método de goteo, posteriormente, se fijaron con formalina al 4% por 20 min a 4 °C. Una vez fijadas las laminillas se lavaron con PBS 1X, para proceder a realizar la medición de DNA fragmentado de cada uno de los grupos, para lo cual las laminillas se incubaron con citrato de sodio por 20 min a 0 °C y se bloqueó la actividad de peroxidasa endógena con metanol y peróxido de hidrogeno al 3% por 15 min. Posteriormente, se bloqueó la unión no específica de los anticuerpos a las células, incubando las muestras con suero normal de cerdo al 2% durante 2 h en agitación en cámara húmeda. Se incubó por 1h en condiciones de obscuridad a 37°C con nucleótidos dUDP marcados con transferasa desoxinucleótido terminal. Se adicionó el sustrato cromógeno

denominado Diamino benzidina durante el tiempo necesario de cada marcador con respecto al control negativo. Se detuvo la reacción con agua y se contratiño con hematoxilina. Las muestras, se deshidrataron bajo las siguientes condiciones: agua destilada, etanol al 70%, etanol al 90%, etanol al 100% y xilenos en baños de 2 minutos cada uno. Finalmente, las preparaciones se cubrieron con resina y se dejaron secar a temperatura ambiente.

9.6.3 Determinación de muerte celular por activación de Caspasas.

Una vez obtenidos los polimorfonucleares y mononucleares totales de pacientes y controles, se contó y observó la viabilidad mediante azul tripan (0,4% (p/v), Sigma). Una densidad de 25×10^3 células fueron utilizadas para la determinación de la activación de caspasas 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 así como de la permeabilidad de la membrana mediante el kit Multicaspasa (Muse™ MCH100109, EDM Millipore) de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

9.6.4 Determinación de muerte celular por autofagia

Para la determinación de la presencia de vacuolas autofágicas/lisosomales se determino la fluorescencia de monodansilcadaverina (MDC) en pacientes con LLA y controles. Para lo cual, se utilizó una densidad 1×10^6 células teñidas con el kit Cyto-ID® Autophagy Detection (Enzo-51031-K200, Enzo Life Sciences) por 30 min. Posteriormente se lavaron dos veces de acuerdo a las indicaciones del fabricante y se prepararon laminillas cargadas y laminillas con poly-L-lisina con 1×10^4 células, se fijaron con formaldehído al 4% por 20 min y

se lavaron dos veces, por último se montaron las laminillas y se guardaron a 4 °C hasta su análisis en el microscopio confocal (Leica TSC8).

9.7 Análisis estadístico

Las determinaciones de todos los mediadores inflamatorios y de los DAMPs se realizaron por duplicado. Los resultados de los pacientes con LLA se compararon con un grupo control aplicando la prueba U de Mann-Whitney utilizando el paquete estadístico IBM SPSS (paquete estadístico para ciencias sociales, Inc. Versión 22.0, Chicago IL, USA). Los resultados se graficaron con el programa Graph Pad Prism 5. Los resultados de los pacientes con LLA y fiebre fueron comparados con los de LLA y no fiebre mediante la prueba U de Mann-Whitney.

En las micrografías obtenidas de pacientes con LLA y de controles en el microscopio confocal (Zeiss, Jena, Germany), se evaluó la intensidad media de fluorescencia (MIF) y el porcentaje de colocalización de cada una de las células presentes en 5 campos elegidos al azar para cada caso.

10. RESULTADOS

Para la determinación de las citocinas y DAMPs involucrados en la leucemia, así como en los cuadros de neutropenia y fiebre, se incluyeron 99 pacientes cuyo diagnóstico fue LLA, considerando los criterios de inclusión y exclusión previamente mencionados. Los datos demográficos que se muestran en la Tabla 1 corresponden a 39 pacientes con LLA del Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG) y 60 pacientes del Hospital Pediátrico Moctezuma. Así también incluye 48 pacientes no oncológicos del HIMFG.

Observamos que la LLA fue más frecuente en los niños (64%), que en las niñas (36%) y la edad promedio fue de 7.5 años. Debido a que la edad de los niños con LLA fue desde menos de un año hasta 17, se consideró conveniente determinar la frecuencia de la LLA por etapas de 5 años, observando que fue más frecuente en los niños de 1 a 5 años (Tabla 2).

La LLA fue clasificada en base a la célula progenitora que la originó. Así, el inmunofenotipo más frecuente fue el B con un 66.7 % seguido del T con 14.6 % y un 3.1 % representa a las células precursoras ó población blástica que coexpresa simultáneamente marcadores antigénicos mieloides y linfoides (Tabla 1 y Figura 3). En el 16% de los pacientes no pudo clasificarse la LLA, debido a que 15 pacientes no fueron clasificables por la expresión de sus marcadores de superficie y de 3 pacientes no se obtuvo el dato. Por otro lado, el 34.3 % de los pacientes con LLA presentó fiebre al diagnóstico y de éstos solo el 50 % presentó neutropenia (17 pacientes de 34) (Tabla 1 y Figura 4).

Tabla 1. Características demográficas del grupo de estudio.

	LLA	PACIENTE NO ONCOLOGICOS
N	99	48
Genero F/M	40/59	23/25
Edad (años)	7.5 (0.25-17)	9.14 (5-17)
Diagnóstico o Servicio	Leucemia linfoblástica aguda	Oftalmología Ortopedia
Clasificación inmunológica	Linaje B = 64 Linaje T = 14 Bifenotípica = 3 No clasificable = 18	
Fiebre	34	
Fiebre y neutropenia	17	

Tabla 2. Frecuencia de LLA por grupos de edad de la población de estudio

Grupos de edad	Frecuencia		
	LLA	Control	Porcentaje
Menores de 1 año	3	0	2.0
1 a 5 años	40	13	36.0
6 a 10 años	22	12	29.2
11 a 15 años	29	13	28.6
Más de 15 años	2	4	4.1

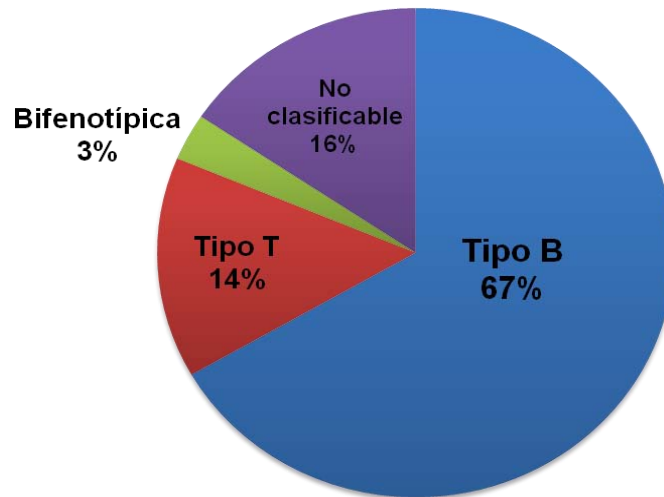


Figura 3. Inmunofenotipos de pacientes con LLA. Representación gráfica de los porcentajes de los inmunofenotipo en el grupo con LLA. Fenotipo de células precursoras B en azul, precursora de tipo T en rojo, precursoras bifenotípicas en verde y no clasificables en morado.

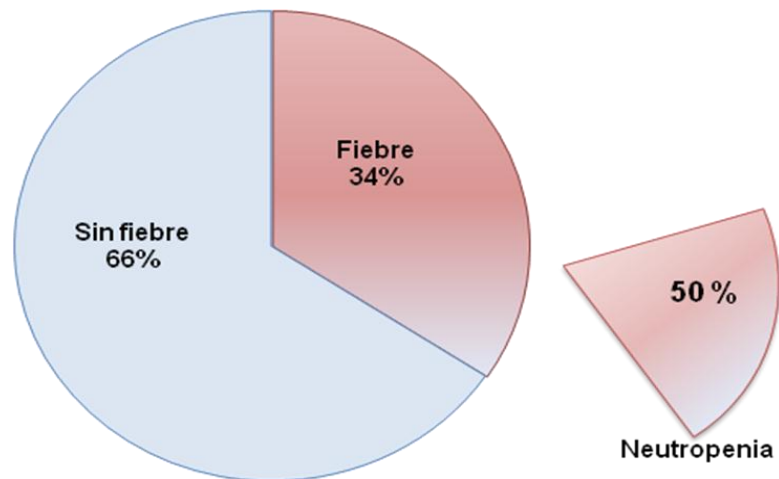


Figura 4. Frecuencia de pacientes con Fiebre y Neutropenia al diagnóstico sin infección aparente. 34% de los pacientes con LLA presentaron fiebre de los cuales el 50 % presentaron también neutropenia.

10.1 Concentración de las citocinas inductoras de fiebre (IL-1 β , TNF- α , IL-6) y asociación con la fiebre de los pacientes con LLA al diagnóstico sin infección aparente.

Las principales citocinas involucradas en el desencadenamiento de la fiebre son IL-1 β , IL-6 y TNF- α , por lo que se comparó la concentración en estas citocinas en el grupo con LLA que presentaron fiebre (n=34) con respecto al grupo que no presentó fiebre (n=65) al momento de su diagnóstico. Las concentraciones de IL-1 β en el grupo control y en el grupo con LLA fueron similares (mediana de 3.2 pg/ml vs. 3.2 pg/ml). Así también, las de TNF- α (mediana 73.2 pg/ml vs. 61.9 pg/ml) y las de IL-6 (mediana 8.8 pg/ml vs 8.5 pg/ml). Se observó una gran dispersión de los datos en ambos grupos (Figura 5).

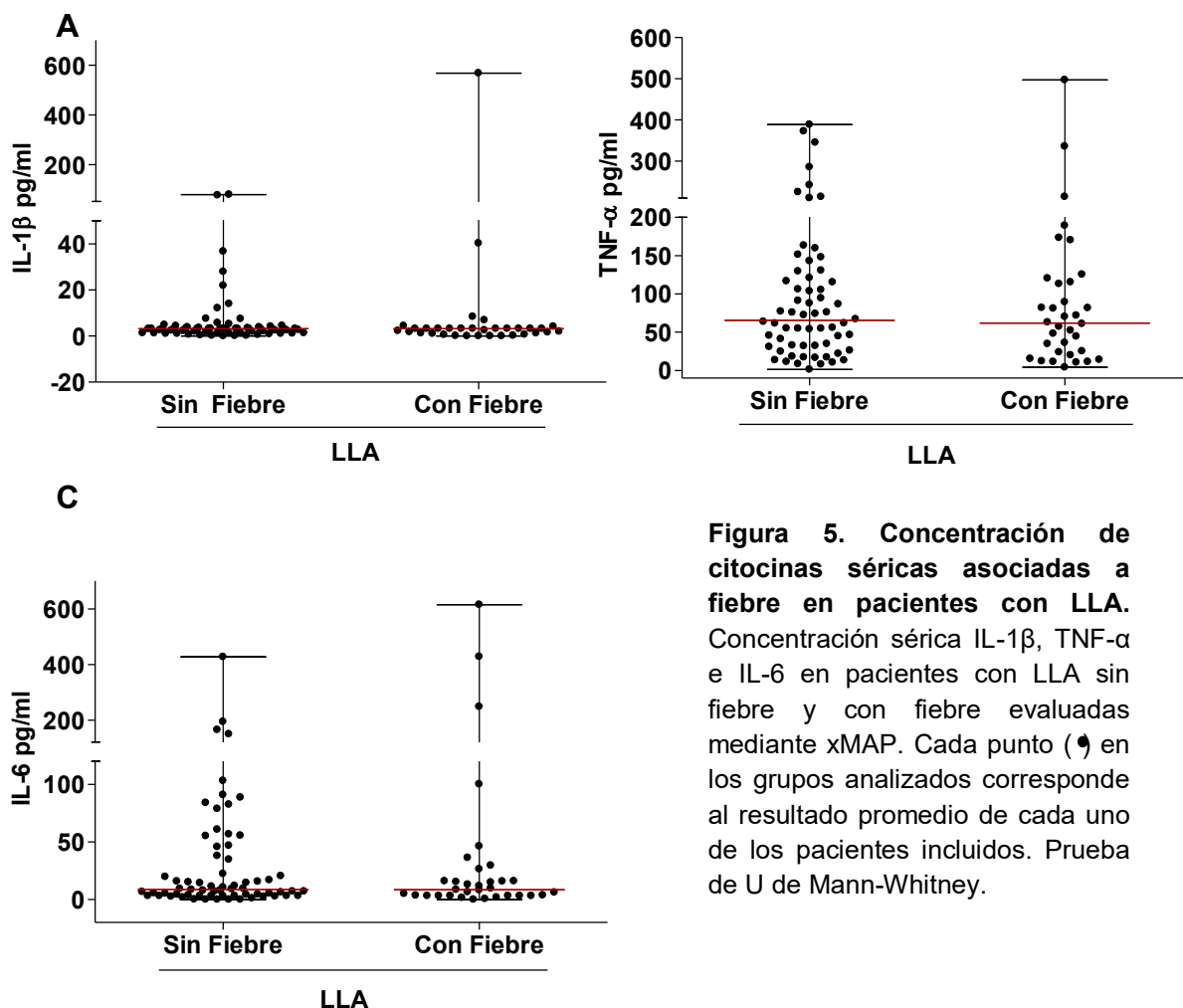


Figura 5. Concentración de citocinas séricas asociadas a fiebre en pacientes con LLA. Concentración sérica IL-1 β , TNF- α e IL-6 en pacientes con LLA sin fiebre y con fiebre evaluadas mediante xMAP. Cada punto (●) en los grupos analizados corresponde al resultado promedio de cada uno de los pacientes incluidos. Prueba de U de Mann-Whitney.

10.2 Perfil de citocinas y quimiocinas proinflamatorias en pacientes con LLA al diagnóstico sin infección clínica aparente.

Con la finalidad de determinar cuál era el estado inflamatorio de los pacientes con LLA, sin infección clínicamente aparente al diagnóstico, se determinó la concentración de las principales citocinas y quimiocinas que participan en el proceso pro-inflamatorio tales como: IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-8, y MCP-, IL-12, IL-13, en 99 sueros de pacientes con LLA y 48 sueros de niños no oncológicos. Los resultados se muestran en las Figura 6 y 7. La integración de los resultados en citocinas se encuentra en la Figura 12.

10.2.1 Concentración de citocinas pro-inflamatorias inductoras de fiebre en pacientes con LLA y en controles.

Se observó una gran dispersión de los valores en ambos grupos, siendo mayor en el grupo con LLA. La concentración de IL-1 β entre el grupo con LLA y el grupo control no fue estadísticamente diferente, las medianas de la concentración fueron de 3.2 pg/ml vs 3.2 pg/ml (Figura 6A). La mediana de TNF- α en el grupo control fue de 13.6 pg/ml (1.7–211.6 pg/ml), mientras que la mediana en el grupo con LLA fue 65.4 pg/ml (1.2–496.0pg/ml), $p < 0.0001$ (Figure 6B). La mediana de IL-6 para el grupo control fue de 3.2 pg/ml (0.0–87.9 pg/ml) y 8.8 pg/ml (0.0–615.0 pg/ml) en el grupo con LLA, $p = 0.001$ (Figura 6C).

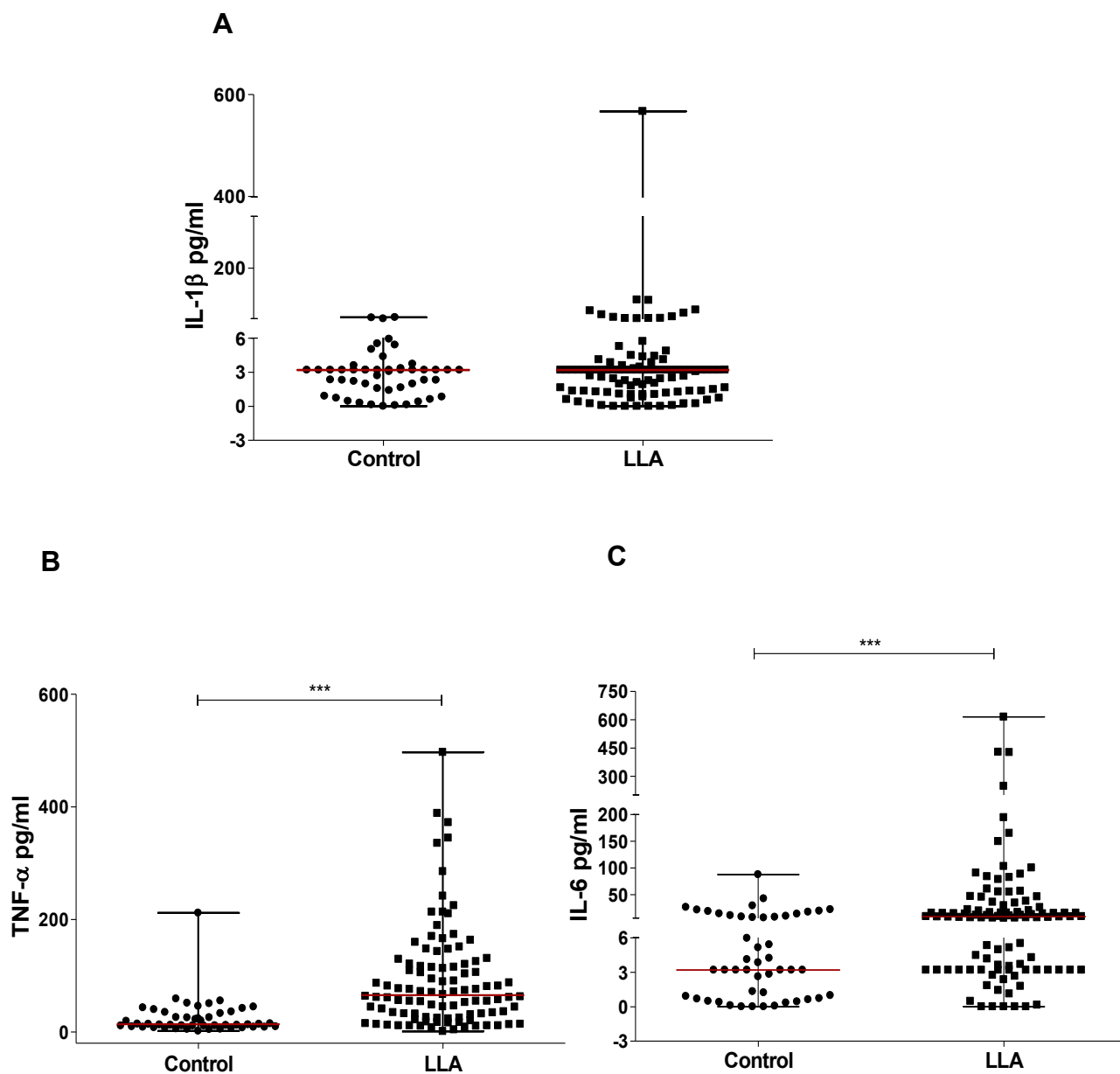


Figura 6. Incremento de citocinas séricas pro-inflamatorias en pacientes con LLA. Concentración sérica de IL-1 β , TNF- α (** p <0.0001) e IL-6 (** p =0.001) en pacientes con LLA determinadas por xMAP. Prueba de U de Mann-Whitney. Cada punto en el grupo control (●) y en el con LLA (■) corresponde al resultado promedio de cada uno de los pacientes incluidos.

Las concentraciones de IL-8 fueron significativamente mayores en el grupo con LLA (mediana, 78.8 pg/ml, rango, 8.1-24,9 pg/ml) que en el grupo control (mediana, 13.0 pg/ml, rango, 2.9-522.0 pg/ml) (Figura 7A). Las concentraciones de MCP-1 también fueron mayores en el grupo con LLA (mediana 1,090 pg/ml, rango, 4.3-4,382.0 pg/ml) que en el grupo control (mediana, 381.0 pg/ml, rango 3.9 a 2,001.0 pg/ml) (Figura 7B). Ambas quimiocinas tuvieron diferencia estadísticamente significativa con una $p \leq 0.0001$.

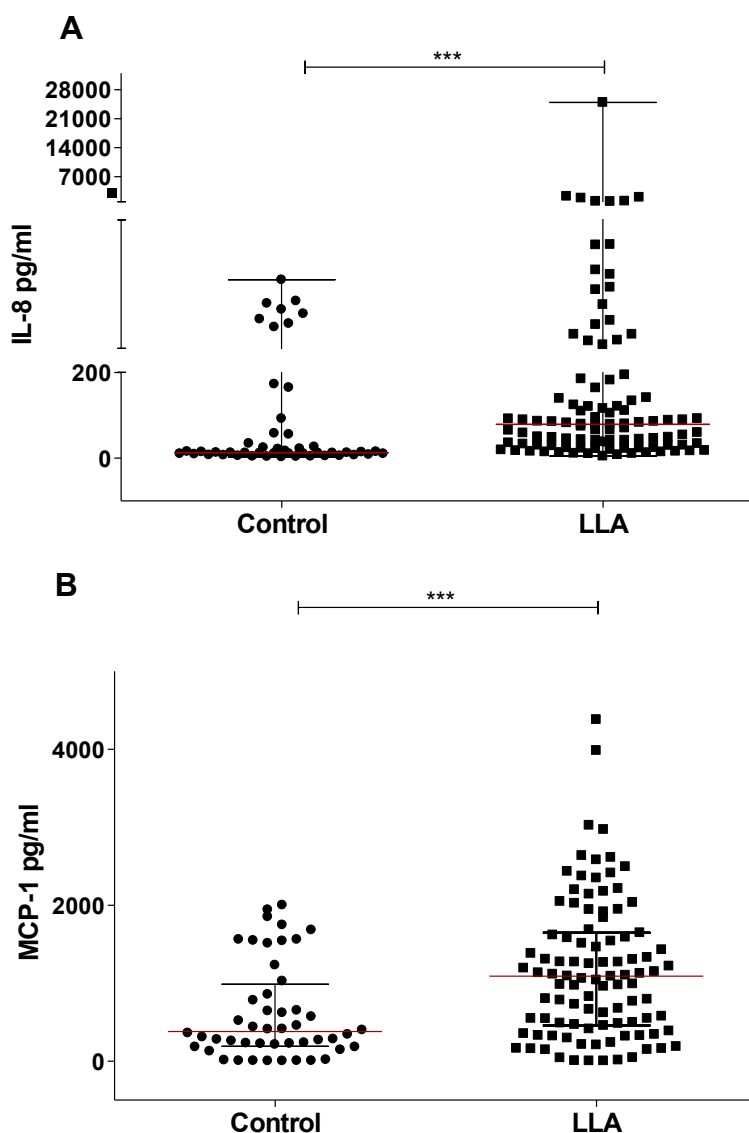


Figura 7. Incremento de quimiocinas en pacientes con LLA. Concentraciones séricas de IL-8 y MCP-1 en el grupo control y en el grupo de pacientes con LLA, determinados por xMAP.. *** $p \leq 0.0001$. Cada punto en el grupo control (●) y en el de LLA (■) corresponde al resultado promedio de cada uno de los pacientes incluidos.

10.3 Citocinas séricas tipo Th1 y Th2 en pacientes con LLA al diagnóstico, sin infección clínica aparente.

Se analizaron citocinas séricas tipo Th1, tales como: IFN- γ , IL-12, e IL-2 (Figura 8). Las concentraciones séricas de IFN- γ e IL-12 fueron significativamente mayores en los pacientes con LLA que en los pacientes del grupo control (IFN- γ en LLA: mediana, 14.4 pg/ml; rango, 0.0 a 454.0 pg/ml; IFN γ en los controles: mediana, 6.5 pg/ml; rango, 0.38 a 119.9 pg/ml (Figura 8A); IL-12 en LLA: mediana, 3.3 pg/ml, rango, 0.0 a 175.0 pg/ml; IL-12 en los controles: la mediana, 2.63 pg/ml, rango, 0.0 a 70.6 pg/ml) (Figura 8B). Las concentraciones de IL-2 en pacientes con LLA fueron las siguientes: mediana, 3.2 pg/ml, rango, 0.0-83.1 pg/ml y en los controles, mediana, 3.05 pg/ml, rango, 0.0 a 13.6 pg/ml la diferencia no fue significativa (Figura 8C).

Se determinó la concentración de citocinas Th2, tales como: IL-4 e IL-13. La concentración de IL-4 en pacientes con LLA no fue significativamente diferente a la del grupo control, con medianas de 3.2 pg/ml (0.0-259 pg/ml) en el grupo con LLA y 3.2 pg/ml (0.0-422.7 pg/ml) en el grupo control (Figura 9A). Las concentraciones de IL-13 en pacientes con LLA también fueron similares al grupo control (mediana, 3.20 pg/ml vs 3.2 pg/ml; con un rango en pacientes con LLA de 0.0 a 547.0 pg/ml, sólo tres pacientes con >100 pg/ml; rango en el grupo control, de 1.9 a 110.9 pg/ml) (Figura 9B).

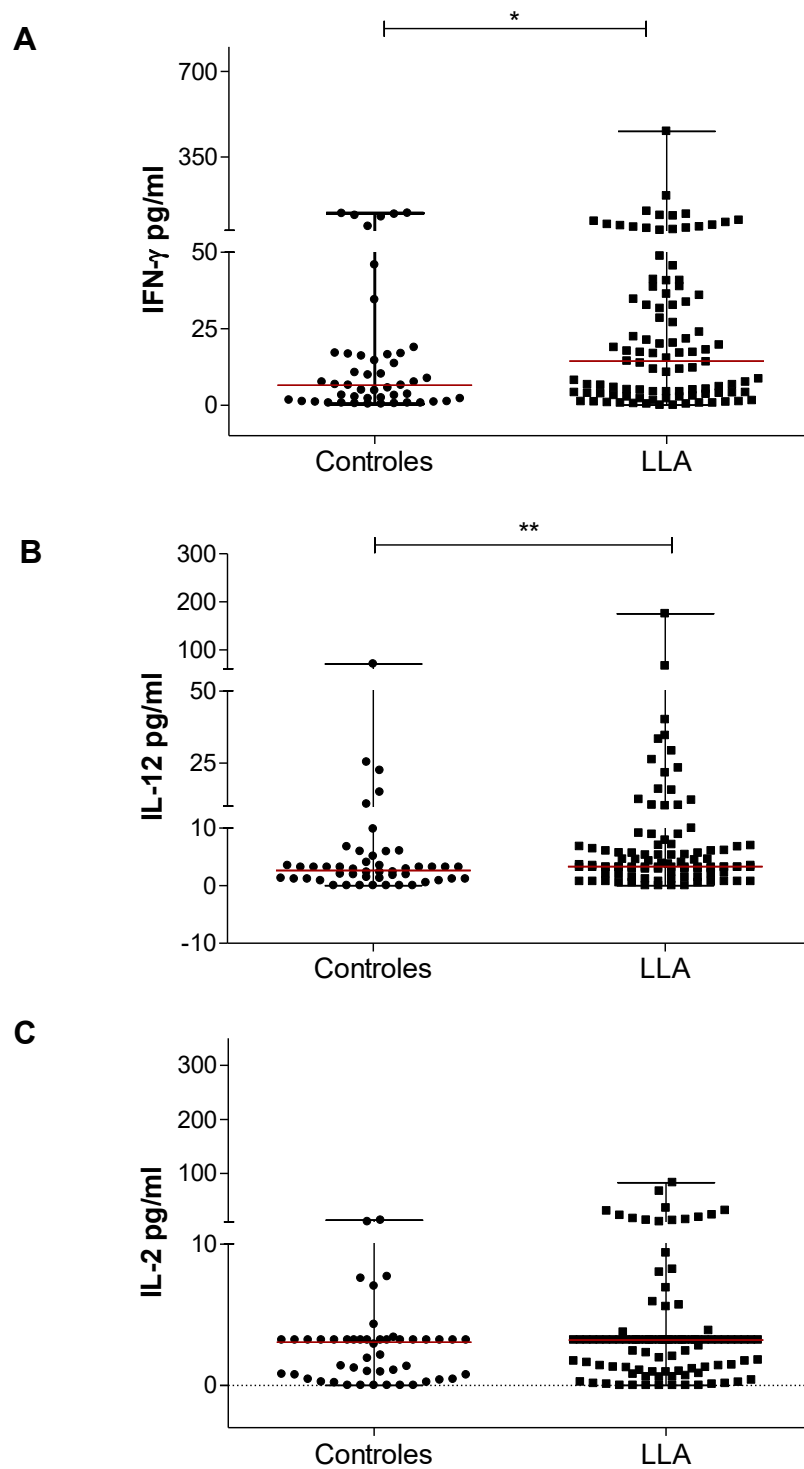
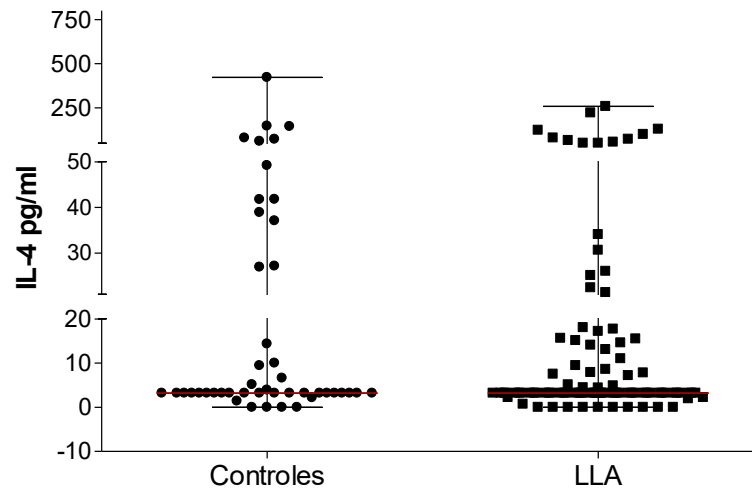


Figure 8. Incremento de citocinas tipo Th1 en pacientes con LLA. Concentración sérica de IFN- γ , IL-12 e IL-2 en el grupo control y pacientes con LLA. Determinación por xMAP. * $p=0.04$; ** $p=0.004$. Prueba U de Mann-Whitney. Cada punto en el grupo control (●) y en el grupo con LLA (■) corresponde al resultado promedio de cada uno de los pacientes incluidos.

A



B

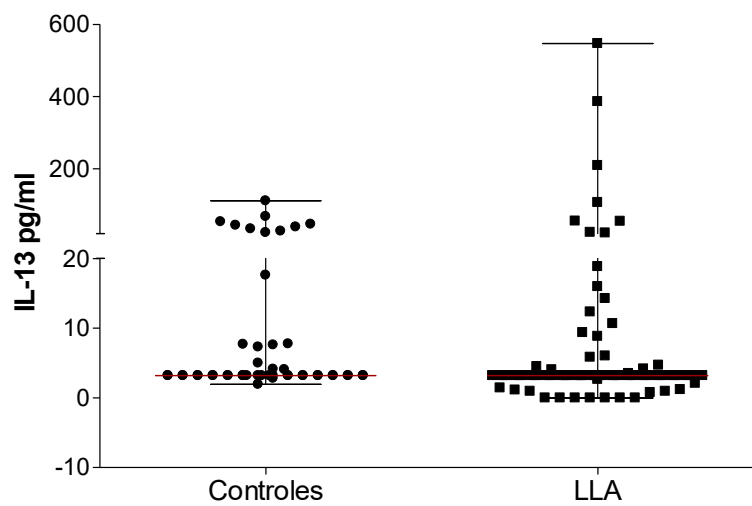
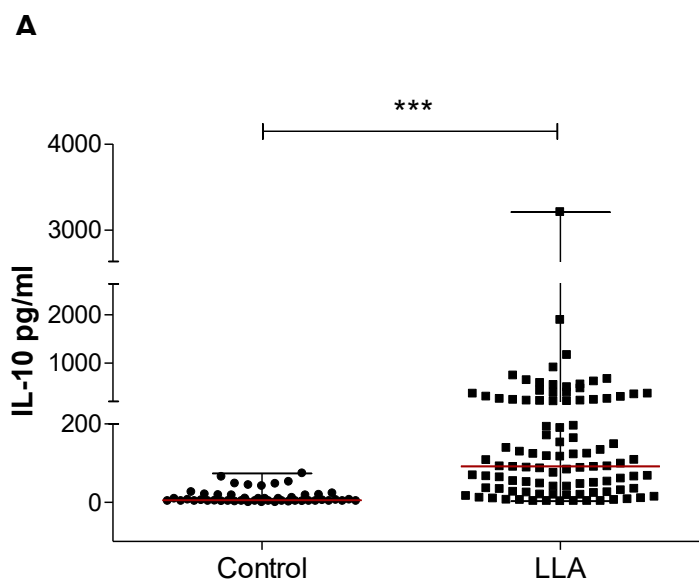


Figura 9. Citocinas tipo Th2 en pacientes con LLA. Concentraciones séricas de IL-4 e IL-13 en el grupo control y en pacientes con LLA. Determinación por xMAP. Prueba de U de Mann-Whitney. Cada punto en el grupo control (●) y en el de LLA (■) corresponde al resultado promedio de cada uno de los pacientes incluidos.

10.4 Citocinas inmunoreguladoras en pacientes con LLA al diagnóstico, sin infección clínica aparente.

La concentración sérica de IL-10 fué mayor en los pacientes con LLA que en el grupo control, con una mediana de 91.8 para el grupo con LLA y de 5.1 pg/ml para el grupo control (rango 2.5 a 3,209.0 pg/ml para LLA vs 0.0 a 73.6 pg/ml para el grupo control) (Figura 10A). La concentración de IL-17 en el grupo con LLA fue de 3.2 pg/ml (rango, 0.0 a 139.3 pg/ml y en el grupo control la mediana también fue 3.2 pg/ml pero con un rango de 0.0 a 75.8 pg/ml (Figura 10B), no hubo diferencias significativas entre los dos grupos. Sin embargo, la concentración de TGF- β fue menor en el grupo de pacientes con LLA que en el grupo control (mediana, 1,438 pg/ml vs 4,407 pg/ml; rango de 0.0 a 33,777 vs 0.0-29,507 pg/ml) (Figura 10C).



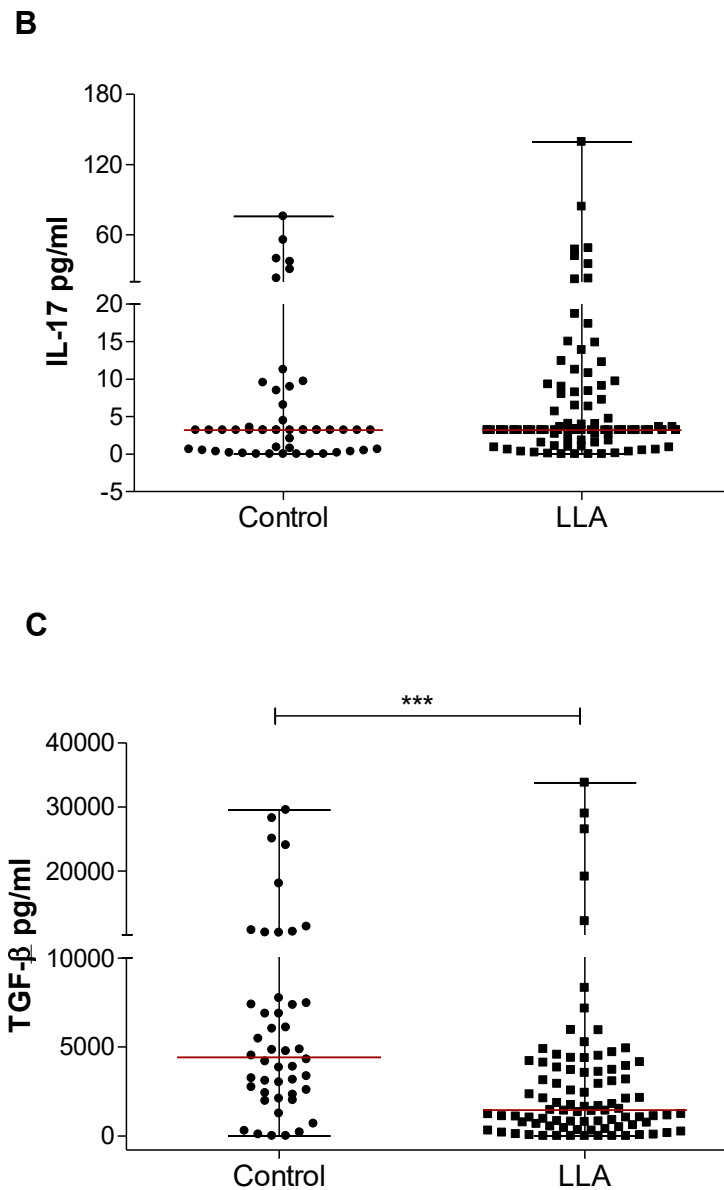


Figura 10. Incremento de citocinas reguladoras en pacientes con LLA. Concentraciones séricas de IL-10, IL-17 y TGF- β , en el grupo control y en pacientes con LLA. Determinadas por xMAP ó ELISA (TGF- β), *** $p < 0.0001$. Prueba U de Mann-Whitney. Cada punto en el grupo control (●) y en el grupo con LLA (■) corresponde al resultado promedio de cada uno de los pacientes incluidos.

10.5 Citocinas inflamatorias asociadas a la fiebre de pacientes con LLA.

Mediante curvas ROC se determinó el valor de corte para la concentración de cada citocina inflamatoria previamente evaluada (Figura 11). Los valores de corte permiten establecer a partir de que concentración se puede considerar elevada la citocina. Los valores de corte obtenidos pueden verse en la Tabla 3. Con estos valores se hicieron los análisis de asociación de las diferentes citocinas inflamatorias con la fiebre, para lo cual se calculó la razón de momios, por sus siglas en inglés Odds ratio (OR), encontrando asociación de riesgo con IL-6, TNF- α , IL-10 e IL-8 (Tabla 4) y una asociación de protección con TGF- β .

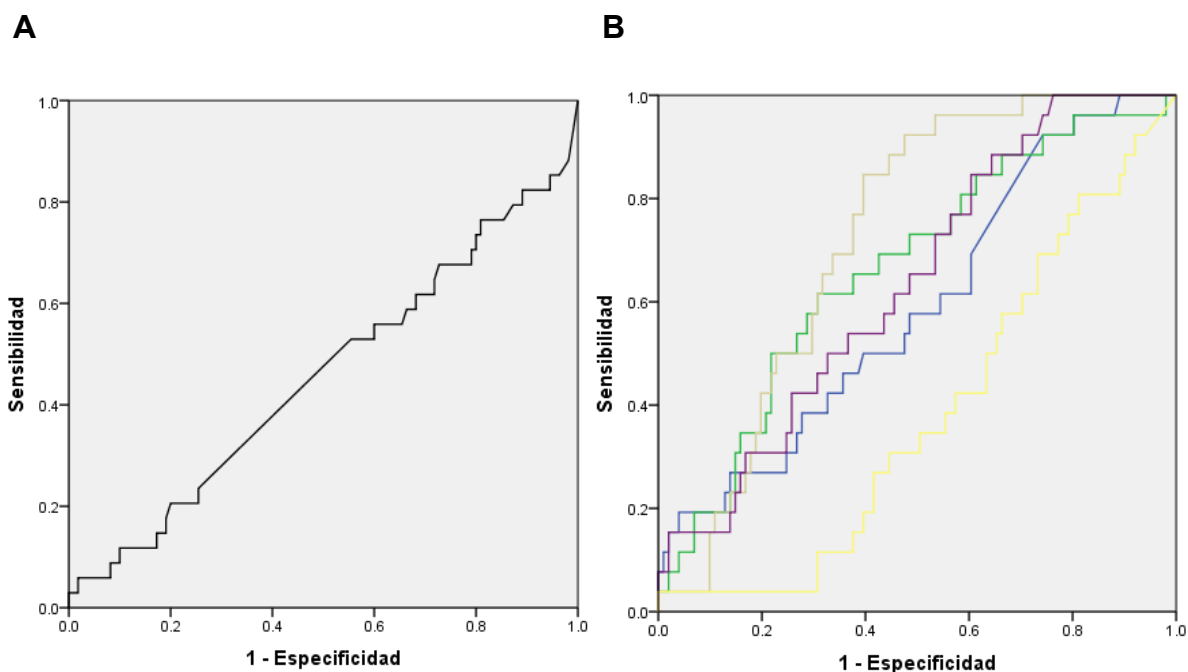


Figura 11. Graficas ROC de citocinas. A. Curva ROC correspondiente a IL- β (línea negra), B. Curvas ROC correspondientes a las citocinas IL-6 (línea azul), TNF- α (línea verde), IL-10 (línea café), IL-8 (línea morada) y TGF- β (línea amarilla). Análisis de datos mediante SPSS 22.0.

Tabla 3. Valores de corte de citocinas.

Citocina	Área bajo la curva	Valor de corte
IL-1 β	0.457	3.135
IL-6	0.591	6.235
TNF- α	0.663	47.335
IL-10	0.724	49.630
IL-8	0.636	42.000
TGF- β	0.382	1492

Tabla 4. Odd Ratio y valores de significancia para presentar fiebre en pacientes con LLA, sin infección clínica aparente.

Citocina	OR	IC 95%	P
IL-1 β	0.93	0.47-1.87	0.86
IL-6	2.8	1.37-5.74	0.005
TNF- α	15.05	5.46-41.42	0.000*
IL-10	3.2	9.49-5.74	0.000*
IL-8	4.92	2.30-5.74	0.000*
TGF- β	0.17	0.07-0.40	0.000

Tabla 5. Sensibilidad y Especificidad estimadas para cada citocina como prueba diagnóstica para fiebre sin infección aparente.

Citocina	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
IL-1β	0.55	0.44	0.67	0.32
IL-6	0.61	0.65	0.78	0.44
IL-10	0.69	0.94	0.96	0.59
TNF-α	0.64	.90	.93	.54
IL-8	0.65	0.73	0.83	0.50
TGF-β	0.43	0.19	0.52	0.14

VPN= Predictivo positivo negativo

VPP=Valor predictivo positivo

LLA sin infección clínica aparente

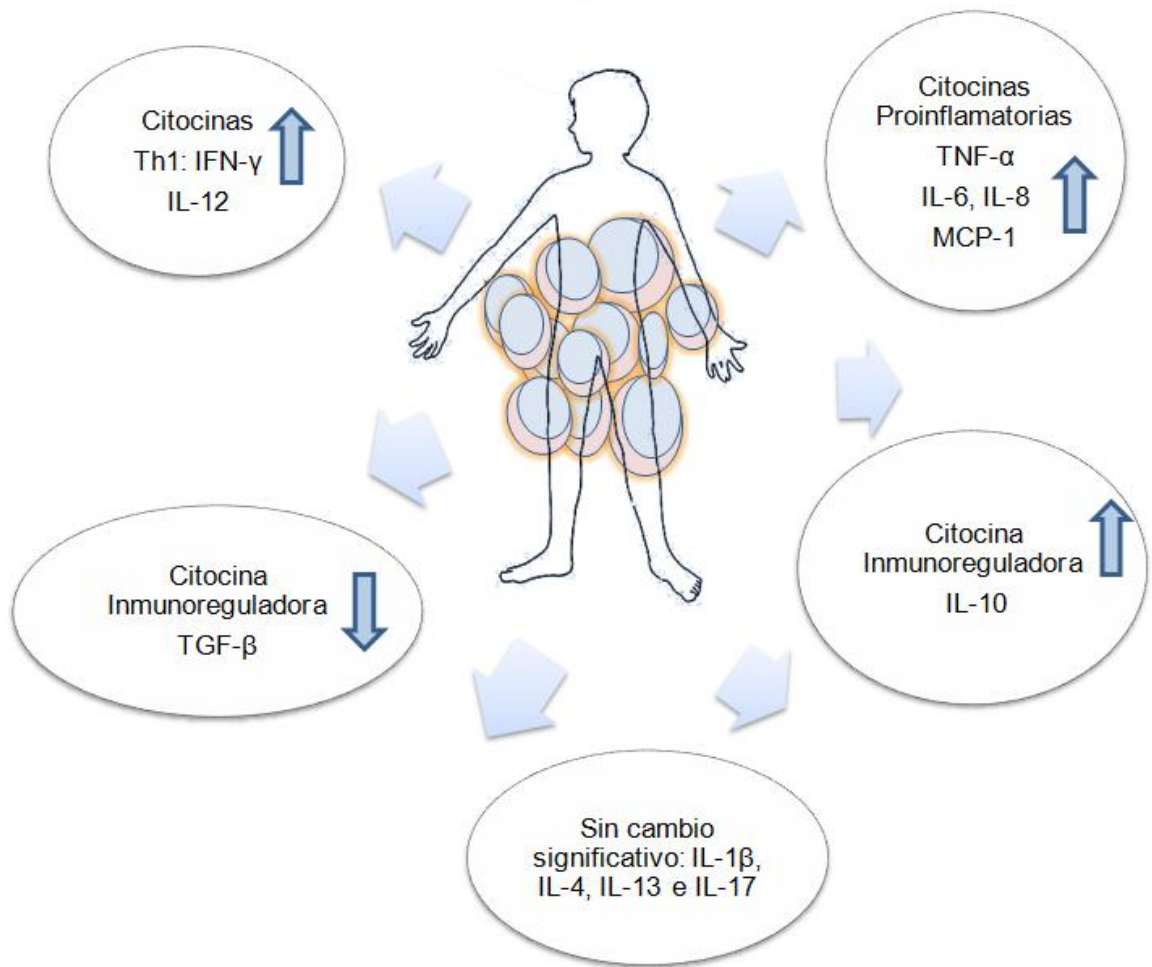


Figura 12. Desregulación en el balance de citocinas séricas en pacientes con LLA sin infección clínica aparente. Representación esquemática de la fuerte respuesta inflamatoria, polarización en la respuesta tipo Th1 y producción alterada de citocinas reguladoras en pacientes con LLA y al diagnóstico de la enfermedad sin infección aparente. A nivel sistémico los pacientes con LLA sin infección, cursan con una respuesta inflamatoria importante, con elevada concentración en suero de citocinas proinflamatorias y Th1. Además de un incremento de la citocina inmunosupresora, IL-10 y una disminución importante de la citocina inmunoreguladora TGF- β .

10.6 Concentración de DAMPs en pacientes con LLA

En el presente estudio se determinó la concentración de moléculas solubles denominadas DAMPs, como posibles activadores de la respuesta inmune presente en los pacientes con LLA, sin infección aparente. Los DAMPs que se evaluaron fueron las siguientes: Hsp27, 60, 70 y 90, S100A8, ácido úrico y HMGB1.

10.6.1 Disminución de Proteínas de Choque térmico a nivel sistémico en pacientes con LLA

De forma natural, las proteínas de choque térmico (HSPs) tienen un importante papel en el plegamiento de proteínas nacientes, así como para evitar la acumulación de proteínas en el citosol. Sin embargo en condiciones de estrés son liberadas de la célula y llegan a circulación, por lo que las HSPs fueron consideradas en este trabajo, como buenos candidatos para formar parte de los DAMPs, que pudieran estar activando la respuesta inflamatoria en los pacientes con LLA, sin infección aparente. De manera gráfica se muestran las concentraciones séricas de las proteínas de choque térmico involucradas en procesos febriles, estrés oxidativo y químico (Hsp60, Hsp70, y Hsp90), y en funciones anti-apoptóticas (Hsp27). Se incluyeron 36 muestras de pacientes no oncológicos (controles) y 83 de pacientes con LLA.

Se compararon concentraciones séricas de los pacientes con LLA con respecto al grupo control (Figura 13A). Las proteínas de choque térmico, Hsp27 (Total), Hsp27 (pS78/pS82), Hsp60, Hsp70 y Hsp90 fueron menores en los pacientes con LLA que en los controles, encontrando diferencias significativas ($p < 0.0001$). La Hsp27 (total) presentó una mediana Intensidad Media de Fluorescencia (MIF) de 4,368 para el grupo control en el rango de 0.0 a 12,615, en el grupo con LLA la mediana de MIF fue de 495 (rango de 7.0 a 1,248 MIF). La mediana de la MIF para la proteína Hsp27 activa (pS78/pS82) en el grupo control fue de 1,788 (rango de 0.0 a 6,332) y la mediana de MIF de 241 (rango 55 a 8,851) para el grupo de LLA.

La Hsp60 en el grupo control presento una mediana de MIF de 65 con un rango de 16.0 a 2,742 y una mediana de MIF de 26.75 (rango 7.5 a 4,678) en el grupo con LLA. Para la proteína Hsp90 la mediana de MIF fue de 955.1 (rango de 240 a 1,697) en el grupo control y de 50 (rango 7.0 a 1,410 MIF) para el grupo de LLA. La liberación de la proteína Hsp70 también fue menor en el grupo de pacientes con LLA con respecto al grupo control. El grupo control presento una mediana de MIF de 23.38 (rango 15.0 a 1,532) y el grupo con LLA de 19 (rango 7.5 a 296.3).

Posteriormente se realizó la comparación de las concentraciones de HSPs antes mencionadas en pacientes con LLA que presentaron fiebre con respecto a los que no presentaron fiebre al diagnóstico. Éste análisis se realizó para poder asociar los niveles séricos de las HSPs con el episodio febril que cursaron los pacientes con LLA al diagnóstico (Figura 14A y 14B). Las proteínas Hsp27 total, Hsp27 activa (pS78/pS82), Hsp60 Hsp70 y Hsp90 se encontraron en concentraciones similares en ambos grupos.

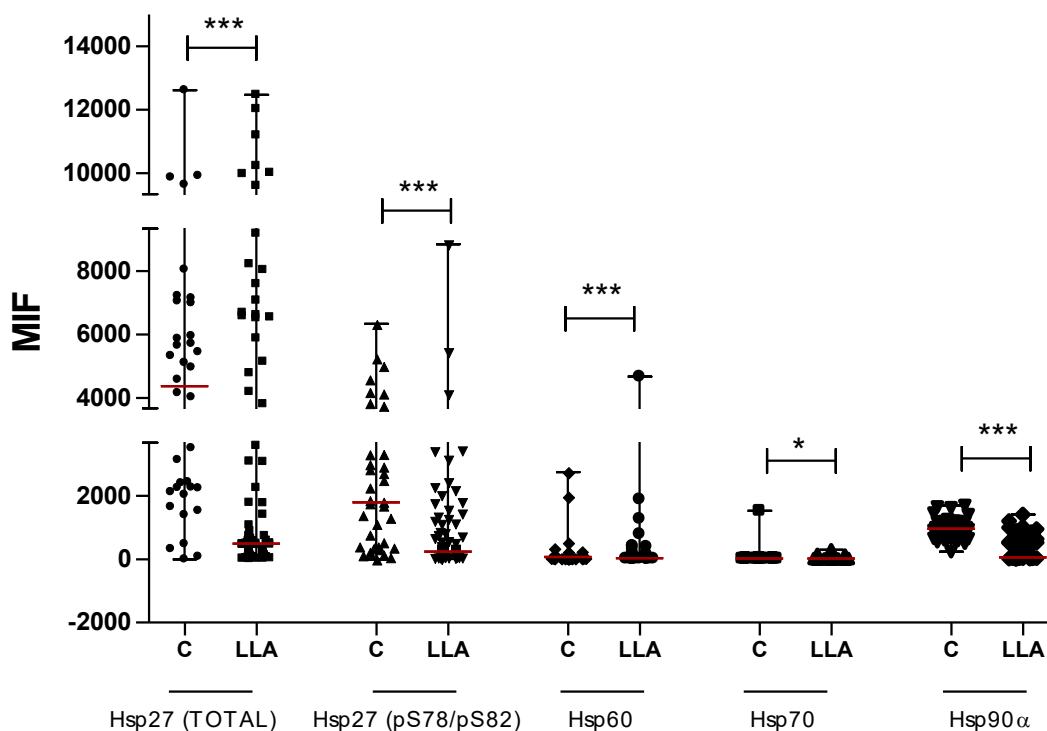


Figura 13. Disminución de Proteínas de choque térmico en suero de pacientes con LLA. Hsp27 (Total), Hsp27(p578/p582), Hsp60, hsp70 y Hsp 90 en sueros de pacientes con LLA y controles. Determinación por xMAP ***p<0.0001, *p<0.01. Prueba de U de Mann-Whitney.

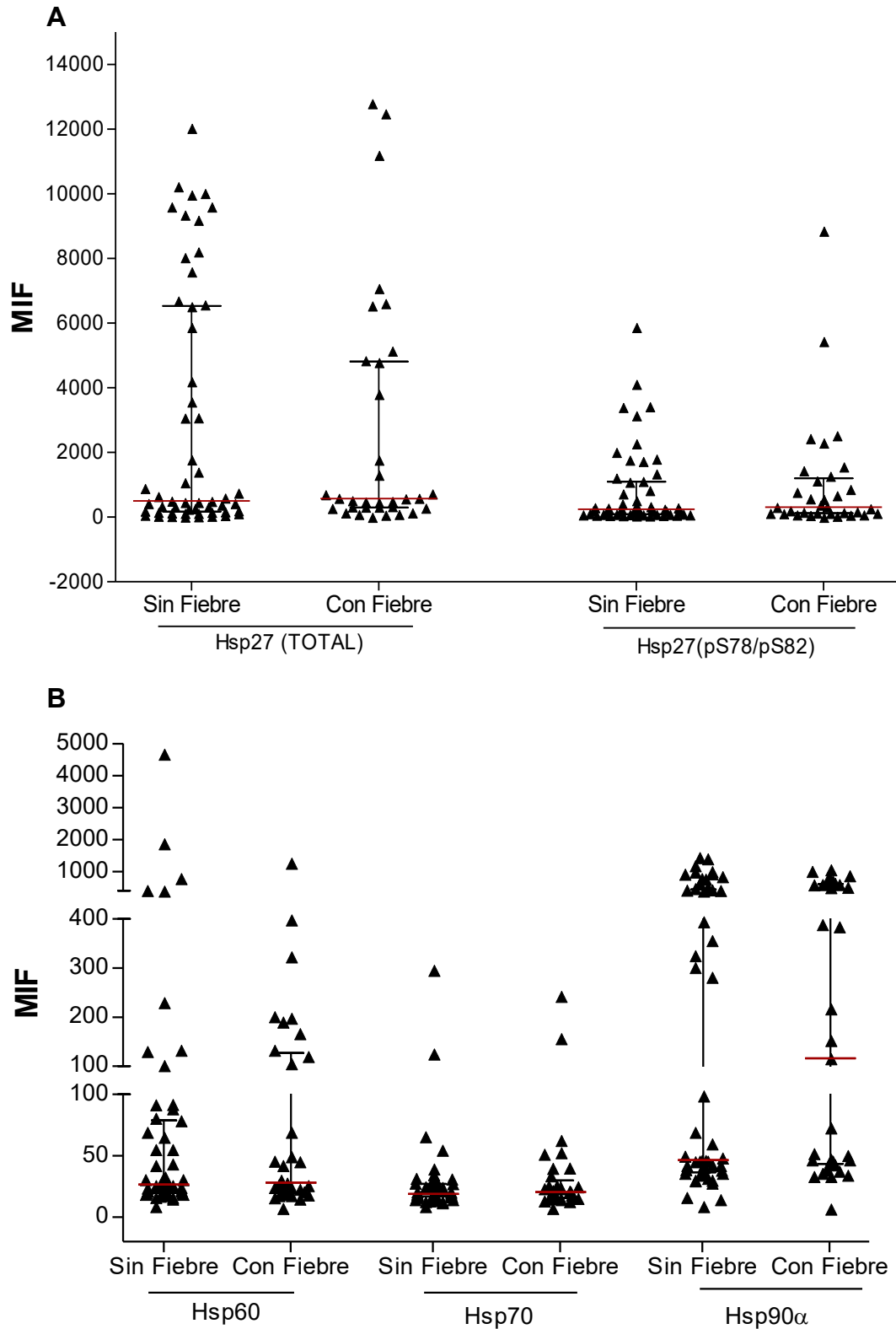


Figura 14. Proteínas de choque térmico en pacientes con LLA con fiebre y sin fiebre. A. Hsp27 en pacientes con LLA con y sin fiebre al diagnóstico. B. Hsp60, Hsp70, Hsp90 de pacientes con LLA que presentaron fiebre al diagnóstico. Determinación por xMAP. Prueba de U de Mann-Whitney.

10.6.2 Concentración de S100A8/Calgranulina en pacientes con LLA y con fiebre al diagnóstico.

Otra de las moléculas que se determinaron en los sueros de los pacientes con LLA fue la S100A8/Calgranulina, la cual es un importante marcador de inflamación; se determinó a esta molécula como un posible activador de la respuesta inmune e inductor de la fiebre en los pacientes con LLA. Se analizaron 76 sueros de pacientes con LLA de los cuales 47 pacientes no presentaron fiebre y 29 sí al diagnóstico y sin infección aparente, las concentraciones séricas de S100A8/calgranulina fueron de 7.3 ng/ml (rango 2.1 – 42.3 ng/ml) para el grupo sin fiebre, mientras que para el grupo febril fue de 8.6 ng/ml (2.9 – 50.3 ng/ml). Los valores de las medianas se compararon y la diferencia no fue significativa (Figura 15)

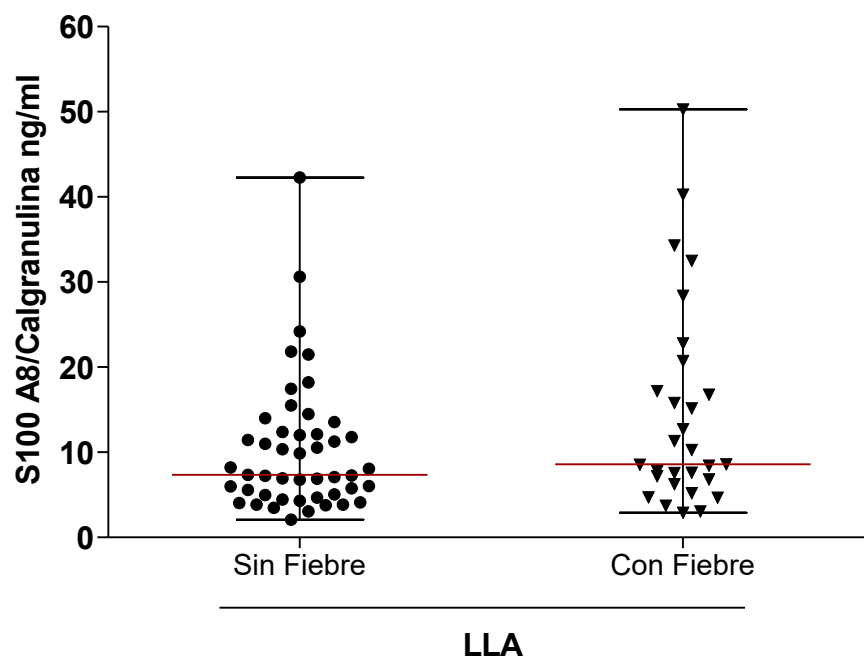


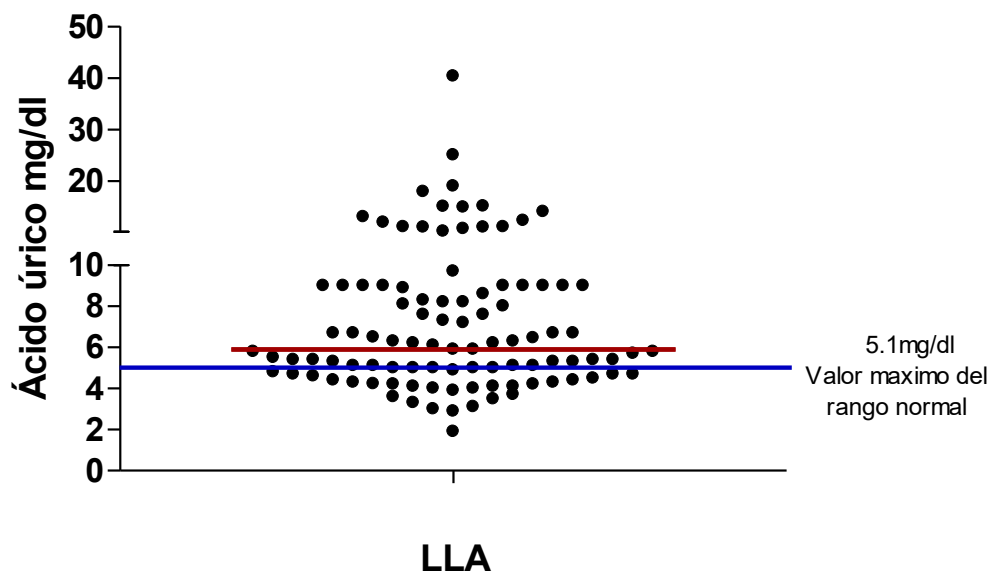
Figura 15. Proteínas S100 A8/Calgranulina en pacientes con LLA. Determinación de proteínas S100A8/Calgranulina en pacientes con LLA de recién diagnóstico con ausencia y presencia de fiebre. Determinación por ELISA.

10.6.3 Concentración de ácido úrico en pacientes con LLA al diagnóstico con y sin fiebre.

El ácido úrico como otro posible DAMP en la LLA, se evaluó en los pacientes con fiebre y sin fiebre, además, se analizó su posible asociación con la fiebre (Figura 16 A y 16B). Se determinó que el 65% de los pacientes con LLA (63 de 96) mostraron valores de ácido úrico superiores a los reportados como normales (2.5-5 mg/dl) (línea azul) y sólo el 35 % de ellos se encuentra con valores normales. Los datos demuestran que los pacientes con LLA en más de la mitad de los casos presenta hiperuricemia (mediana 7.6 mg/dl con un rango de 2.9 – 40.3 mg/dl) incrementando posiblemente el proceso inflamatorio en este tipo de pacientes.

Se compararon los niveles séricos de ácido úrico entre los pacientes que no presentaron fiebre y los que sí presentaron fiebre. De los 96 pacientes analizados 34 presentaron fiebre al diagnóstico, y 21 de éstos excedieron los niveles normales de ácido úrico, con una mediana de 5.1 mg/dl (rango de 3.0-40.3 mg/dl) sin encontrar diferencia significativa al comparar los dichos grupos (Figura 16 B)

A



B

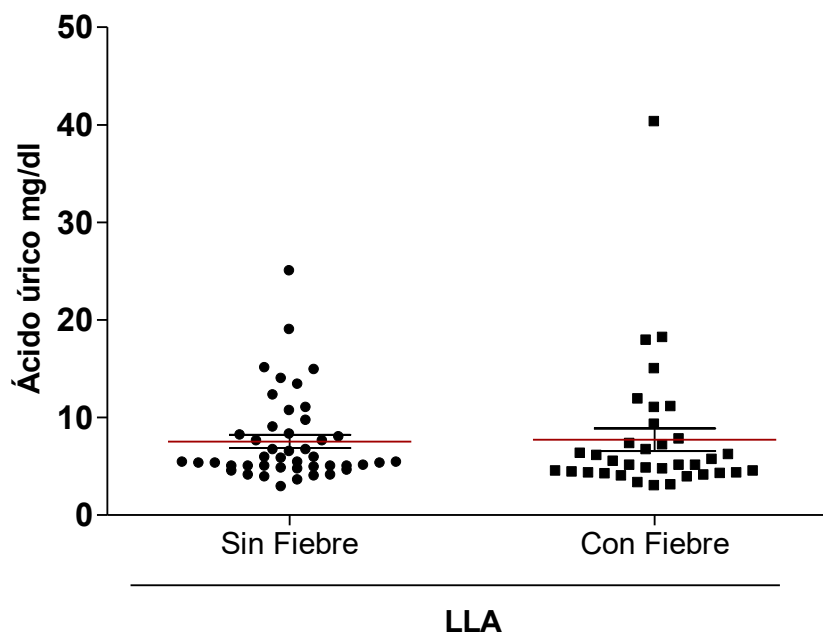


Figura 16. Concentración sérica de ácido úrico en pacientes con LLA. A. Concentración de ácido úrico en pacientes con LLA mostrando los valores normales de referencia; B. Ácido úrico en mg/dl en pacientes con LLA, con y sin fiebre al diagnóstico. Prueba U de Mann-Whitney ($p > 0.05$).

10.6.4 Concentración de HMGB1 sérica en pacientes con LLA

HMGB1 es una de las moléculas que se ha asociado a desordenes inflamatorios y al proceso de inflamación estéril, además de ser considerada una importante molécula de daño. Se analizaron en 21 sueros de pacientes no oncológicos (controles) y 54 sueros de pacientes con LLA. Las concentraciones séricas de HMGB1 en el grupo de pacientes con LLA fué mayor que las del grupo control. (rango, 0.0-552.7 pg/ml vs 0.0-4,974 pg/ml). Sin embargo, no se encontró diferencia significativa (Figura 17 A).

La concentración de HMGB1 del grupo de pacientes con LLA que presentaron fiebre se comparó con el grupo sin fiebre al diagnostico de la neoplasia, observándose que el grupo con fiebre presento mayor concentración de HMGB1 que el grupo sin fiebre (mediana, 0.0, rango 0.0-4,974 pg/ml vs mediana, 11.34 pg/ml, rango 0.0-269.3 pg/ml) sin diferencia significativa entre los grupos (Figura 17 B).

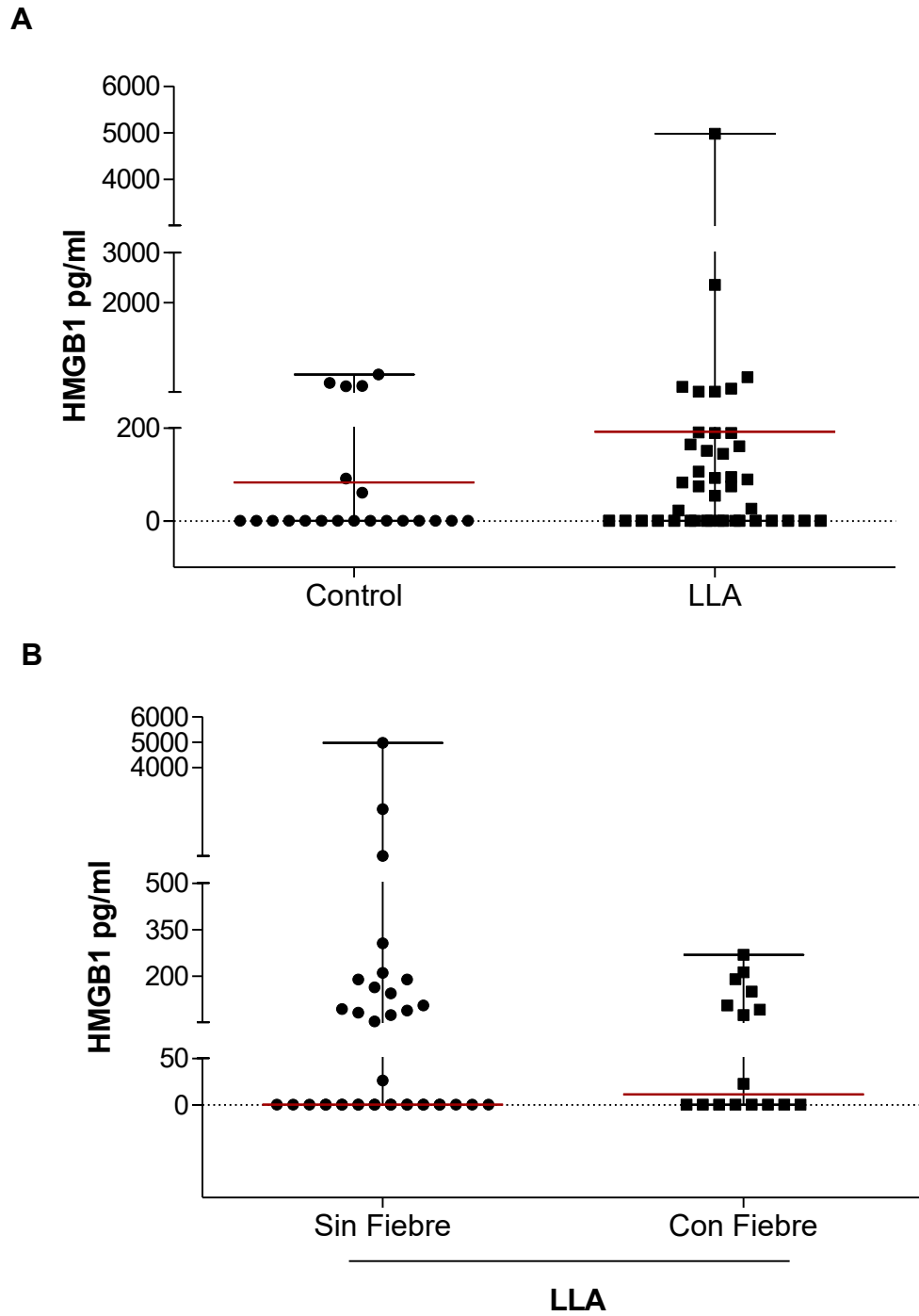


Figura 17. HMGB-1 en pacientes con LLA al diagnóstico. A. concentración sérica de HMGB-1 en el grupo control y en pacientes con LLA, B. HMGB1 en pacientes con LLA que no presentaron y que presentaron fiebre al diagnóstico. Prueba de U de Mann-Whitney ($p > 0.05$)

10.7 Análisis de asociación de DAMPs con la LLA

Mediante curvas ROC se determinó el valor de concentración de corte, para cada DAMP previamente evaluado (Figura 18, Tabla 6 y 7), con los cuales se puede establecer a partir de que concentración puede considerarse elevado cada DAMP. Con los valores obtenidos se determinó la asociación de los diferentes DAMPs con la LLA, para lo cual se calculó la razón de momios, encontrando asociación de riesgo con HMGB1 con un valor de OR de 1.83., (Tabla 8)

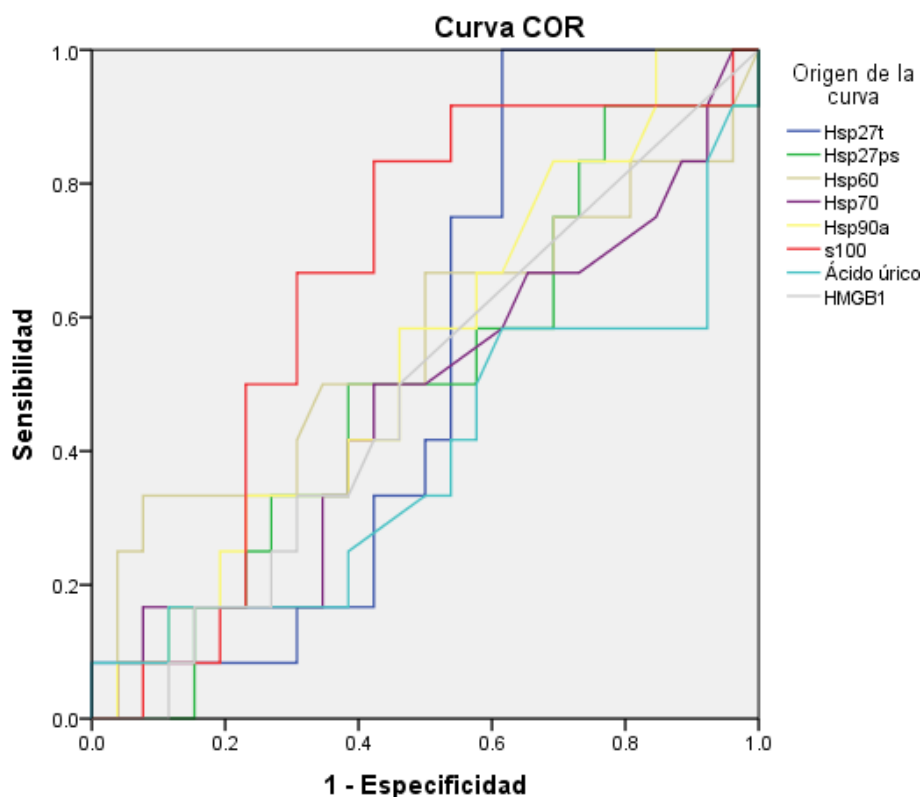


Figura 18. Graficas ROC para DAMPs. Curvas ROC y determinación de sensibilidad y especificidad de los DAMPs: Hsp27t (total), Hsp27p (pS78/pS82), Hsp60, Hsp70, Hsp90, S100A8, ácido úrico y HMGB1 de pacientes con LLA

Tabla 6. Valores de corte de DAMPs

DAMP	Área bajo la curva	Valor de corte
Hsp27(total)	0.529	451.50
Hsp27(pS78/pS82)	0.497	132.38
Hsp60	0.561	26.75
Hsp70	0.473	20.25
Hsp 0 α	0.546	71.25
S100A8	0.654	6.14
Ácido úrico	0.386	5.60
HMGB1	0.492	11.34

Tabla 7. Sensibilidad y Especificidad estimadas para cada DAMP.

DAMPs	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
Hsp27(total)	0.52	0.08	0.54	0.08
Hsp27(pS78/pS82)	0.60	0.08	0.57	0.09
Hsp60	0.24	0.58	0.55	0.27
Hsp70	0.41	0.29	0.55	0.19
Hsp 0 α	0.41	0.04	0.47	0.03
S100A8	0.77	---	0.61	---
Ácido úrico	0.55	---	0.53	---
HMGB1	0.24	0.58	1.83	0.03

Tabla 8. Odd Ratio y valores de significancia para los diferentes DAMPs en la LLA.

DAMP	OR	IC 95%	P
Hsp27(total)	0.09	0.03-0.29	0.000
Hsp27(pS78/pS82)	0.13	0.04-0.40	0.000
Hsp60	0.53	0.01-0.18	0.000
Hsp70	0.29	0.14-0.61	0.001
Hsp 0 α	0.03	0.007-0.13	0.000
S100A8	-----	1.17-1.45	-----
Ácido úrico	-----	1.53-2.19	-----
HMGB1	1.83	1.53-2.19	0.03

VPP=Valor predictivo positivo

VPN=Valor predictivo negativo

10.8 Expresión de los componentes del Inflamasoma NLRP3.

10.8.1 Determinación de IL-1 β en las líneas celulares Reh y RS4 de Leucemia Linfoblástica Aguda.

Con la finalidad de poder establecer un modelo *in vitro* que nos permitiera evaluar uno de los mecanismos de producción de IL-1 β y la evaluación de DAMPs asociados a fiebre, se utilizaron dos líneas celulares de leucemia de diferente origen RS4 y Reh. Estas líneas celulares de leucemia fueron estimuladas con tres concentraciones diferentes de LPS de *E.coli* durante 18 h a 37 C y se determinó la inducción de IL-1 β para conocer si podrían funcionar como modelo *in vitro* para la evaluación posterior de los DAMPs asociados a fiebre y la inducción de los componentes del inflamasoma NLRP3. Hasta el momento no se ha reportado si las líneas celulares RS4 y Reh tienen la capacidad de producir IL-1 β , de tal manera que éstos experimentos nos permitieron conocer que las líneas celulares empleadas producen IL-1 β y pueden utilizarse como modelo *in vitro*.

La línea RS4 produce una concentración basal media de 0.21 pg/ml (\pm 0.21 SEM) de IL-1 β la cual se incrementa con las diferentes concentraciones de LPS de forma importante. Con 100 ng/ml de LPS la media fue 5.75 pg/ml \pm 3.7 SEM, y con 200 ng/ml de LPS la media fue de 11.08 pg/ml \pm 2.5 SEM (Figura 19 A). La línea REH se comporto de manera similar a línea RS4, la concentración basal de IL-1 β fue de 3.8 pg/ml \pm 2.06 SEM, pero la concentración óptima de LPS para inducir un incremento significativo de IL-1 β fue 200 ng/ml con una media de 12.64 pg/ml \pm 3.0 SEM, con 100 ng/ml de LPS se produjeron 6.88 pg/ml de IL-1 β \pm 1.7 SEM. La diferencia con respecto a la concentración basal fue estadísticamente significativa (Figura 19 B).

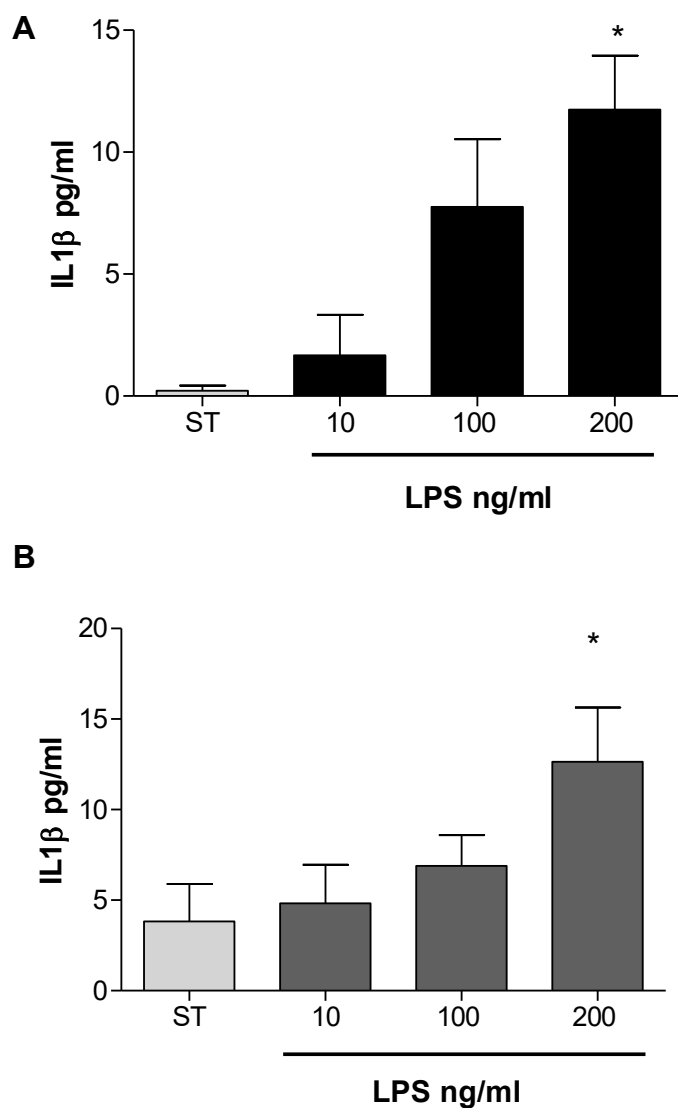


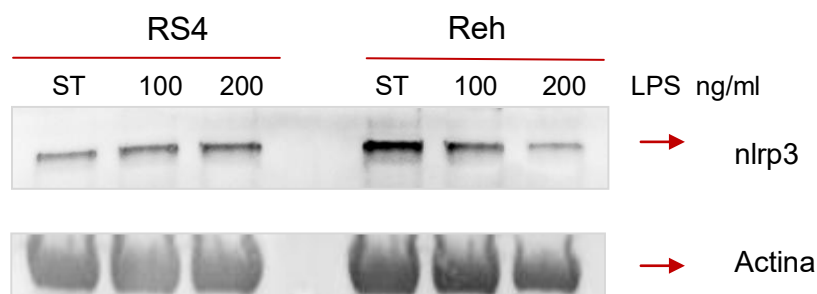
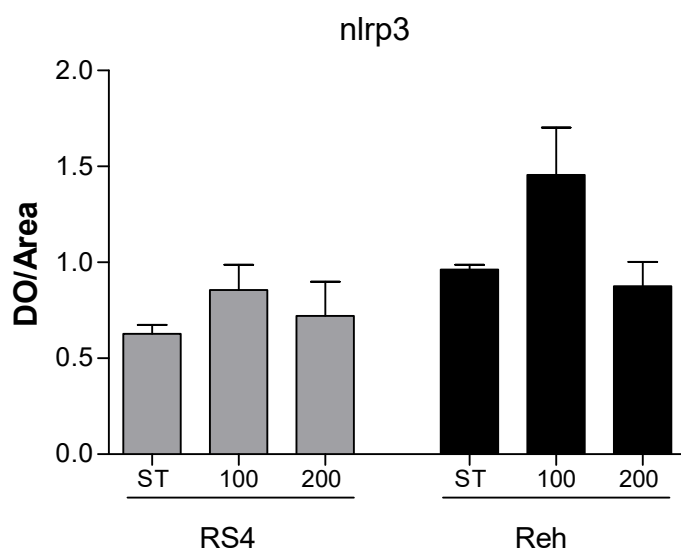
Figura 19. Producción de IL-1 β en líneas celulares de leucemia linfoblástica aguda. Dosis respuesta con LPS *E. coli* (10,100 y 200 ng/ml) A. Línea celular RS4; B. Línea celular Reh. Determinación de IL-1 β por ELISA, promedio de tres experimentos independientes. (ST) Sin tratar. ANOVA de una vía (* $p < 0.05$), prueba post hoc comparación múltiple Dunnett's.

10.8.2 Expresión de nlrp3, ASC y caspasa 1

El inflamasoma es uno de los mecanismos por los que se lleva a cabo la maduración de IL-1 β y previamente demostramos (Figura 19) que las líneas celulares RS4 y Reh tienen la capacidad de producir IL-1 β , por lo que consideramos probable que fuera a través de la activación del inflamasoma NLRP3, por lo que investigamos la expresión de los diferentes componentes del inflamasoma, los resultados obtenidos nos permiten sugerir que es el

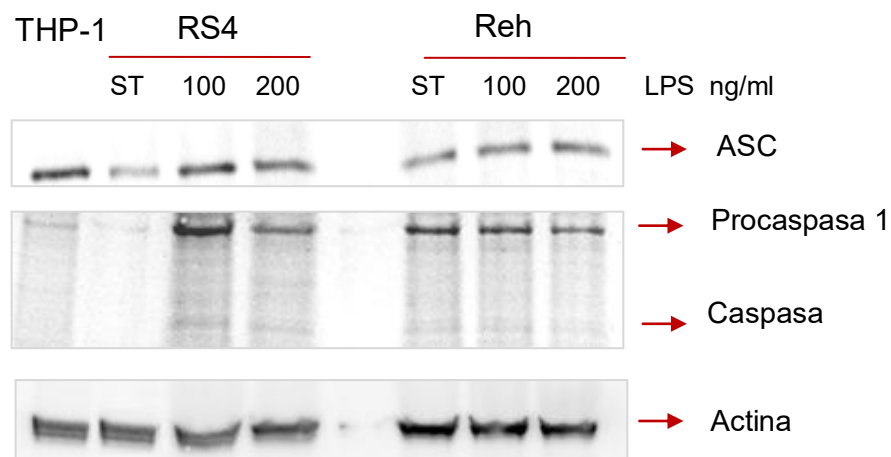
mecanismo por el cual se está produciendo ésta citocina en las líneas celulares de leucemia (Figura 20 A-E).

La expresión de nlrp3, ASC y caspasa se determino mediante Western Blot, como control positivo se utilizó la línea celular THP-1 la cual se sabe expresa de manera constitutiva los componentes del inflamasoma. Nuestros resultados indican que las líneas celulares de leucemia expresan de manera constitutiva la proteína nlrp3 y ésta se incrementa conforme la concentración del estímulo (LPS) en la línea RS4, y disminuye a la concentración máxima del estímulo en la línea Reh (Figuras 20A y B)

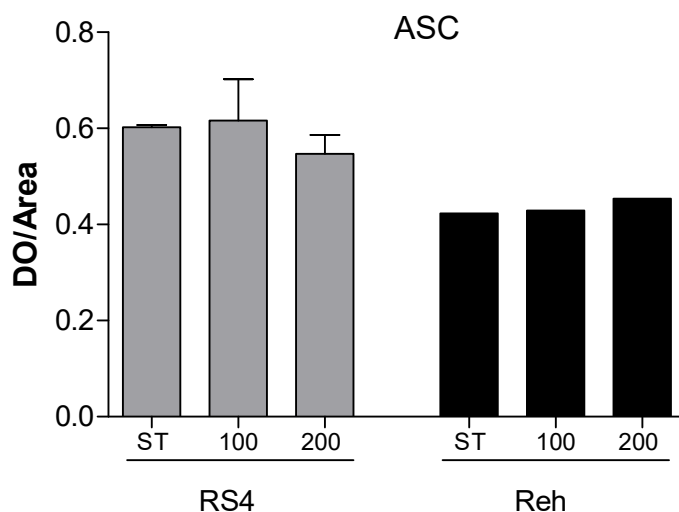
A**B**

La proteína ASC también se expresó de manera constitutiva en ambas líneas celulares de leucemia y no hubo cambio significativo en la expresión con ninguna concentración de LPS (Figura 20C y D). Sin embargo, la expresión de la procaspasa 1 incrementó de manera importante a la concentración de 100 ng/ml en la línea RS4, mientras que en la línea Reh se mantuvo igual en todas las condiciones. Una observación muy importante la caspasa 1 en la línea RS4 se activa y se expresa sólo bajo las condiciones de un estímulo, en este caso inducido por el LPS. La línea Reh tiene una mínima expresión en condiciones basales y con 100 ng/ml y con la concentración máxima ya no hay expresión de casapasa 1 activa (Figura 20 B y E).

C



D



E.

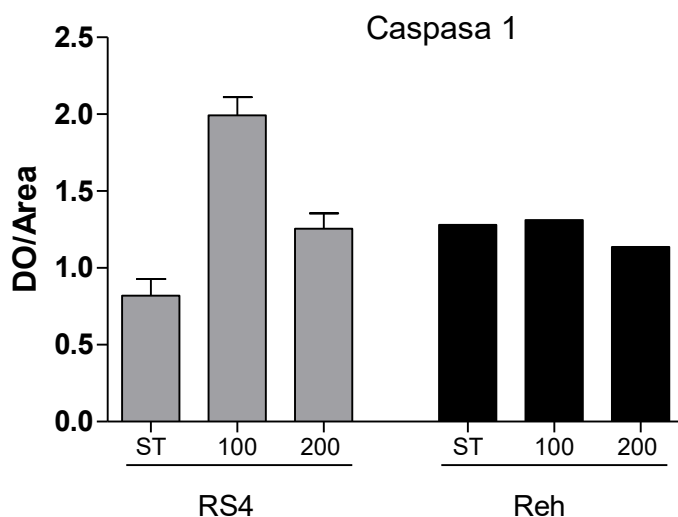


Figura 20. Expresión de los componentes del Inflamasoma NLRP3 en líneas celulares de LLA. Las líneas celulares de leucemia RS4 y Reh se estimularon por 18 h con dos diferentes concentraciones (100 ng/ml y 200 ng/ml) de LPS de *E.coli* y se determinó la expresión de los componentes del inflamasoma por Western blot. A. Electroferograma representativo de la expresión de *nlrp3* de 3 experimentos en las líneas celulares RS4 y Reh, B. Gráfica de densidad óptica (DO) de tres experimentos independientes de la expresión de *nlrp3*; C. Electroferograma representativo de la expresión de las proteínas ASC y caspasa1 de dos experimentos; D y E Gráfica de densidad óptica (DO) de tres experimentos independientes de la expresión ASC y dos experimentos en la expresión de caspasa.

10.8.3 Expresión de los componentes del inflamasoma en células de pacientes con LLA.

En LLA hasta el momento no hay evidencias que indiquen si se expresa el inflamasoma y si está activo. Este estudio determinó por primera vez la expresión y colocalización de los componentes del inflamasoma NLRP3 (*nlrp3*, ASC, caspasa-1) mediante microscopía confocal en células MN totales y PMN del grupo control ($n=10$) y pacientes con LLA ($n=10$), sugiriendo su participación en la producción y maduración de la IL-1 β . Se realizaron dobles tinciones en cada estirpe celular para establecer el posible ensamblaje del inflamasoma NLRP3. En las micrografías obtenidas de las diferentes tinciones del grupo control y de los pacientes con LLA se muestra los resultados de *nlrp3*-ASC; ASC-casp-1 (Figuras 21-25).

10.8.3.1 Análisis de expresión de los componentes del inflammasoma en células mononucleares (MN)

Las células MN de los controles y pacientes con LLA fueron marcadas/teñidas con los anticuerpos dirigidos contra los componentes del inflammasoma NLRP3 mediante inmunofluorescencia y analizadas mediante microscopia confocal (Figura 21- 23). La expresión de nlrp3, ASC y caspasa 1 fue principalmente en el citoplasma en células mononucleares (MN) del grupo control. La proteína ASC (FITC/verde) se expresó en todo el citoplasma, mientras que la de nlrp3 y caspasa 1 (Alexa 488/rojo) fue en el contorno de la célula y en el citoplasma, (Figura 21A y 21B). Sin embargo, los resultados muestran que las células MN de LLA tienen un núcleo mucho más grande respecto al grupo control y que la expresión de nlrp3, ASC y caspasa 1 se encuentra en el citoplasma y en la zona perinuclear y la MIF de caspasa 1 fue mayor respecto al control con diferencia significativa ($p= 0.003$). Los resultados respecto a los coeficientes de colocalización de los componentes del inflammasoma indicaron que fué mayor el número de moléculas colocalizando en el grupo de LLA respecto al grupo control (Figura 22 y Tabla 9).

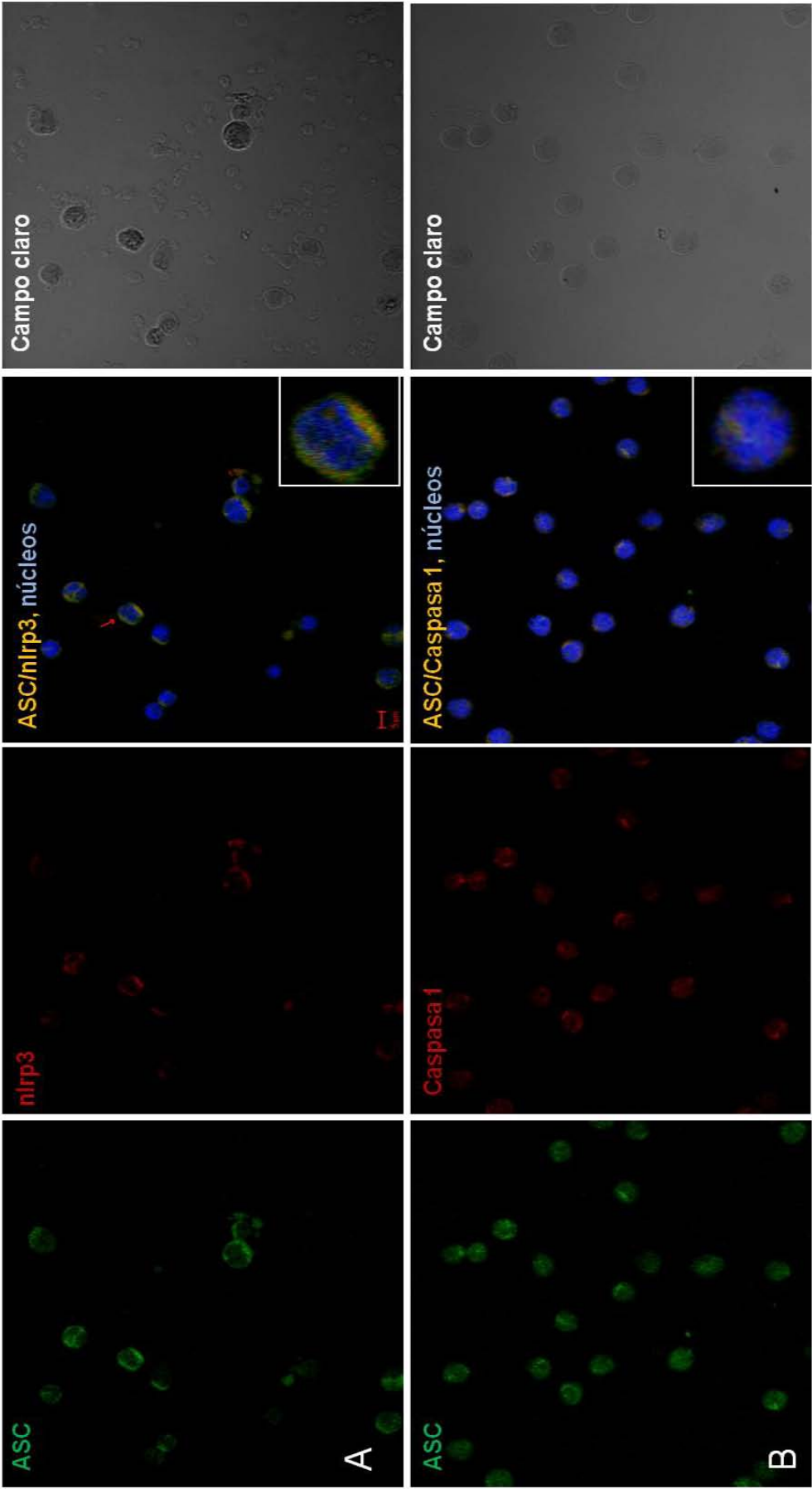


Figura 21. Colocalización de los componentes del Inflamasoma NLRP3 en células MN totales del grupo control. A. Expresión y colocalización de ASC y nlrp3. B. Expresión de ASC y caspasa-1 en células mononucleares totales del grupo control. ASC (FITC), Caspasa-1 y nlrp3 (Alexa 488), núcleos (DQ7). Micrografía 40 X. Microfotografía representativa de 10 pacientes.

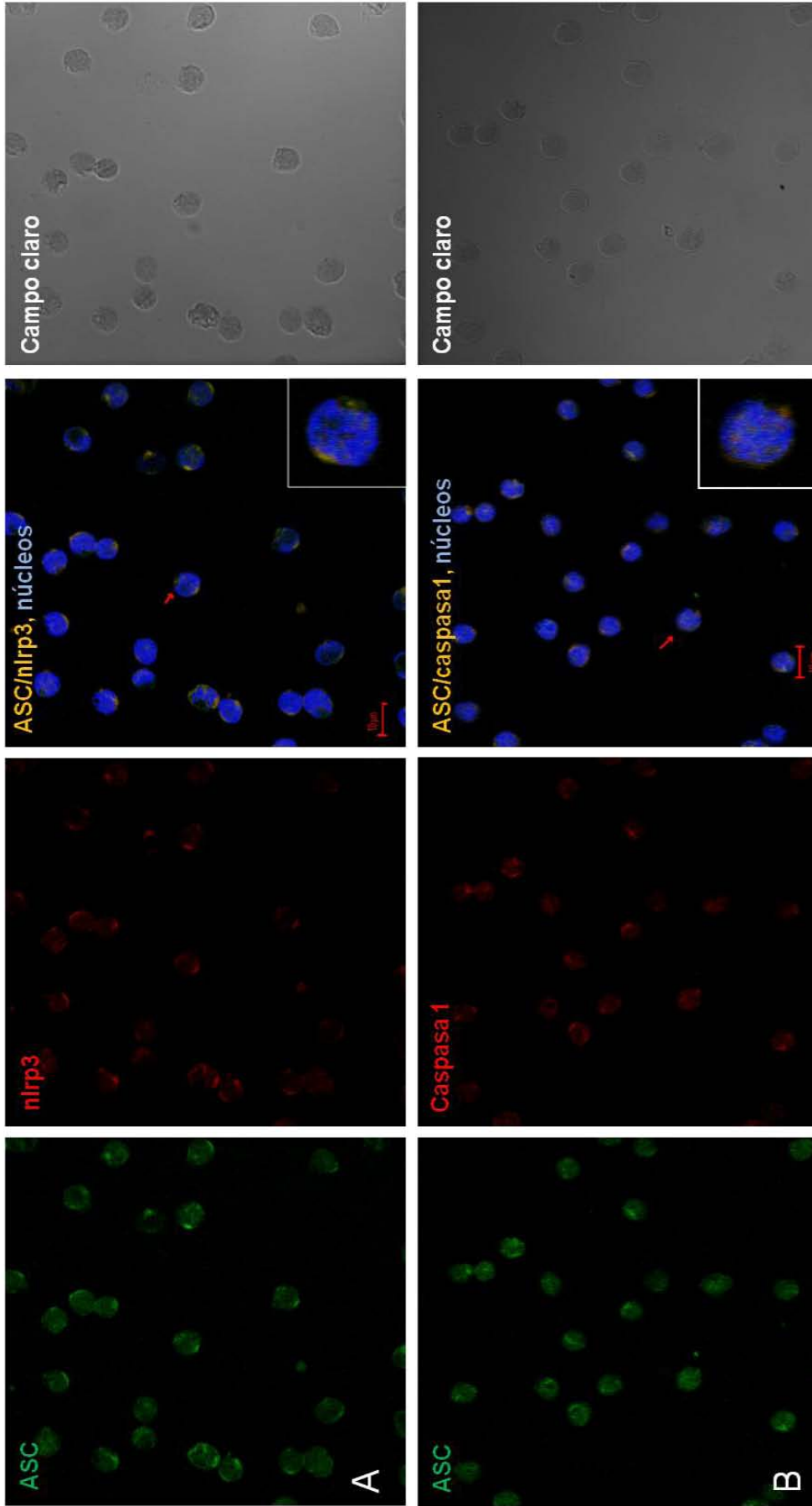
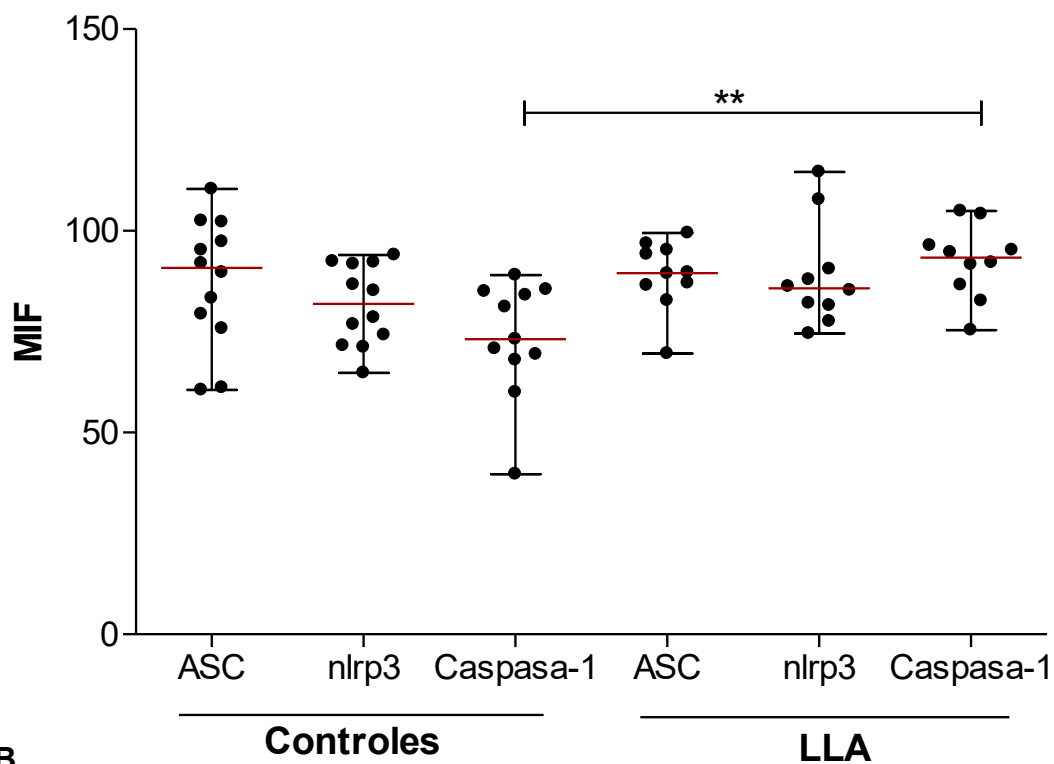


Figura 22. Colocalización de los componentes del Inflamasoma NLRP3 en células MN totales en pacientes con LLA. A. Expresión y colocalización de ASC y caspasa-1. B. Expresión de ASC y nlrp3 en células mononucleares de pacientes con LLA. ASC (FITC), Caspasa-1 y nlrp3 (Alexa 488), núcleos (DQ7). Micrografía 40x. Microfotografía representativa de 10 pacientes

A



B

Tabla 9. Coeficientes de colocación de componentes del inflammasoma en células MN totales.

	ASC-nlrp3-	ASC-Caspasa 1
Controles	0.3085 (0.0550-0.5695)	0.3289 (-0.111- 0.5880)
LLA	0.3926 (0.1980-0.5950)	0.4292 (0.2920-0.5950)

Figura 23. Expresión de los componentes del inflammasoma NLRP3. A. Intensidad media de fluorescencia (MIF) de los componentes del inflammasoma NLRP3 del grupo control y pacientes con LLA. ** $p=0.003$.; Mayor intensidad media de fluorescencia en caspasa 1 del grupo de LLA. Prueba de U de Mann-Whitney; B. Tabla de coeficientes de colocación. (N=10).

10.8.3.2 Analisis de expresión de los componentes del inflamasoma en células polimorfonucleares (PMN).

Se analizó la población de células polimorfonucleares (PMN) en el grupo control (n=10) y en el grupo de pacientes con LLA para determinar los componentes del inflamasoma NLRP3 (Figura 24-26). Las proteínas nlrp3, ASC y Caspasa 1 mostrarán una distribución perinuclear en los PMN de pacientes con LLA además, una alta intensidad media de fluorescencia y una alta colocalización en núcleo y en la zona perinuclear, sugiriendo el ensamble del inflamasoma NLRP3. En cuanto a la morfología de las células, éstas se observan mucho más grandes con las membranas lobuladas. Además se encontró un importante aumento en la MIF de ASC y nlrp3 en los pacientes con LLA (Figuras 25Ay 25B), (Tabla 10). En el grupo control se determinó la misma distribución de nlrp3, ASC y caspasa 1 observada en las células MN, pero una baja expresión y colocalización entre las proteínas ASC y caspasa1, lo que indicaría que posiblemente no esté ensamblado el inflamasoma (Figuras 24A-CB).

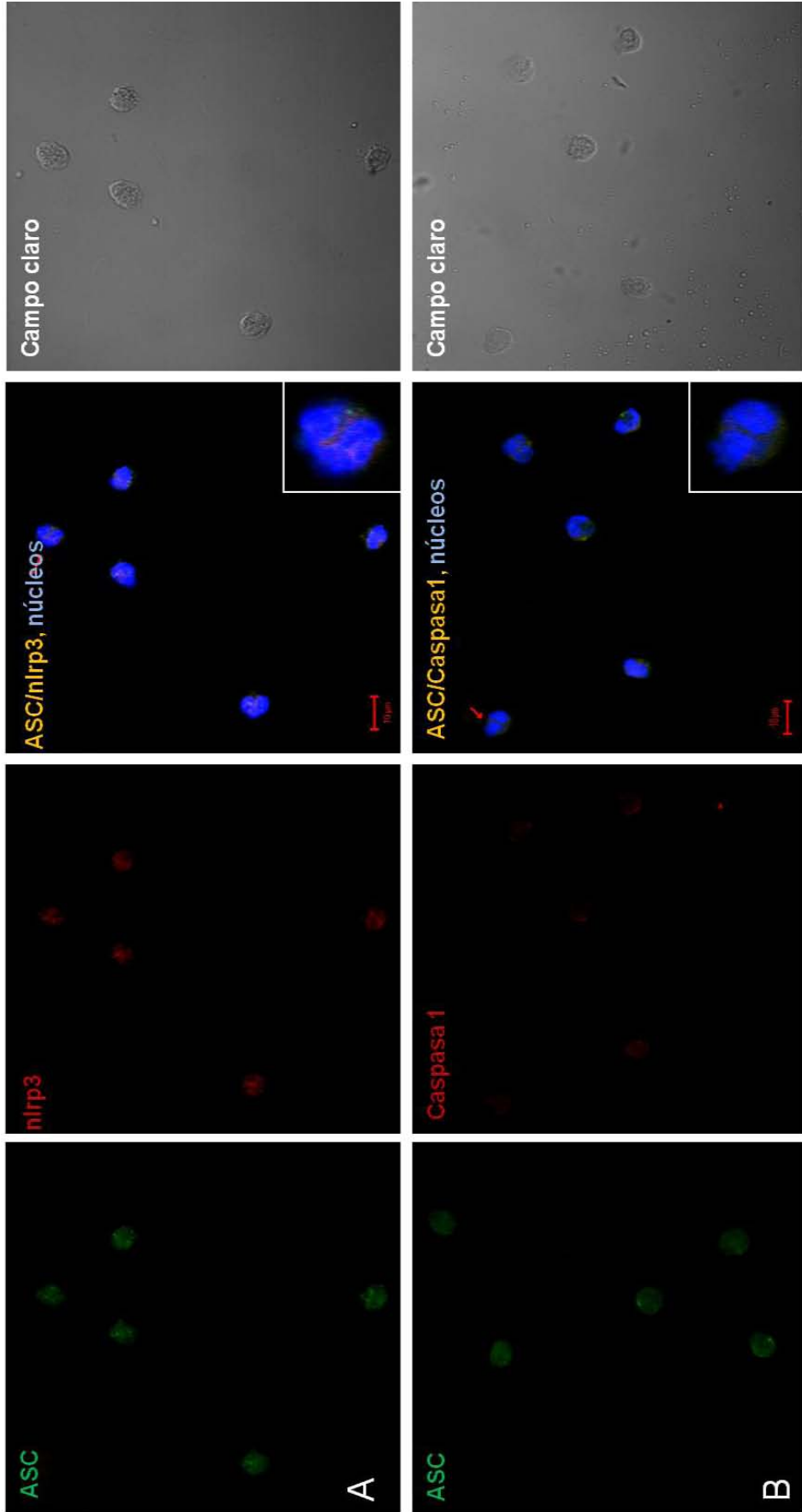
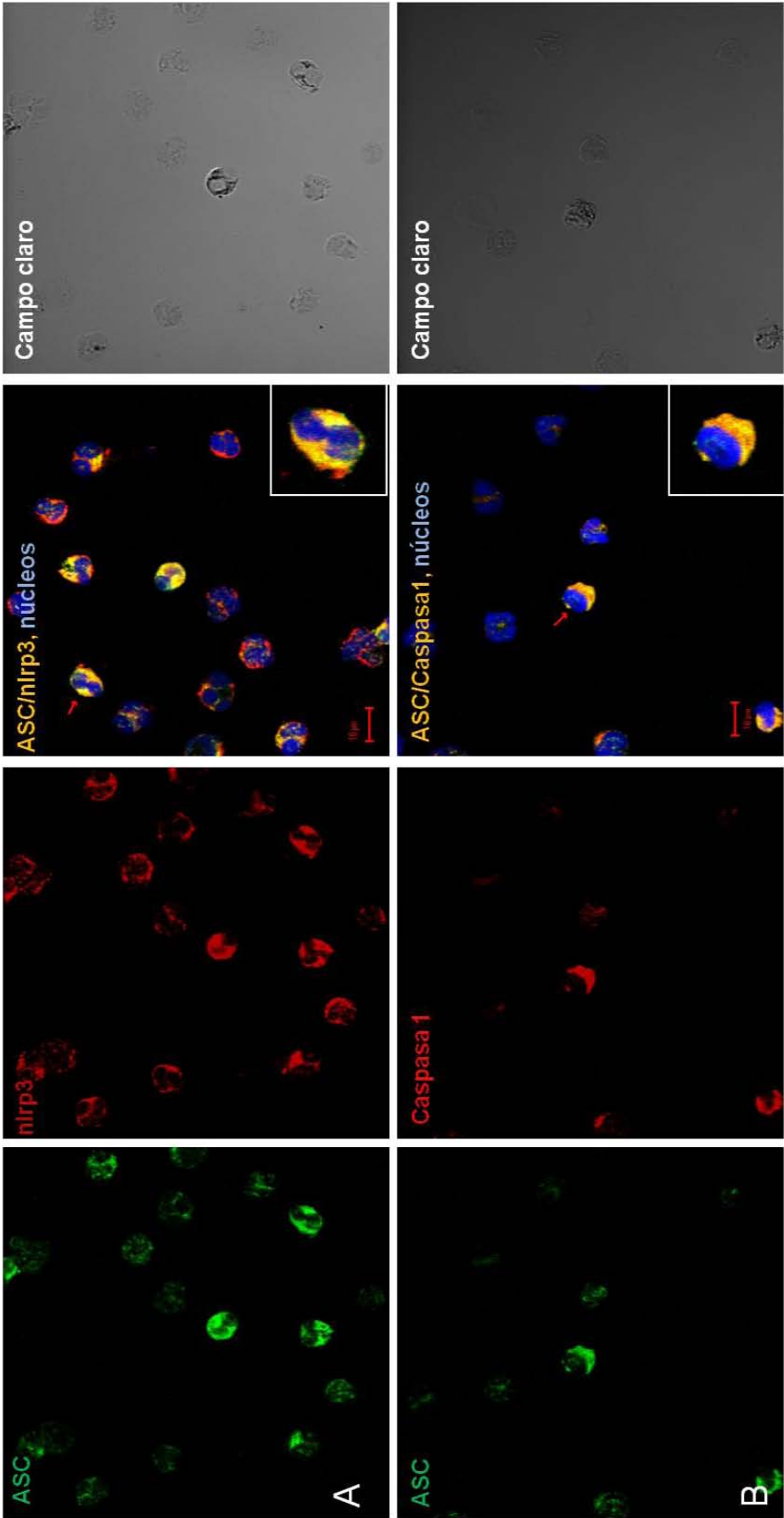


Figura 24. Colocalización de los componentes del Inflamasoma NLRP3 en PMN del grupo control. A. Expresión y colocalización de ASC y caspasa-1. B. Expresión de ASC y nlrp3 en PMN del grupo control. ASC (FITC), Caspasa-1y nlrp3 (Alexa 488), núcleos (DQ7). Micrografía 40X Micrografía representativa de 7 pacientes.



C

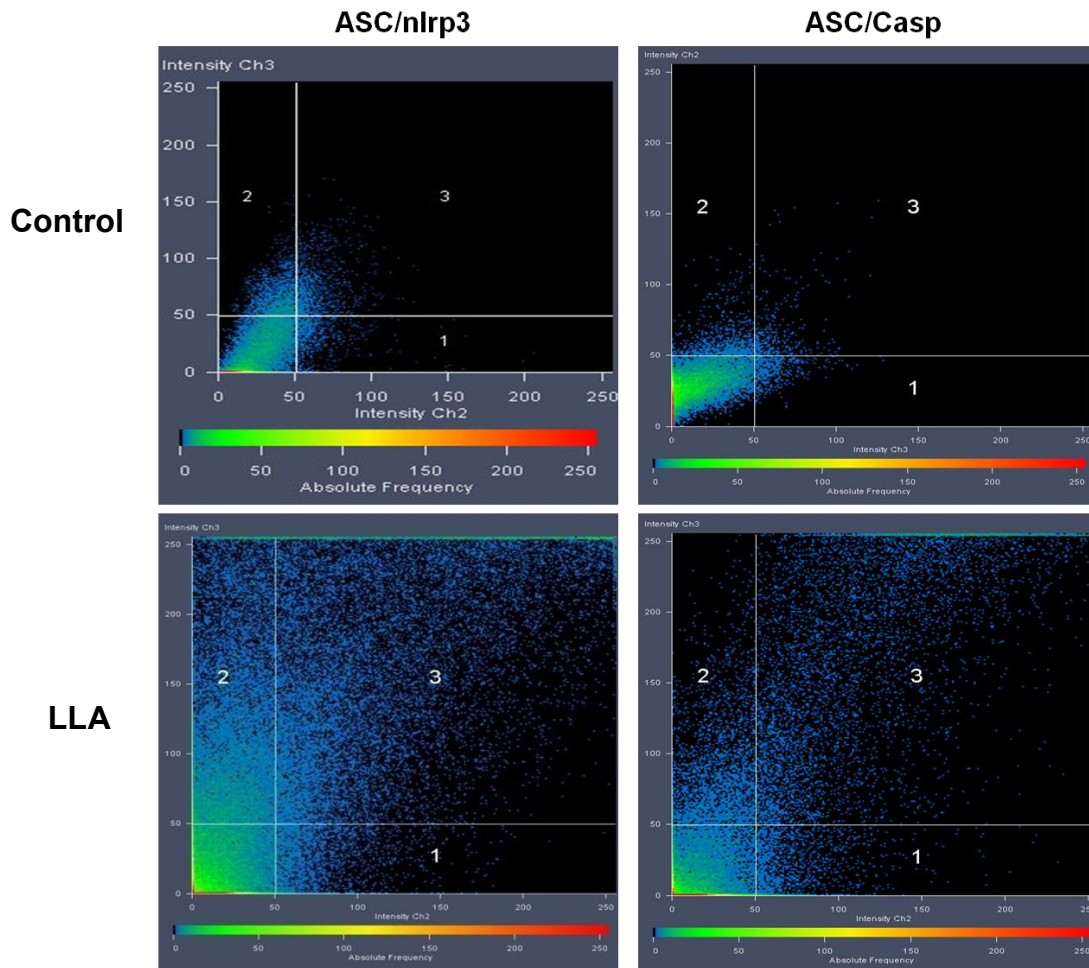


Figura 25. Colocalización de los componentes del Inflamasoma NLRP3 en PMN en la LLA. A. Expresión y colocalización de ASC y nlrp3. B. Expresión de ASC y caspasa-1 en PMN de pacientes con LLA; C. Gráficas de colocalización de los componentes del inflammasoma en células PMN. En cada gráfica de colocación se muestran tres cuadrantes, en el que se representa la MIF de nlrp3/Caspasa 1 (canal 1 (Ch1)) en el cuadrante 2, la MIF de ASC (canal 2 (Ch2)) en el cuadrante 1, y la MIF que converge de ambas proteínas en el cuadrante 3. ASC (FITC), Caspasa-1 y nlrp3 (Alexa 488), núcleos (DQ7). Micrografía 40 x (N=8).

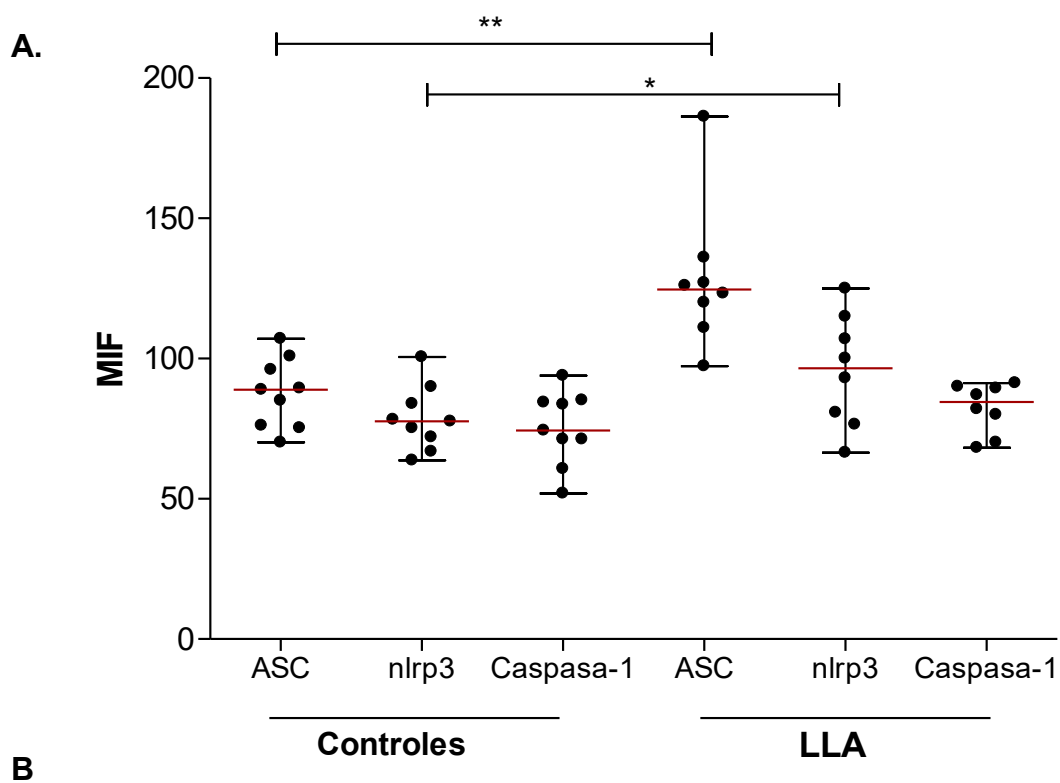


Figura 26. Expresión de los componentes del inflammasoma NLRP3 en PMN. A. Intensidad media de fluorescencia (MIF) del grupo control y pacientes con LLA. B. ** $p=0.0003$, * $p=0.04$. Prueba de U de Mann-Whitney. Tabla 10. (n=9).

10.9 Mecanismos de Muerte celular de los neutrófilos de pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda

La muerte celular de células PMN se determinó por medio de tres diferentes metodologías para saber si ésta es una de las causas de la neutropenia que los pacientes con LLA presentan durante la neoplasia (Figura 27-30).

La primer metodología utilizada fue la citometria de flujo, en la cual por medio de la incorporación de anexina (apoptosis) y Ioduro de Propidio (IP) (necrosis) de los neutrófilos purificados de pacientes con LLA, puede determinarse el estadio de muerte celular que presentan los neutrófilos al diagnóstico. Se observó de manera muy interesante que un 99 % de los neutrófilos de pacientes con LLA se encuentran en apoptosis tardía, y sólo del 0.24 -5 % en necrosis, al diagnóstico de la neoplasia (Figura 27A y 27B).

Los neutrófilos de controles y de pacientes con LLA se analizaron mediante la técnica de TUNEL y se observó que estaban en apoptosis. Se confirmó mediante esta metodología que los neutrófilos de los pacientes se encontraban en apoptosis. El 99% de las células de los pacientes fueron positivas (tinción café) mientras que las células de los controles sólo fueron positivas en un 2%. (Figura 27C).

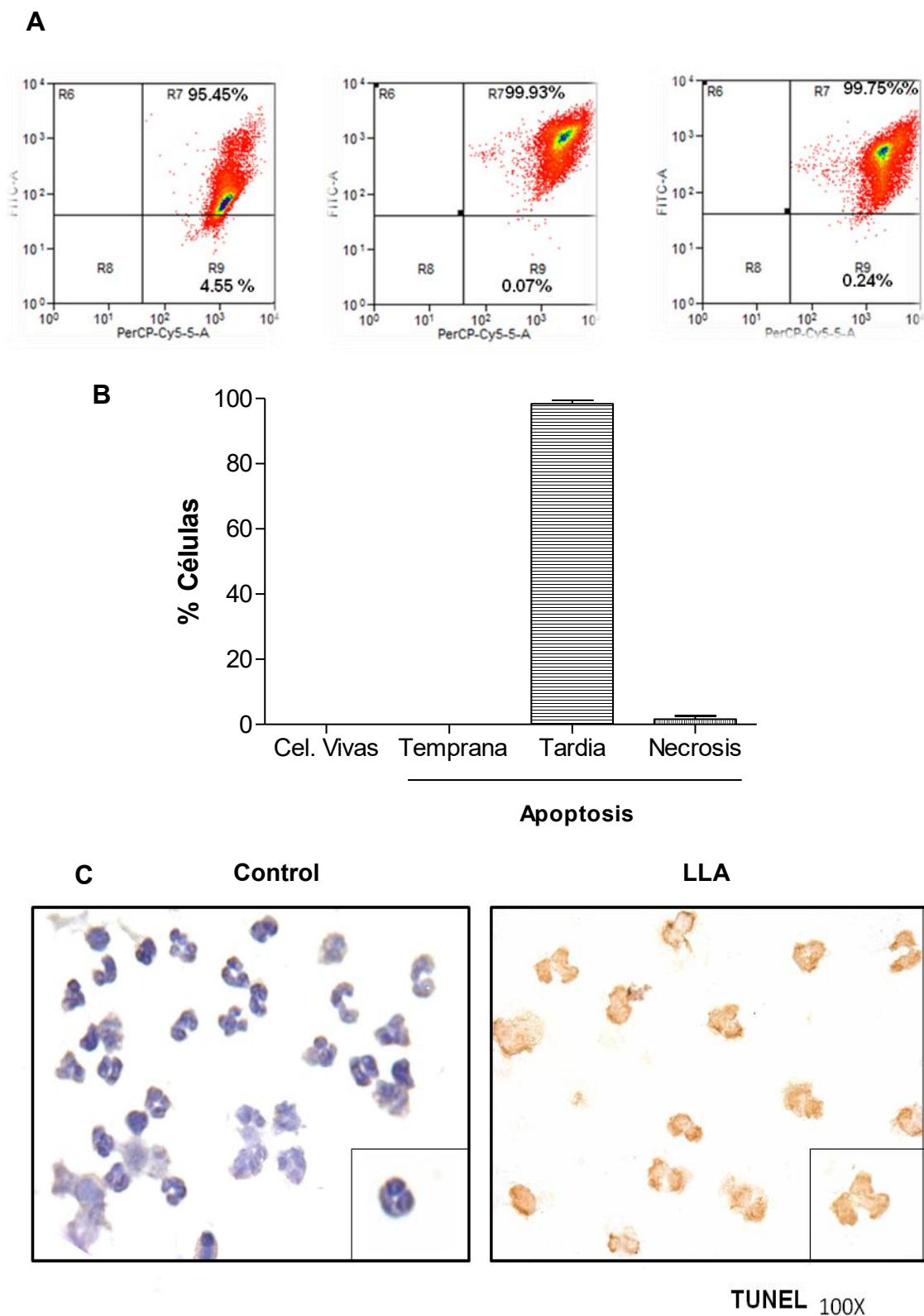


Figura 27. Determinación de Muerte celular en neutrófilos de pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda. A. Dots representativos de 3 pacientes con LLA; B. Grafica de % de células en muerte celular. Anexina (FITC) y con IP (PerCPp-Cy5) (Citometria de Flujo); C. Micrografía de neutrófilos en apoptosis en pacientes con LLA. (TUNEL).

10.9.1 Neutrófilos de pacientes con LLA son altamente susceptibles a la Muerte celular.

Con la finalidad de descartar la manipulación de las células como causa de la muerte celular previamente vista en los neutrófilos (Figura 27), Se analizaron 14 pacientes y 3 controles de manera inmediata a su purificación para determinar el estadio y mecanismo de muerte en de los neutrófilos utilizando el equipo de análisis MUSE, que determina la incorporación de la anexina V (apoptosis) y el 7ADD (necrosis) en las células.

Se observó que los neutrófilos obtenidos de los controles mantienen una viabilidad del 90%. El 2.5% se encontró en apoptosis temprana y el ~12% en apoptosis tardía. Sin embargo en el grupo de pacientes con LLA se observó una viabilidad del 40%. El 40% de éstos en apoptosis temprana y 20% en apoptosis tardía, lo que sugiere que los neutrófilos de los pacientes con LLA son altamente susceptibles a la muerte celular (Figura 28).

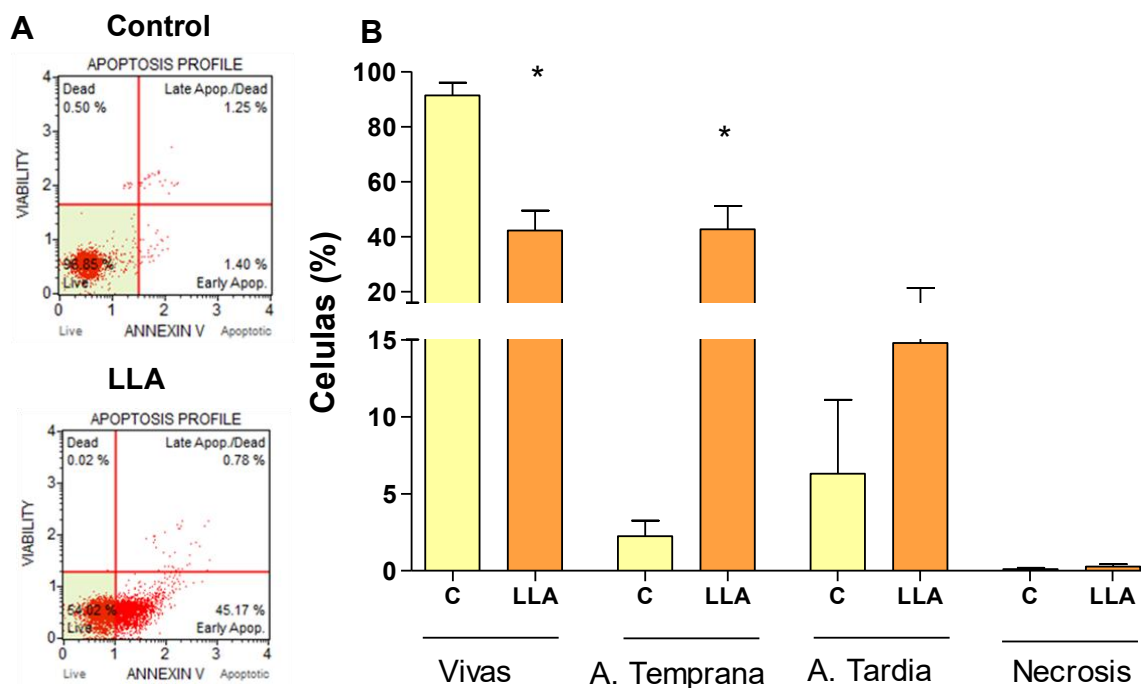


Figura 28. Apoptosis temprana en neutrófilos de pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda. A. Dot blots representativos del perfil de apoptosis en el grupo control y en pacientes con LLA; B. Grafica de % de células en los diferentes estadios de apoptosis; C (neutrófilos del grupo control), LLA (neutrófilos de pacientes). Determinación mediante el kit de Apoptosis MUSE™ (* $p < 0.05$) ANOVA de una vía, pos hoc comparación múltiple Tukey. Promedio de 14 experimentos independientes.

10.10 Activación de caspasas en pacientes con LLA

Previamente demostramos que los neutrófilos de pacientes con LLA fueron altamente susceptibles a morir (Figura 28), de tal manera procedimos a analizar, si las caspasas 1, 3- 9, estaban participando en la activación de la muerte celular de los neutrófilos, como control se utilizo a las células MN de los mismos pacientes (Figura 29). Determinamos que el 30 % de los neutrófilos presentaron las caspasas activas y a su vez que el 30% se encontraron muertos (Figura 29A), mientras que las células MN presentaron que el 95 % de las células se encontraron vivas y sólo el 5% tuvieron las caspasas activas y se encontraron en proceso de muerte (Figura 29B).

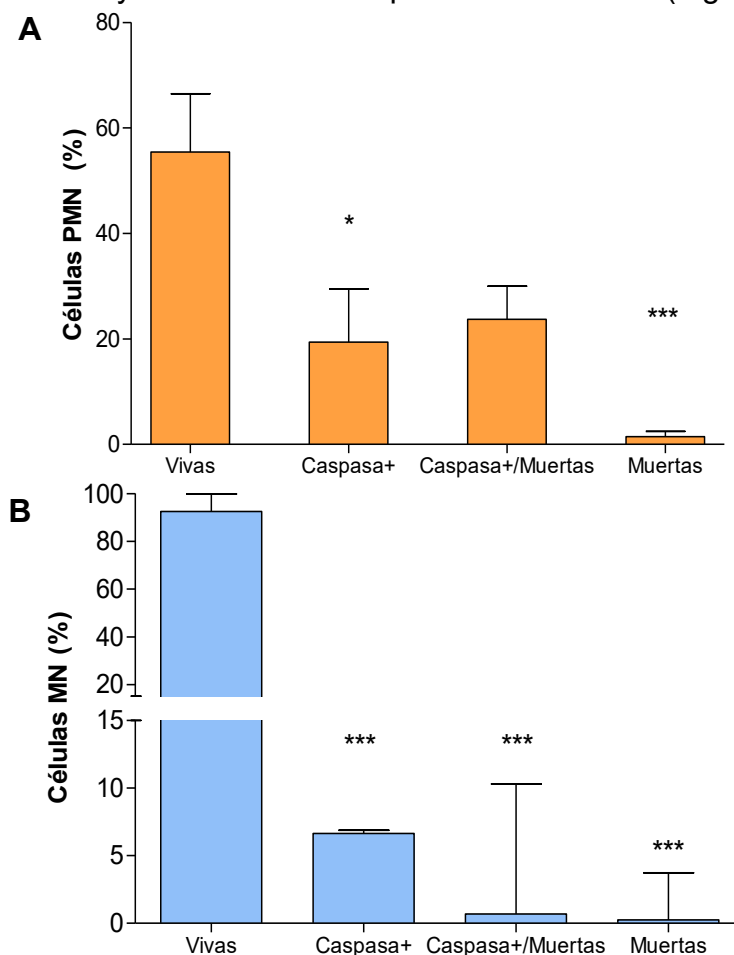


Figura 29. Caspasas activas en neutrófilos de pacientes con LLA. % de células vivas, con caspasas activadas y células muertas, A. Porcentaje de Neutrófilos de pacientes con LLA que expresaron las caspasas activas 1,3-9; B. Porcentaje de células MN de pacientes que presentaron las caspasas 1, 3-9. Determinación mediante el kit de MultiCaspasa MUSE™ en N=7 (* $p < 0.05$, *** $p < 0.0001$) ANOVA de una vía comparación múltiple Tukey.

10.11 Expresión de vacuolas autofágicas en LLA

Otro de los mecanismos de muerte celular en los neutrófilos de pacientes con LLA, como posible causa de la neutropenia evaluado en este trabajo fue la autofagia, la cual se determinó mediante la presencia de las vacuolas autofágicas identificadas con monodansilcadaverina (MCD) y evaluadas mediante microscopia confocal (Figura 30).

Se determinó en los neutrófilos de pacientes con LLA (N=7) la presencia de las vacuolas mediante el kit de autofagia (CYTO-ID® ENZO). Se observó que las células de los pacientes sin ningún estímulo externo, forman vacuolas autofágicas, sugiriendo que hay una señal interna que posiblemente active su formación y la activación de caspasas.



Figura 30. Expresión de vacuolas autofágicas/lisosomales en pacientes con LLA. MCD (Monodansilcadaverina/FITC), núcleos (DAPI). Imagen representativa de 10 experimentos independientes.

11. DISCUSIÓN

La leucemia linfoblástica aguda es la neoplasias más común en la edad pediátrica y la población de estudio de éste trabajo, proveniente del Hospital Infantil de México Federico Gómez y del Hospital Pediátrico Moctezuma, tuvo la mayor incidencia (36%) en el rango de edad de 3 a 5 años, coincidiendo con las estadísticas reportadas a nivel internacional (4).

Nuestra población de estudio fue de células linfoblásticas principalmente y dentro de éstas el fenotipo de células precursoras de B representó el 67%, de 15% a 20% menos de acuerdo a lo publicado (80%-85%) (9). Los casos de LLA que presentaron fenotipo de células T fueron 14 % y sólo 3% expresaron antígenos de origen linfoide y mieloide. Pese a los esfuerzos por clasificar a los pacientes de acuerdo a su inmunofenotipo, dada la importancia clínica que éste tiene, en nuestra población de estudio un 16% no pudo clasificarse. El inmunofenotipo de las células leucémicas es uno de los factores que se toman en cuenta para establecer el riesgo de recaída. No todos los casos de LLA expresan marcadores para un solo linaje, se han reportado numerosos casos donde las células expresan características de más de un linaje hematopoyético. De acuerdo a diferentes criterios, podemos encontrar LLA con expresión aberrante de antígenos, infidelidad de linaje, de linaje mixto y leucemias bifenotípicas (BAL) (9), lo cual es de importancia para el tratamiento de los pacientes.

En los niños con LLA encontramos que las concentraciones circulantes de TNF- α , IL-6, IL-8, MCP-1, IL-12, IFN- γ e IL-10 aumentaron significativamente e IL-17 mostró tendencia. Mientras que, las concentraciones de TGF- β disminuyeron y las de IL-1 β , IL-2, IL-13 e IL-4 no mostraron cambio significativo con respecto a los controles. Este hallazgo es muy interesante, ya que podría reflejar una inflamación estéril en LLA, quizá causada por DAMPs, ya que todos los niños incluidos en este estudio no mostraron infección aparente al momento del diagnóstico y no recibieron ningún tratamiento antineoplásico previo a la toma de la muestra de sangre.

Se sabe que las citocinas son reguladoras de la respuesta inmune del hospedero a las infecciones, a la inflamación y al daño a tejidos. Algunas citocinas promueven la inflamación (pro-inflamatorias), mientras que otras sirven para reducir la inflamación y promover la cicatrización de los tejidos (anti-inflamatorias). Para mantener la homeostasis y la integridad de los tejidos, las concentraciones de diferentes citocinas deben ser finamente controladas. La desregulación de las citocinas tiene un papel muy importante en diferentes patologías, incluyendo el cáncer (71-78).

En este estudio, hemos demostrado que a nivel sistémico, hay una condición pro-inflamatoria importante al momento del diagnóstico de la LLA en niños sin infección aparente. Es decir, en los niños de los que a pesar de todos los estudios microbiológicos y de biología molecular no pudo obtenerse una evidencia de infección. Por primera vez se muestra evidencia de que hay concentraciones elevadas de TNF- α e IL-6 en todos los pacientes sin infección, mientras que concentraciones elevadas de estas citocinas sólo se han reportado en presencia de procesos infecciosos, pero no en ausencia de microorganismos. Además, nuestro estudio mostró mediante un análisis de regresión logística, que hay una fuerte asociación de los altos niveles de TNF- α e IL-6 con la fiebre, con OR de 15.05 y de 2.8 respectivamente. De tal manera que las altas concentraciones de TNF- α e IL-6 que se encontraron en los pacientes con LLA, están asociadas con el estado febril que el 34 % de los niños presentaron, posiblemente como consecuencia de la activación de las células de la respuesta inmune por los DAMPS, los cuales tienen la capacidad de generar una respuesta inmune o una respuesta inflamatoria en ausencia de agentes infecciosos (74).

La IL-1 β el TNF- α y la IL-6 son citocinas pro-inflamatorias que pueden inducir fiebre y puede regular sus niveles entre ellas, dependiendo de su concentración (75). Diferentes vías celulares de señalización se activan en respuesta a diferentes concentraciones de citocinas pro-inflamatorias, y pueden conducir a daño genotóxico, apoptosis celular o crecimiento celular. El

incremento de la concentración de citocinas proinflamatorias a nivel sistémico encontrado en los pacientes con LLA, podría favorecer el proceso neoplásico. También se demostró que además del estado proinflamatorio que presentaron los pacientes con LLA, hubo una polarización de la respuesta inmune hacia Th1-Th17.

Por otro lado, los resultados de nuestro estudio sugieren que los incrementos en IL-6 e IL-8 en ausencia de infección aparente fueron inducidos por la activación de otras moléculas o mecanismos independientes de microorganismos infecciosos. Se sabe que la IL-6 es importante en el mantenimiento de las células progenitoras del cáncer, en el microambiente neoplásico de las células leucémicas en la LMA (76). También se ha demostrado que IL-6 estimula el crecimiento de células de LMA a través de la producción de señales que promueven y activan a las células leucémicas (77, 78).

En la LLA, IL-6 se ha reportado como un predictor sensible de la infección bacteriana en los niños con fiebre y con neutropenia, así como en los no neutropénicos (79). En un estudio sobre el papel de la IL-6 e IL-8 en un grupo pequeño de pacientes con neoplasias malignas hematológicas, se demostró que podían ser útiles para excluir la posibilidad de infección de alto riesgo (80). La IL-8 en el suero de pacientes con LLA en asociación con la infección de microorganismos Gram negativos, se encontró aumentada 10 veces, en comparación con el grupo control (81). Estos estudios demuestran que la IL-6 y la IL-8 pueden incrementarse por infección bacteriana. Sin embargo, en nuestro estudio encontramos que en ausencia de microorganismos infecciosos, dichas citocinas también se elevadas, lo cual revela una respuesta proinflamatoria asociada al proceso neoplásico y no a un proceso infeccioso.

En nuestro estudio, en los pacientes con LLA, encontramos altas concentraciones de MCP-1 (MCP-1/CCL2), un miembro de la familia de las

quimiocinas CC y contribuye al ambiente inflamatorio. Previamente se ha demostrado que MCP-1 tiene un papel importante en la migración de monocitos hacia células leucémicas humanas. Sin embargo, no puede aumentar los efectos citotóxicos de los monocitos hacia las células leucémicas humanas (82). Elevados niveles de MCP-1 en el líquido cefalorraquídeo de niños con LLA se asocia con afectación del SNC durante el tratamiento (83). Hay informes sobre un incremento en la concentración de algunas citocinas inflamatorias en la LLA asociado con la presencia de infección o en respuesta a la quimioterapia (82-87). Sin embargo, no hay informes de un proceso inflamatorio inicial al diagnóstico de los pacientes con LLA, sin infección aparente, lo cual concuerda con un reciente estudio en el que, se evaluaron los niveles de quimiocinas IL-8 y MCP-1 en pacientes adultos con LLA, al momento del diagnóstico y se encontraron niveles elevados, lo cual se atribuyó a la actividad de la enfermedad (76).

Las citocinas como IL-10, IL-17 y TGF- β tienen una función muy importante en la regulación de la respuesta inmune. La función biológica de la IL-10 en el cáncer es bastante compleja. Sin embargo, la presencia de IL-10 en metástasis avanzada y la correlación positiva entre la IL-10 sérica y la progresión de otras enfermedades sugieren un papel crítico de la IL-10 en el microambiente (88, 89). En LLA se ha asociado el polimorfismo de la IL-10 en A-592C con la modulación de la expresión de la IL-10, estableciéndolo como factor de riesgo y posible biomarcador para ésta neoplasia (90). Por otro lado, la IL-17 es una citocina producida por un tipo de células T cooperadoras, llamadas "células Th17", que se generan a partir de señales producidas por TGF- β , IL-6 e IL-23 (91, 92). IL-17 activa las mismas vías de señalización que las citocinas inflamatorias como TNF- α e IL-1 β y se considera una molécula puente importante entre los sistemas inmune innato y adaptativo (93). El estudio de esta citocina mostró que se incrementa en la sangre y en la médula ósea de pacientes con LMA, con mal pronóstico en comparación con donadores sanos (94). En los pacientes con LLA de nuestro estudio, también

la encontramos elevada con respecto al grupo control, mostrando tendencia, pero no significancia estadística, lo cual puede deberse a la gran dispersión de los valores, lo que sugiere una respuesta Th17 en pacientes con LLA, que nos lleva a estudiar la regulación de las citocinas inflamatorias en un ambiente estéril. Otra citocina evaluada en este trabajo fue TGF- β , la cual se encontró a nivel sistémico disminuida en los pacientes con LLA, respecto a los controles. En este contexto, la baja concentración de TGF- β protege al microambiente de la leucemia favoreciendo la eliminación de los blastos, ya que su baja concentración no permite el crecimiento, desarrollo y maduración de las células B (95). Además de no llevar a cabo su función de supresora de tumores que a diferencia de los tumores sólidos participa como una citocina inmunosupresora e inductora de las células neoplasias (96, 97).

En el cáncer se ha informado del papel de la IL-12 como parte de la inmunovigilancia (98), todos los estudios de esta citocina se han centrado en la inmunoterapia (99). Nuestros resultados indican que la IL-12 y el IFN- γ estuvieron incrementados en los pacientes con LLA, con respecto al grupo control, lo que indica que hubo una respuesta inmune polarizada hacia Th1 en los pacientes con esta neoplasia. Las alteraciones de la relación Th1/Th2 en pacientes con cáncer son una característica común de un proceso maligno (carcinogénesis) y podrían ser el resultado de un mal funcionamiento de las células Th1, la activación de los linfocitos Th2, o ambos fenómenos. Adicionalmente en este trabajo encontramos menor concentración de IL-13 (citocina Th2) en los pacientes que en los controles, lo que confirma una respuesta predominantemente de tipo Th1.

Los resultados de este estudio tienen importantes implicaciones para la comprensión de la respuesta inflamatoria en pacientes con LLA sin infección clínicamente aparente y el puente importante entre la respuesta inmune innata y adaptativa a través de la polarización de las células T. Las mayores concentraciones de citocinas pueden jugar un papel crucial en la patogénesis de la LLA y pueden ser blancos terapéuticos importantes. También pueden ser

predictoras de los cuadro de fiebre de origen desconocido y en la respuesta inflamatoria sin infección aparente. Debido a la variabilidad de los resultados y a la importancia de las citosinas, fue necesario establecer el valor de corte de éstas, mediante curvas ROC y así poder determinar su asociación con la fiebre. Nuestros resultados muestran que las citocinas IL-6, TNF- α , IL-8 e IL-10, son factores de riesgo para desencadenar la fiebre en los pacientes con LLA y que el TGF- β puede ser un factor protector.

El estudio de la respuesta inflamatoria estéril aún es poco claro. Sin embargo, se sabe que puede ser originada por DAMPs, también desconocidos, los cuales se sabe tienen la capacidad de activar la respuesta inmune a través de diferentes receptores de reconocimiento patrón (PRRs) (100 101-105). Además, algunos de ellos se sabe que participan en procesos carcinogénicos, tal es el caso del ácido úrico y la proteína HMGB1 (102, 106). En la leucemia linfoblástica aguda, la activación del sistema inmune, sin agente infeccioso, puede deberse a los DAMPs, lo cual es de suma importancia para el mantenimiento del sistema de alerta del organismo, que sirve como indicador de que se ha roto la homeostasis, desencadenando un proceso inflamatorio importante. Nuestros resultados muestran que en la LLA existe una desregulación importante en las citocinas circulantes y que hay un fuerte ambiente inflamatorio en ausencia de microorganismo causal, lo que sugiere la presencia de DAMPs en los niños con LLA sin infección.

Se encontró que el ácido úrico, HMGB1 y las proteínas S100 estuvieron incrementadas en los niños con LLA con respecto a los controles, por lo que es posible que estas moléculas estén funcionando como DAMPs ó alarminas en esta neoplasia. El ácido úrico es un antioxidante y juega un papel importante cuando se encuentra en suero, promueve un fuerte proceso inflamatorio en las articulaciones y aumento en la densidad mineral de los huesos (107), los altos niveles de ácido úrico se consideran factor de riesgo para presentar cáncer y una alta mortalidad (107). En la LLA, el ácido úrico puede acumularse en la sangre como resultado de la lisis tumoral, debido a la

gran cantidad de linfocitos, por lo que podría jugar un papel importante como alarmina o DAMP, generando falta de homeostasis en los pacientes con LLA. Las proteínas S100A8 y/o S100A9 extracelulares, se sabe que contribuyen a la formación del nicho pre-metastásico. También, a la liberación de TNF- α , TGF- β y VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) (108). De acuerdo a la función de estas dos proteínas, es probable que están activando constantemente la respuesta inflamatoria a través de la interacción con los receptores tipo-Toll, RAGE, entre otros, pero también pueden estar amplificando la respuesta (100). Otro de los hallazgos importantes de este trabajo fue encontrar que las proteínas de choque térmico analizadas, están en concentraciones menores a nivel sistémico que en los controles. Sin embargo, hay evidencia en otros cánceres, que la Hsp27 y Hsp60 se encuentran en concentraciones elevadas en suero (108). Podemos destacar de las HSPs estudiadas, que la Hsp27 (TOTAL) es la que más se libera a nivel sistémico en los pacientes con LLA, seguida de su forma activa y la Hsp90. Sin embargo, sus concentraciones fueron menores con respecto al grupo control y las curvas ROC permitieron demostrar que son factores protectores para la LLA. Por otro lado, se ha demostrado que hay un aumento de la transcripción de las HSP en las células tumorales, por la pérdida de las funciones de p53, así como una mayor expresión de proto-oncogenes, como HER y c-Myc y esto es crucial para la tumorigénesis (109). Además, se ha demostrado que proteínas como la HSP27 están relacionadas con resistencia a la quimioterapia en leucemia y en la adquisición de fenotipos drogo resistentes (109).

La Hsp90 es una proteína chaperona, que en condiciones normales, ayuda a otras proteínas a plegarse correctamente y estabiliza las proteínas contra el estrés por calor en el citosol. Los resultados que se encontraron de esta proteína en los pacientes con LLA que presentaron fiebre al diagnóstico, mostraron que se encontró elevada con respecto a los pacientes sin fiebre, por lo que podría estar asociada al cuadro febril que cursan los niños con LLA. La

elevada concentración en suero de Hsp90 sugiere ampliar el estudio de esta proteína como un posible biomarcador en los casos de fiebre de origen desconocido, donde no se logra aislar un microorganismo causal permitiendo evitar retrasar el tratamiento antineoplásico.

HMGB1 tiene funciones biológicas tanto dentro, como fuera de la célula y desempeña un papel importante en muchas enfermedades, especialmente enfermedades inflamatorias y cáncer (111, 112), por lo que fue de suma importancia determinarla en nuestra población de estudio. Nuestros resultados mostraron un incremento en la concentración sérica de los pacientes con LLA respecto a los controles, sin diferencia estadística significativa. Sin embargo, el análisis de curvas ROC y Odds ratio mostró que HMGB-1 es un factor de riesgo para LLA. Hasta el momento, sólo se tenía evidencia de que HMGB1 jugaba un papel en la quimioresistencia de la LLA, pero ninguna de que esta proteína pudiera tener un papel de DAMP, en este tipo de neoplasia. Se sabe que HMGB1 cuando se encuentra de manera extracelular tiene la capacidad de unirse a varios receptores de superficie celular, como los TLRs ó RAGE, para activar la señalización río abajo, de NF- κ B, del factor 3 de regulación de IFN (IRF3) y de la fosfoinositol 3 cinasa (PI3K), para inducir la activación de células del sistema inmune, generando producción de citocinas pro-inflamatorias e interferon tipo I, inhibición de fagocitosis, promoción de proliferación celular y angiogénesis e inducción de autofagia (113, 114). En este contexto nuestros resultados sugieren que el proceso inflamatorio en los pacientes con LLA puede estar siendo inducido por la liberación de este DAMP, también sugieren su posible participación en la inducción de vacuolas autofágicas observadas en los neutrófilos de los pacientes con LLA.

La importancia de conocer los mecanismos que activan los diferentes procesos celulares de la respuesta inflamatoria, es que permiten identificar blancos terapéuticos que ayuden a contrarrestar o regular la respuesta inflamatoria. En la LLA a la fecha no hay evidencias que indiquen cuál es el mecanismo por el cual se están induciendo las citocinas inflamatorias bajo condiciones no infecciosas. Parte de nuestro trabajo se enfocó a establecer un

posible mecanismo de activación de una de las citocinas proinflamatorias, la IL-1 β , la cual se sabe puede ser activada por el inflamasoma. Para esto inicialmente utilizamos dos líneas celulares de leucemia (RS4 y Reh) las cuales fueron caracterizadas con respecto a su capacidad de respuesta a MAMPs (Patrones Moleculares Asociados a Microorganismos) y a expresión de componentes del inflamasoma, encontrando que producen IL-1 β por activación con LPS de *E. coli*.

; sugiriendo que estas líneas celulares pueden estar siendo activadas a través de los receptores tipo-Toll 2 y 4, receptores que se sabe participan en el reconocimiento de MAMPs y DAMPs y que además pueden activar al inflamasoma, observamos la expresión de los componentes del inflamasoma NLRP3 en estas líneas celulares, lo cual nos permitió conocer que se expresan de forma basal.

La expresión de los componentes del inflamasoma NLRP3 también se analizó en células de pacientes con LLA, tanto en células PMN como en células MN, los resultados mostraron de forma muy interesante que la colocalización de los componentes del inflamasoma es específica en la zona perinuclear y que la expresión de los componentes aumenta en la LLA, sugiriendo que el inflamasoma se ensambla y que posiblemente está participando en la respuesta inflamatoria de los pacientes, previamente descrita. Sin embargo, no hay que descartar que el inflamasoma también puede tener un papel en la regulación negativa como la que ocurre en otros cáncer donde el proceso inflamatorio es crucial (115, 116). Además de la participación en el proceso inflamatorio, el inflamasoma puede participar en la activación de procesos de muerte celular (117). De tal manera que en los casos de neutropenia de la LLA, posiblemente este sea un mecanismo por el cual se estén activando los neutrófilos y mueran vía apoptosis.

La muerte celular de los neutrófilos, en general se sabe que es un proceso fundamental para la homeostasis del organismo, por lo que su estudio es primordial en estados patológicos como la LLA, donde es necesario entender

el estado de neutropenia que los pacientes con LLA pueden presentar como una de las principales complicaciones. Nuestros resultados indican que los neutrófilos de pacientes con LLA son más susceptibles a la muerte celular, esto es un hallazgo novedoso que contribuye a entender la neutropenia. Ya que hasta el momento no se tenía claro el origen de esta condición clínica. La muerte celular observada fue principalmente en las células PMN de los pacientes con LLA, encontrándolos en apoptosis temprana en su mayoría.

La característica fundamental que distingue la mayoría de las formas de necrosis de la apoptosis, es la rápida pérdida de los potenciales de membrana. Esto puede ser consecuencia de depleción de la energía celular, daño en los lípidos de membrana y/o pérdida de la función de las bombas iónicas o canales homeostáticos (117). Al evaluar la muerte celular de los neutrófilos de los pacientes con LLA y de los controles por medio de la incorporación de anexina a la membrana celular o de IP (Ioduro de propidio) al DNA, se observó que se encontraban en un estado de apoptosis tardía, es decir un estado en el que la células tienen un porcentaje de fragmentación celular que pudiera considerarse necrosis, lo cual puede estar contribuyendo a que los pacientes presenten un estado de neutropenia. Existen otros factores que pueden estar contribuyendo a la muerte de esta estirpe celular, como es la presencia de HMGB1 y proteínas S100 (119, 120), las cuales encontramos elevadas en los pacientes con LLA.

Por otro lado, sabemos que el complejo extracelular S100A8/A9 puede inhibir el crecimiento de una variedad de tipos de células normales (macrófagos, células de la médula ósea, linfocitos, fibroblastos) y tienen actividad inductora de apoptosis en diversas células tumorales. En algunas células, S100A8/A9 puede inducir apoptosis a través de la unión al receptor de la superficie celular de una manera zinc–independiente (120). Otro estudio sugiere que S100A8/A9 ejerce actividad apoptótica por la liberación selectiva de Smac/DIABLO y Omi/HtrA2 de la mitocondria y la modulación de la proteína

anti-apoptótica Bcl-2 (118). Interesantemente, S100A8/A9 también puede promover la muerte de forma similar a la autofagia al provocar la translocación de BNIP3 a la mitocondria (121). Nuestros resultados sugieren que los neutrófilos de pacientes con LLA activan su mecanismo de muerte celular a través de la apoptosis por las vías intrínseca y extrínseca, debido a las altas concentraciones de citocinas y de DAMPs encontrados a nivel sistémico y a una importante activación de las caspasas implicadas en ambos procesos, en ésta estirpe celular. Sin embargo, aún falta estudiar de manera detallada las causas de la alta susceptibilidad a la muerte en los neutrófilos de los pacientes con LLA, para entender las causas de la neutropenia. Es difícil definir que mecanismo ocurre primero, ya que puede ocurrir sinergia entre ambos mecanismos de muerte y requiere de estudios posteriores.

Finalmente, todo lo anterior demuestra que nuestro estudio es de suma importancia, para el entendimiento de la generación de fiebre en la leucemia linfoblástica aguda y rompe un paradigma importante en el origen de la inducción de la respuesta inflamatoria, implicada en esta neoplasia, bajo condiciones sin infección clínica aparente. Encontramos que los DAMPs y las citocinas inflamatorias juegan un papel importante en la activación y regulación del proceso inflamatorio, sugiriendo ser las señales necesarias para la activación de los neutrófilos y por consecuencia su muerte. También encontramos que cuatro de las citocinas estudiadas están asociadas a la generación de la fiebre en éstos pacientes. Aún falta profundizar en los mecanismos implicados, que ayuden a establecer mejores estrategias clínicas, para el manejo de los pacientes con LLA.

12. RESUMEN DE RESULTADOS

- Los pacientes con LLA sin infección aparente, presentan un fuerte perfil inflamatorio al diagnóstico de la neoplasia, con elevación sérica de TNF- α , IL-6, IL-8, MCP-1, IL-12, IFN- γ e IL-10. Así como, disminución del TGF- β .
- Las citocinas TNF- α , IL-6, IL-8 e IL-10, son factores de riesgo para desarrollar fiebre y la reducción en TGF- β , es un factor protector.
- Las proteínas séricas de choque térmico, Hsp27, Hsp60, Hsp70 y Hsp90, se encontraron disminuidas en los pacientes con LLA.
- Los DAMPs, S100A8, ácido úrico y HMGB1 están incrementados en los pacientes con LLA y son factores de riesgo.
- Las líneas celulares de LLA, REH y RS4 tienen la capacidad de producir IL-1 β y expresan los componentes del inflamasoma NLRP3.
- La expresión y co-localización de los componentes del inflamasoma, en los neutrófilos de pacientes con LLA, sugieren la interacción entre nlrp3-ASC y ASC-caspasa-1. Lo cual sugiere la activación del inflamasoma NLRP3 y con ello el probable mecanismo de maduración de la IL-1 β , en los pacientes con LLA.
- Los neutrófilos de pacientes con LLA son más susceptibles a la muerte celular y se encuentran en apoptosis temprana y tardía al diagnóstico de la neoplasia.
- Las caspasas 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 se encuentran activas, induciendo la muerte celular en los neutrófilos de pacientes con LLA.
- Los neutrófilos de pacientes con LLA forman vacuolas autofágicas, lo que sugiere que esta estirpe celular, lleva a cabo la autofagia como otro mecanismo de muerte.

13. CONCLUSIONES

Los pacientes con LLA sin infección clínica aparente presentan una fuerte respuesta inflamatoria, con incremento a nivel sistémico de citocinas y quimiocinas inflamatorias y concentraciones elevadas de DAMPs, como ácido úrico, proteínas S100A8 y HMGB1.

Las citocinas TNF- α , IL-6, IL-8 e IL-10, están asociadas a la fiebre de los pacientes y los DAMPs estudiados, no se encontraron asociados a la fiebre. Sin embargo, HMGB-1 mostró ser un factor de riesgo para LLA.

Los componentes del inflamasoma NLRP3 se encuentran expresados en las células de los pacientes con LLA.

Los neutrófilos de pacientes con LLA son altamente susceptibles a la muerte celular por la activación de caspasas y por autofagia, sugiriendo que es una de las causas que originan la neutropenia.

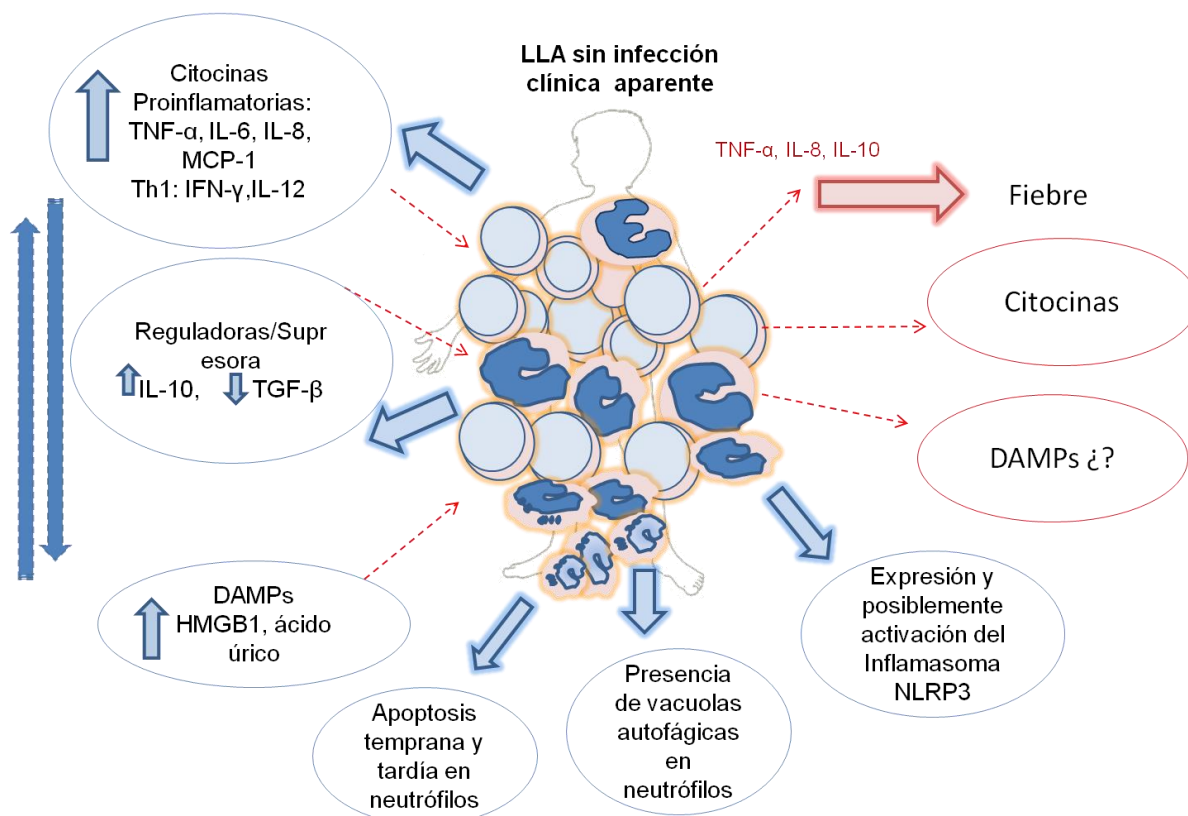


Figura 31. Esquema representativo del micro ambiente inflamatorio en la LLA. Los pacientes con LLA sin infección aparente presentan un incremento en la liberación de citoquinas inflamatorias, inmunosupresoras y Th1 y reducción de una citocina inmunoregadora, así como incremento en los DAMPs, HMGB1 y ácido úrico, que pueden estar activando las células del organismo para inducir fiebre, donde probablemente también se están liberando citoquinas y DAMPs importantes asociados al estado febril. Además, en la LLA se presenta la activación del inflamasoma NLRP3 y de mecanismos de inducción de muerte mediante caspasas y autofagia.

14. PERSPECTIVAS

El presente trabajo permite continuar el estudio del proceso inflamatorio que cursan los pacientes con LLA sin infección clínica aparente, así como determinar la etiología de los cuadros de neutropenia y fiebre, para una mejor comprensión de la complicación más importante en esta neoplasia y poder establecer estrategias clínicas que ayuden en el manejo de los pacientes con LLA, mediante los siguientes estudios:

- ✓ Discernir la secuencia de eventos que ocurren en el reconocimiento de HMGB1 para inducir un proceso inflamatorio en la leucemia linfoblástica aguda.
- ✓ Evaluar la participación de otros DAMPs, en la inducción de fiebre de los pacientes con LLA, como ATP o ácidos nucleicos extracelulares e incrementar el número de pacientes con fiebre, para observar con mayor claridad la participación de los DAMPs.
- ✓ Conocer el mecanismo de regulación de la IL-10 y el TGF- β en la LLA.
- ✓ Determinar marcadores de superficie celular como CD56, receptores RAGE y Toll, como posibles inductores del proceso de muerte en los neutrófilos de pacientes con LLA.
- ✓ Determinar la pyroptosis como otro posible mecanismo de muerte en los neutrófilos de pacientes con LLA.
- ✓ Establecer un modelo *in vitro* para la evaluación del efecto de los DAMPs, en la LLA.

15. LITERATURA CITADA

1. Lanzkowsky P. *Lanzkowsky's Manual of Pediatric Hematology and Oncology*, 3rd edition. Academic;1999.
2. Xie Y, Davies SM, Xiang Y, Robison LL, Ross JA. Trends in leukemia incidence and survival in the United States (1973-1998). *Cancer*. 2003; 97:2229-2235.
3. McNeil DE, Coté TR, Clegg L, Mauer A. SEER update of incidence and trends in pediatric malignancies: acute lymphoblastic leukemia. *Med Pediatr Oncol*. 2002;39:554-557.
4. Medina-Sanson A, Martínez-Avalos A, Gallegos-Castorena S, Juárez-Villegas LE, González-Montalvo P, et al. Pediatric oncology at Hospital Infantil de México; Fifty five years of accomplishment. *Ped Hem Oncol*. 2002;19:383-387.
5. Pérez-Saldivar ML, Fajardo-Gutiérrez A, Bernaldez-Rios R, Martínez-Ávalos A, Medina-Sanson, Espinosa-Hernández L, et al. Childhood acute leukemias are frequent in Mexico City: descriptive epidemiology. *BMC Cancer*. 2011;11:355.
6. Ortega Sánchez MA., Osnaya Ortega ML., Rosas Barrientos JV. Leucemia linfoblástica aguda. *Medicina Interna de México*. 2007;23:26-33.
7. Rovelo-Lima JE., García-Rodríguez FM., Alvarado-Silva C, Jiménez-Villanueva, X., Aboharp-Hassan Z., Sosa-Duran E.E. Síndrome de Lisis Tumoral. *Gaceta Mexicana de Oncología*. 2010; 9(4):175-179.

8. Dorantes-Acosta E, Medina-Sanson A, Dávila-Ornelas K, Briceida López-Martínez B. Clasificación inmunológica de las leucemias agudas linfoblásticas del Hospital Infantil de México Federico Gómez, de acuerdo al EGIL (European Group for the Immunological Classification of Leukemia) *Gaceta Mexicana de Oncología*. 2013; 12(3):136-142.
9. Pizzo PA. Fever in immunocompromised patients. *N Eng J Med* 1999; 341:893-900.
10. Silver RT, Beal GA, Schneiderman MA. The role of mature neutrophil in bacterial infections in acute leukemia. *Blood*. 1957; 12:814-821.
11. López P, López E. Neutropenia Febril en Pediatría. *Asociación Colombiana de Infectología*. 2008; 12(1). 64-71.
12. Akpede GO, Akenzua GI. Management of children with prolonged fever of unknown origin and difficulties in the management of fever of unknown origin in children in developing countries. *Paediatr Drugs*. 2001; 3: 247-62.
13. Escosa-García L., Baquero-Artigao F., Méndez-Echevarría A. Fiebre de origen desconocido. *Pediatr Integral* 2014; XVIII(1): 15-21.
14. Castellheim A, Brekke OL, Espevik T, Harboe M, Mollnes TE. Innate immune responses to danger signals in systemic inflammatory response syndrome and sepsis. *Scan J Immunol* 2009; 69:479-491.
15. Kim DY1, Lee YS, Ahn S, Chun YH, Lim KS. The usefulness of procalcitonin and C-reactive protein as early diagnostic markers of bacteremia in cancer patients with febrile neutropenia. *Cancer Res Treat*. 2011; 43(3):176-80.

16. Marco E. Bianchi. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of Leukocyte Biology* 2007; 81(1):1-5.
17. Martinon F, Mayor A, Tschopp. The Inflammasomes: Guardians of the Body. *Annu. Rev. Immunol.* 2009; 27:229–65.
18. Netea MG, Simon A, van de Veerdonk, Kullberg B, Van der Meer, Joosten L. IL-1 β Processing in Host Defense: Beyond the Inflammasomes. *PLoS Pathogens* 2010; 6:2; 1-9.
19. Frydman J. Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. *Annu Rev Biochem.* 2001;70:603-47.
20. Javid B, MacAry PA, Lehner PJ. Structure and function: heat shock proteins and adaptive immunity. *J Immunol* 2007; 179(4):2035-40.
21. Vogl T, Gharibyan AL, Morozova-Roche LA. Pro-inflammatory S100A8 and S100A9 proteins: self-assembly into multifunctional native and amyloid complexes. *Int J Mol Sci* 2012; 13(3):2893-917.
22. Harris HE, Andersson U, Pisetsky DS. HMGB1: a multifunctional alarmin driving autoimmune and inflammatory disease. *Nat Rev Rheumatol.* 2012;8(4):195-202.
23. Hou W, Zhang Q, Yan Z, Chen R, Zeh III HJ, Kang R, Lotze MT, Tang D. Strange attractors: DAMPs and autophagy link tumor cell death and immunity. *Cell Death Dis* 2013 Dec 12;4:e966.
24. Xu Q. Role of heat shock proteins in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc. Biol.* 2002; 22:1547-59.

25. Tsan MF, Gao B. Heat shock proteins and immune system. *J Leukoc Biol.* 2009;85(6):905-10.
26. Wang X, Ji J, Zhang H, Fan Z, Zhang L, Shi L, Zhou F, Chen WR, Wang H, Wang X. Stimulation of dendritic cells by DAMPs in ALA-PDT treated SCC tumor cells. *Oncotarget.* 2015.
27. HICK RW, Gruver AL, Ventevogel MS, Haynes BF, Sempowski GD. Leptin selectively augments thymopoiesis in leptin deficiency and lipopolysaccharide-induced thymic atrophy. *J Immunol* 2006; 177(1):169-76.
28. Newman KC, Riley EM. Whatever turns you on: accessory-cell-dependent activation of NK cells by pathogens. *Nat Rev Immunol* 2007; 7(4):279-91.
29. Pratt WB, Toft DO. Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp Biol Med (Maywood).* 2003;228:111-33.
30. Ciupitu A, Peterson M, O'donnell C, Williams K, Jindal S, Kiessling R et al. Immunization with a lymphocytic choriomeningitis virus peptide in protective antiviral immunity and specific cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 1998; 187: 685-91.
31. Multhoff G, Botzler C, Wiesnet M, Muller E, Meiert T, Wilmanns. A stress-inducible 72 kDa heat-shock protein (HSP72) is expressed on the surface of human tumor cell, but not on normal cells. *Int J Cancer* 1995; 61: 272-9.

32. Pratt WB, Toft DO. Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2003;228:111-33
33. Szekely L, Jiang W, Pokrouskaja K, Wiman K, Klein G, Ringertz N. Reversible nucleolar translocation of Epstein-Barr virus encoded EBNA-5 and hsp70 proteins after exposure to heat shock or cell density congestion. *J Gen Virol* 1995; 76: 2423-32.
34. Cheung R, Dosch H. The growth transformation of human B cells involves superinduction of HSP72 and hsp90. *Virology* 1993; 193: 700-8.
35. Park KJ, Gaynor RB, Kwak YT. Heat shock protein 27 association with the I kappa B kinase complex regulates tumor necrosis factor alpha-induced NF-kappa B activation. *J Biol Chem*. 2003; 278:
36. Marshall JS. Mast-cell responses to pathogens. *Nat Rev Immunol*. 2004; 4(10):787-99.
37. Chalmers SA, Eidelman AS, Ewer JC, Ricca JM, Serrano A, Tucker KC, Vail CM, Kurt RA. A role for HMGB1, HSP60 and Myd88 in growth of murine mammary carcinoma in vitro. *Cell Immunol*. 2013; 282(2):136-45.
38. Santamaria-Kisiel L, Rintala-Dempsey AC, Shaw GS. Calcium-dependent and -independent interactions of the S100 protein family. *Biochem J*. 2006;396(2):201-14.

39. Edwards NL. Crystal deposition diseases. In: Goldman L, Schafer AI, eds. Cecil Medicine. 25th edicion. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders;2016.
40. Cunha BA, Hage JE, Nouri Y. Recurrent fever of unknown origin (FUO): aseptic meningitis, hepatosplenomegaly, pericarditis and a double quotidian fever due to juvenile rheumatoid arthritis (JRA). Heart Lung. 2012;41(2):177-80.
41. HICK RW, Gruver AL, Ventevogel MS, Haynes BF, Sempowski GD. Leptin selectively augments thymopoiesis in leptin deficiency and lipopolysaccharide-induced thymic atrophy. J Immunol. 2006;177(1):169-76.
42. Tsung A, Sahai T, Tanaka H et al., The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemiareperfusion,” Journal of Experimental Medicine, 2005;201(7):1135–1143, 2005.
43. Y. J. Oh, J. H. Youn, Y. Ji et al., “HMGB1 is phosphorylated by classical protein kinase C and is secreted by a calciumdependent mechanism,” Journal of Immunology, 2009; 182(9):5800–5809.
44. Yang H., Lundback P.,. Ottosson L.,. Erlandsson-Harris H.,. Venereau E. Redox modification of cysteine residues regulates the cytokine activity of HMGB1. Molecular Medicine, 2012; 18(3): 250–259.
45. Castiglioni, V. Canti, P. Rovere-Querini, and A. Manfredi, “High-mobility group box 1 (HMGB1) as amaster regulator of innate immunity,” Cell and Tissue Research, 2011; 343(1):189–199.
46. Pedra JHF, Cassel SL, y Sutterwala FS. Sensing pathogens danger signals by the inflammasome. Curr Opin Immunol. 2009; 21:1-7.

47. Jounai N, Kobiyama K, Takeshita F, Ishii KJ. Recognition of damage-associated molecular patterns related to nucleic acids during inflammation and vaccination. *Front Cell Infect Microbiol.* 2013;2:168.
48. Pétrilli V., Dostert C., Muruve D.A. y Tschopp J. The inflammasome: a danger sensing complex triggering innate immunity. *Curr Opin Immunol.* 2007; 19:615-622.
49. Franchi L, Chen G, Marina-Garcia N, Abe A, Qu Y, Bao S, Shayman JA, Turk J, Dubyak GR, Núñez G. Calcium-independent phospholipase A2 beta is dispensable in inflammasome activation and its inhibition by bromoenol lactone. *J Innate Immun.* 2009;1(6):607-17.
50. Chamaillard M, Girardin SE, Viala J, Philpott DJ. Nods, Nalps and Naip: intracellular regulators of bacterial-induced inflammation. *Cell Microbiol.* 2003 Sep;5(9):581-92.
51. McIntire CR1, Yeretssian G, Saleh M. Inflammasomes in infection and inflammation Apoptosis. 2009 ;14(4):522-35.
52. Kummer J.A, Broekhuizen R. , Everett H. , Agostini L, Kuijk L., Matinon F. , van Bruggen R. and Tschopp Jürg. Inflammasome Components NALP 1 y 3 Show Distinct but Separate Expression Profiles in Human Tissues Suggesting a Site-specific Role in the Inflammatory Response. *J. Histochem. Cytochem.* 2007; 55:443-452.
53. Stehlik C. and Dorfleutner A. COPs and POPs: Modulators of Inflammasome Activity. *Inmunology.* 2007; 179(12):7993-7998.
54. Lamkanfi M y Dixit V. The inflammasomes. *PloS Pathog.* 2009 ;5(12)

55. Bryant C y Fitzgerad K. Molecular mechanisms involved in inflammasome activation. *Trends in Cell Biol.* 2009; 19:9.
56. Zanotti S, Kumar A, Kumar A. Cytokine modulation in sepsis and septic shock. *Expert Opin Investig Drugs.* 2002;11:1-15.
57. Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis family factor ligand and receptor families. *N Engl J Med.* 1996;334:1717-20.
58. Girardin E, Grau G, Dayer J, Roux-Lombard P, Lambert P. Tumor necrosis factor and IL-1 in the serum of children with severe infection purpura. *N Engl J Med.* 1988;319:397-400.
59. Baud L, Cadranel J, Obbenstadt, Luquel L, Guidet B, Amstutz P. Tumor necrosis factor and septic shock. *Crit Care Med.* 1990;18:349-50.
60. Hu Q, Wood CR, Cimen S, Venkatachalam B, Alwaysn IP. Mitochondrial Damage-Associated Molecular Patterns (MTDs) Are Released during Hepatic Ischemia Reperfusion and Induce Inflammatory Responses. *PLOS one.* 2015; 10(10):e0140105.
61. Last-Barney K, Homan CA, Faanes RB. Synergistic and overlapping activities of tumor necrosis factor-alpha and IL-1. *J Immunol.* 1988; 141:527-30.
62. Waage A, Brandtzaeg P, Halstense A. The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. Association between interleukin-6, Interleukin 1 and fatal outcome. *J Exp Med.* 1989; 189:333-8.

63. Newman KC, Riley EM. Whatever turns you on: accessory-cell-dependent activation of NK cells by pathogens. Nat Rev Immunol 2007; 7(4):279-91.
64. Moore DF, Rosenfeld MR, Gribbon PM, Winlove CP, Tsai CM. Alpha -1 acid glycoprotein (orosomicoid): interaction with bacterial lipopolysaccharide and protection from sepsis. *Inflammation*. 1997;21:69-82.
65. Barton BE, Jackson JV. Protective role of interleukin-6 in the lipopolysaccharide-galactosamine septic shock model. *Infect Immunol*. 1993;61:1496-99.
66. Silva M. When two is better than one: macrophages and neutrophils work in concert in innate immunity as complementary and cooperative partners of a myeloid phagocyte system. *Journal of Leukocyte Biology*. 2010; 87:93-102.
67. Soehnlein O., Lindbom L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nature Review Immunology*. 2010;10(6):427-39.
68. Henry CM, Sullivan GP, Clancy DM, Afonina IS, Kulms D, Martin SJ. Neutrophil-Derived Proteases Escalate Inflammation through Activation of IL-36 Family Cytokines. *Cell Rep*. 2016 2;14(4):708-22.
69. Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol* (2012) 198(5):773–83.
70. Mahajan A, Herrmann M, Muñoz LE. Clearance Deficiency and Cell Death Pathways: A Model for the Pathogenesis of SLE. *Front Immunol*. 2016(8);7:35.

71. Barrera L, Montes-Servin E, Barrera A, Ramirez-Tirado LA, Salinas-Parra F, Banales-Mendez JL, et al. Cytokine profile determined by data-mining analysis set into clusters of non-small-cell lung cancer patients according to prognosis. *Ann Oncol* 2015;26(2):428-35.
72. Mojtahedi Z, Khademi B, Erfani N, Taregh Y, Rafati Z, Malekzadeh M, et al. Serum levels of interleukin-7 and interleukin-8 in head and neck squamous cell carcinoma. *Indian J Cancer* 2014;51(3):227-30.
73. Sato T, Terai M, Tamura Y, Alexeev V, Mastrangelo MJ, Selvan SR. Interleukin 10 in the tumor microenvironment: a target for anticancer immunotherapy. *Immunol Res* 2011;51(2-3):170-82.
74. Castellheim A, Brekke OL, Espevik T, Harboe M, Mollnes TE. Innate immune responses to danger signals in systemic inflammatory response syndrome and sepsis. *Scand J Immunol* 2009;69(6):479-91.
75. Dinarello CA. Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. *Int Rev Immunol* 1998;16(5-6):457-99.
76. Horacek JM, Kupsa T, Vasatova M, Jebavy L, Zak P. Evaluation of serum levels of multiple cytokines and adhesion molecules in patients with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia using biochip array technology. *Exp Oncol* 2013;35(3):229-30.
77. Zhao C, Chen A, Jamieson CH, Fereshteh M, Abrahamsson A, Blum J, et al. Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia. *Nature* 2009;458(7239):776-9.

78. Su YC, Li SC, Wu YC, Wang LM, Chao KS, Liao HF. Resveratrol downregulates interleukin-6-stimulated sonic hedgehog signaling in human acute myeloid leukemia. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013;2013:547430.
79. Abrahamsson J, Pahlman M, Mellander L. Interleukin 6, but not tumour necrosis factor-alpha, is a good predictor of severe infection in febrile neutropenic and non-neutropenic children with malignancy. *Acta Paediatr.* 1997;86(10):1059-64.
80. Diepold M, Noellke P, Duffner U, Kontny U, Berner R. Performance of Interleukin-6 and Interleukin-8 serum levels in pediatric oncology patients with neutropenia and fever for the assessment of low-risk. *BMC Infect Dis* 2008;8:28.
81. Wu W, Jia Y, Du S, Tang H, Sun Y, Sun L. Changes of sulfur dioxide, nuclear factor-kappaB, and interleukin-8 levels in pediatric acute lymphoblastic leukemia with bacterial inflammation. *Chin Med J (Engl)* 2014;127(23):4110-3.
82. Civini S, Jin P, Ren J, Sabatino M, Castiello L, Jin J, et al. Leukemia cells induce changes in human bone marrow stromal cells. *J Transl Med* 2013;11:298.
83. Eisenkraft A, Keidan I, Bielorai B, Keller N, Toren A, Paret G. MCP-1 in the cerebrospinal fluid of children with acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 2006;30(10):1259-61.
84. Bertolizio G, Stucchi R, Sahillioglu E, Somaini M, Dander E, Biondi A, et al. The effects of propofol and ketamine on the cytokine levels of

children with acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 2013;35(7):e296-e300.

85. Du S, Jia Y, Tang H, Sun Y, Wu W, Sun L, et al. Immune regulation of hydrogen sulfide in children with acute lymphoblastic leukemia. *Chin Med J (Engl)* 2014;127(21):3695-9.
86. Hatzistilianou M, Rekliti A, Athanassiadou F, Catriu D. Procalcitonin as an early marker of bacterial infection in neutropenic febrile children with acute lymphoblastic leukemia. *Inflamm Res* 2010;59(5):339-47.
87. Matti BF, Saleem MA, Sabir SF. Assessment of interleukin 1beta serum level in different responder groups and stages of chronic myeloid leukemia patients on imatinb mesylate therapy. *Indian J Hematol Blood Transfus* 2014;30(4):247-52.
88. Wang S, Sun M, Gu C, Wang X, Chen D, Zhao E, et al. Expression of CD163, interleukin-10, and interferon-gamma in oral squamous cell carcinoma: mutual relationships and prognostic implications. *Eur J Oral Sci* 2014;122(3):202-9.
89. Chow MT, Moller A, Smyth MJ. Inflammation and immune surveillance in cancer. *Semin Cancer Biol.* 2012;22:23–32.
90. Lo WJ, Chang WS, Hsu HF, Ji HX, Hsiao CL, Tsai CW, Yeh SP, Chen CM, Bau DT. Significant Association of Interleukin-10 Polymorphisms with Childhood Leukemia Susceptibility in Taiwan. *In Vivo.* 2016 05-06;30(3):265-269.

91. Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, Harrington LE. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol.* 2007;25:821-52.
92. Weaver CT. Th17: The ascent of a new effector T-cell subset. Preface. *Eur J Immunol.* 2009;39(3):634-6.
93. Kolls JK, Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity.* 2004;21(4):467-76.
94. Han Y, Ye A, Bi L, Wu J, Yu K, Zhang S. Th17 cells and interleukin-17 increase with poor prognosis in patients with acute myeloid leukemia. *Cancer Sci* 2014;105(8):933-42.
95. Leberman DA, Edmiston JS. The role of TGF-beta in growth, differentiation, and maturation of B lymphocytes. *Microbes Infect.* 1999;1(15):1297-304.
96. Yang L, Pang Y, Moses HL. TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol.* 2010;31(6):220-7.
97. Pardali K, Moustakas A. Actions of TGF-beta as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1775(1):21-62.
98. Zitvogel L, Kroemer G. CD103+ dendritic cells producing interleukin-12 in anticancer immunosurveillance. *Cancer Cell.* 2014;26(5):591-3.
99. Pegram HJ, Purdon TJ, van Leeuwen DG, Curran KJ, Giralt SA, Barker JN, et al. IL-12-secreting CD19-targeted cord blood-derived T cells for

the immunotherapy of B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2015;29(2):415-22.

100. Hirsiger R, Simmen HP, Werner CM, Wanner GA, Rittirsch D. Danger signals activating the immune response after trauma. *Mediators Inflamm* 2012;2012:315941.
101. Oppenheim JJ, y D. Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Curr Opin Immunol*. 2005.2005;17(4):359-65.
102. Tesarova P, Kalousova M, Zima T, Tesar V. HMGB1, S100 proteins and other RAGE ligands in cancer - markers, mediators and putative therapeutic targets. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2016.
103. Bianchi ME. HMGB1 loves company. *J Leukoc Biol*. 2009;86(3):573–576.
104. Calderwood SK, Khaleque MA, Sawyer DB, Ciocca DR: Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends Biochem Sci* 2006, 31:164–172.
105. Vidyasagar A, Wilson NA, Djamali A. Heat shock protein 27 (HSP27): biomarker of disease and therapeutic target. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2012;5(1):7.
106. Yan S, Zhang P, Xu W, Liu Y, Wang B, Jiang T, Hua C, Wang X, Xu D, Sun B. Serum Uric Acid Increases Risk of Cancer Incidence and Mortality: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Mediators Inflamm*. 2015;2015: 764250.
107. Dong XW, Tian HY, He J, Wang C, Qiu R, Chen YM. Elevated Serum Uric Acid Is Associated with Greater Bone Mineral Density and

- Skeletal Muscle Mass in Middle-Aged and Older Adults. *PLoS One*. 2016;11(5):e0154692.
108. Bresnick AR, Weber DJ, Zimmer DB. S100 proteins in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2015;15(2): 96–109.
109. Seigneuric R, Mjahed H, Gobbo J, Joly AL, Berthenet K, Shirley S, Garrido C. Heat shock proteins as danger signals for cancer detection. *Front Oncol*. 2011 10;1:37.
110. Lehmann D, Spanholtz J, Osl M, Tordoir M, Lipnik K, Bilban M, et al. Ex vivo generated natural killer cells acquire typical natural killer receptors and display a cytotoxic gene expression profile similar to peripheral blood natural killer cells. *Stem Cells Dev* 2012; 21(16):2926–38.
111. Sims GP, Rowe DC, Rietdijk ST, Herbst R, Coyle AJ. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annu Rev Immunol* 2010;28: 367–88.
112. Andersson U, Tracey KJ. HMGB1 is a therapeutic target for sterile inflammation and infection. *Annu Rev Immunol* 2011;29:139–62.
113. Lotze MT, Tracey KJ. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol* 2005;5:331–42.
114. Tang D, Kang R, Coyne CB, Zeh HJ, Lotze MT. PAMPs and DAMPs: signals that spur autophagy and immunity. *Immunol Rev* 2012;249:158–75.
115. Allen IC, TeKippe EM, Woodford RM, Uronis JM, Holl EK, Rogers AB, Herfarth HH, Jobin C, Ting JP. The NLRP3 inflammasome functions as

a negative regulator of tumorigenesis during colitis-associated cancer. *J Exp Med* 10;207(5):1045-56.

116. Hu B, Elinav E, Flavell RA. Inflammasome-mediated suppression of inflammation-induced colorectal cancer progression is mediated by direct regulation of epithelial cell proliferation. *Cell Cycle*. 2011;10(12):1936-9.
117. Sagulenko V, Thygesen SJ, Sester DP, Idris A, Cridland JA, Vajjhala PR, Roberts TL, Schroder K, Vince JE, Hill JM, Silke J, Stacey KJ. AIM and NLRP3 inflammasomes activate both apoptotic and pyroptotic death pathways via ASC. *Cell Death Differ*. 2013;20(9):1149-60.
118. Davidovich P, Kearney CJ, Martin SJ. Inflammatory outcomes of apoptosis, necrosis and necroptosis. *Biol Chem*. 2004; 395(10):1163-71.
119. Huebener P, Pradere JP, Hernandez C, Gwak GY, Caviglia JM, Mu X, Loike JD, Jenkins RE, Antoine DJ, Schwabe RF. The HMGB1/RAGE axis triggers neutrophil-mediated injury amplification following necrosis. *J Clin Invest*. 2015; 125(2):539-50.
120. Ghavami S, Kerkhoff C, Chazin WJ, Kadkhoda K, Xiao W, Zuse A, Hashemi M, Eshraghi M, Schulze-Osthoff K, Klonisch T, Los M. S100A8/9 induces cell death via a novel, RAGE-independent pathway that involves selective release of Smac/DIABLO and Omi/HtrA2. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1783:297–311.
121. Ghavami S, Eshraghi M, Ande SR, Chazin WJ, Klonisch T, Halayko AJ, McNeill KD, Hashemi M, Kerkhoff C, Los M. S100A8/A9 induces autophagy and apoptosis via ROS-mediated cross-talk between mitochondria and lysosomes that involves BNIP3. *Cell Res*. 2010;20:314–331.

Strong inflammatory response and Th1-polarization profile in children with acute lymphoblastic leukemia without apparent infection

E. PÉREZ-FIGUEROA¹, M. SÁNCHEZ-CUAXOSPA¹, K.A. MARTÍNEZ-SOTO¹, N. SÁNCHEZ-ZAUCO¹, A. MEDINA-SANSÓN², E. JIMÉNEZ-HERNÁNDEZ^{3,4}, J.R. TORRES-NAVA³, J.M. FÉLIX-CASTRO⁴, A. GÓMEZ⁵, E. ORTEGA⁶ and C. MALDONADO-BERNAL¹

¹Immunology and Proteomics Research Laboratory, Children's Hospital of Mexico Federico Gómez, Mexico, D.F.;

²Department of Hematology-Oncology, Children's Hospital of Mexico Federico Gómez, Mexico, D.F.; ³Oncology Service, Children's Hospital Moctezuma, Mexico, D.F.; ⁴Oncology Service, Highly Specialized Unit, General Hospital National Medical Center La Raza, Mexican Institute of Social Security, Mexico, D.F.; ⁵Research Unit on Infectious Diseases, Pediatric Hospital, National Medical Center XXI Century, Mexican Institute of Social Security, Mexico, D.F.;

⁶Department of Immunology, Institute for Biomedical Research, National Autonomous University of Mexico, Mexico, D.F., Mexico

Received November 6, 2015; Accepted December 17, 2015

DOI: 10.3892/or.2016.4657

Abstract. Children with acute lymphoblastic leukemia (ALL) often present fever. Febrile states are usually associated with infectious processes that generate an inflammatory response involving various molecules, including cytokines. However, an inflammatory response may also occur in the absence of infection. We hypothesized that the levels of inflammatory cytokines are increased in children with ALL without apparent infection. The serum levels of 13 cytokines in 99 patients with ALL and 48 non-oncological patients without apparent infection were measured using multiplex analyte profiling technology (Luminex®). The concentration of circulating pro-inflammatory cytokines associated with fever was similar between patients with ALL and fever at diagnosis and those without fever. The levels of tumor necrosis factor α , interleukin (IL)-6, IL-8, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and

IL-10 were higher in patients with ALL vs. the control group ($P < 0.05$). Moreover, the levels of the T helper 1 (interferon- γ and IL-12) cytokines were higher in patients with ALL vs. the control group. Transforming growth factor β was lower in patients with ALL vs. the control group ($P < 0.05$). The levels of IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-13, and IL-17 were similar in the two groups. Our results indicate that the circulating levels of seven of the important studied cytokines are elevated in patients with newly diagnosed ALL without apparent infection, reflecting a strong and deregulated inflammatory state in this disease, with a Th1-polarization profile.

Introduction

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common pediatric malignancy in childhood (0-14 years), constituting slightly less than one-third of all childhood cancers diagnosed, whereas it constitutes approximately 10% of the cancers diagnosed among adolescents and young adults (15-19 years) (1).

Cytokines, which were originally identified as products of immune cells, are small secreted proteins that have specific effects on the interactions and communication between cells. Cytokines are important mediators of immune responses that are secreted in response to different infectious and noninfectious stimuli. Different cytokines are able to stimulate or inhibit cell growth, regulate cell differentiation, induce cell chemotaxis, and modulate the expression of other cytokines. The balance among different cytokines is very important for the maintenance of the processes regulated by them, as they have been shown to participate in both the initiation and progression of several pathological processes, such as chronic inflammation and cancer (2).

Inflammation as a result of trauma, ischemia-reperfusion injury, or chemically induced injury typically occurs in the

Correspondence to: Dr Carmen Maldonado-Bernal, Immunology and Proteomics Research Laboratory, Children's Hospital of Mexico Federico Gómez, Dr. Márquez 162, Colonia Doctores, C.P. 06720, Mexico, D.F., Mexico
E-mail: cmaldobe@yahoo.com

Abbreviations: ALL, acute lymphoblastic leukemia; TNF- α , tumor necrosis factor α ; IFN- γ , interferon- γ ; IL-1, interleukin-1; TGF- β , transforming growth factor β ; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; Th, T helper

Key words: acute lymphoblastic leukemia, pro-inflammatory cytokines, Th1 immune response, sterile inflammation, circulating cytokines, immunoregulation

absence of microorganisms and has, therefore, been termed 'sterile inflammation'. Sterile inflammation occurs in acute conditions and is similar to microbial-induced inflammation in that it is marked by the recruitment of neutrophils and macrophages and the production of pro-inflammatory cytokines and chemokines, such as tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 (IL-1) (3). The triggers of sterile inflammation are still under investigation, and the pathways that transduce sterile inflammatory signals have not been completely clarified. Currently, most of the innate immune pathways that are activated during infection have been implicated in sterile inflammation, although distinct signaling pathways of sterile inflammation exist (3,4). Whether immune pathology ensues after acute sterile inflammation, depends on the balance between pro-inflammatory and resolution pathways.

It is now evident that pattern recognition receptors (PRRs) also recognize non-infectious material that can cause tissue damage, as well as endogenous molecules that are released after tissue injury or cell death. These endogenous molecules have been termed damage-associated molecular patterns (DAMPs). DAMPs have similar effects to pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) in terms of their ability to activate inflammatory pathways (5).

In clinical practice, most patients with newly diagnosed ALL present febrile episodes, which are usually assumed to be associated with an infectious process. However, in 80% of cases, no infection can be demonstrated (6,7). The levels of circulating cytokines have been studied in patients with ALL presenting fever and neutropenia in the presence of overt infection (8,9); however, to date, no studies of patients with ALL and fever without apparent infection have been published. It is important to characterize the inflammatory profile in patients with ALL presenting febrile episodes without clinically apparent infection, as this may influence the medical management of these patients. The aim of this study was to assess whether the levels of inflammatory cytokines are increased in patients with ALL without apparent infection.

Materials and methods

Study population. The study was conducted at the Hospital Infantil de México Federico Gómez and at the Hospital Pediátrico Moctezuma in Mexico City, and was approved by the ethics committees of both institutions. Signed informed consent was obtained from all parents, and assent was obtained from all children older than 9 years of age. The study included 99 children with ALL (newly diagnosed) from the Department of Oncology of the two hospitals, and 48 non-oncological patients (controls) who visited the Department of Orthopedics and Ophthalmology of the Hospital Infantil de México Federico Gómez for consultation and/or preoperative analysis. We confirmed that patients with ALL included in this study had no apparent clinical infection at diagnosis, the point at which the blood sample used in this study was taken. We conducted a detailed review of the clinical records to confirm that the specimens of patients with ALL were negative for all microbiological tests of blood, urine, and spinal fluid (LCR) by culture and/or PCR. The exclusion criteria were: presence of any evident infection at diagnosis, anti-inflammatory or

antimicrobial treatment, cancer-specific therapies, primary or secondary immunodeficiencies, or recent blood-component transfusion.

Sample collection. Peripheral blood was collected in a Vacutainer tube (BD Vacutainer[®]) without anticoagulant. After clotting, the tubes were centrifuged at 1,000 x g for 10 min at 4°C. Serum samples were stored at -80°C until analysis.

Determination of important cytokine and chemokine levels in the serum. Cytokines and chemokines (IL-1 β , TNF- α , IL-6, MCP-1, IL-8, IL-10, IFN- γ , IL-12p70, IL-2, IL-4, IL-13 and IL-17) were quantified in the sera of patients and controls using the multiplex analyte profiling (xMAP) technology with the Millipore HSCYTOMAG-60K kit (Luminex[®], magnetic beads; Millipore, Billerica, MA, USA), and were read on a MAGPIX apparatus (Milliplex[®]; Millipore). All reagents were provided in the kit and prepared according to the manufacturer's protocol. Each sample was analyzed in duplicate, and the mean concentration of each analyte was calculated using a parameter logistic fitted curve generated from the standards.

TGF- β was determined in serum samples from 88 patients with ALL and 48 controls using an ELISA set (BD OptEIA[™]; BD Biosciences) according to the manufacturer's protocol.

Statistical analyses. Values are plotted as the median with range. Comparisons between groups were performed by comparing medians using the Mann-Whitney U test. All statistical analyses were performed using the SPSS program V22, and $P < 0.05$ was considered to indicate a statistically significant result.

Results

Clinical characteristics. The characteristics of the patients with ALL and the non-oncological patients included in the study are described in Table I. The ALL group included both *de novo* precursor B-lineage and T-lineage leukemia cases. Among the patients with ALL, 34% (34 patients) had fever at admission, 50% of whom (17 out of 34 patients) had neutropenia. The characteristics of the patients with ALL and fever and patients with ALL without fever are described in Table II.

After admission to the hospital, patients with ALL with fever included in the study were treated with antimicrobial and antipyretic drugs. No patient presented a positive microbial culture during the following week and patients with ALL survived for at least one week after admission.

The concentration of circulating pro-inflammatory cytokines associated with fever is similar between patients with ALL and fever at diagnosis and those without fever. We analyzed the levels of circulating pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, and TNF- α). The concentrations of IL-1 β , IL-6, and TNF- α were not statistically different between the two groups of patients (with and without fever) ($P > 0.05$).

We found no significant differences in the levels of cytokines associated with fever (IL-1 β , TNF- α , and IL-6) in the sera of patients with ALL with and without fever at admission (Fig. 1).

Table I. Demographic characteristics of the study population.

	ALL patients	Non-oncological patients
No. of subjects	99	48
Gender (F/M)	40/59	23/25
Age, mean (range) in years	7.5 (0.25-17)	9.1 (5-17)
Diagnosis	ALL	Ophthalmologic, orthopedic
Immunological classification		
Lineage B	64	
Lineage T	14	
Biphenotypic	3	
Not classifiable	18	
With fever	34	

ALL, acute lymphoblastic leukemia.

Table II. Characteristics of the patients with ALL with fever or without fever.

Patients	Age (years)	Gender (F/M)	Leukocytosis ($10^3/\mu\text{l}$)	Neutrophils (total)
Fever (n=34)	6.5±0.69	(14/20)	147.9±59.5	3,593±202.0
No fever (n=62)	8.2±0.62	(25/37)	62.3±13.8	1,801±577.5
P-value		0.085	0.076	0.289

ALL, acute lymphoblastic leukemia.

Patients with ALL show a pro-inflammatory state at diagnosis.

We analyzed the levels of circulating pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, and TNF- α) associated with the production of fever; the concentrations of IL-6 and TNF- α were higher in the group of patients with ALL than they were in the control group ($P<0.05$). Although the concentration of IL-1 β was not statistically different between the two groups, it was observed that the median concentration was higher in the ALL group than that in the control group (3.2 vs. 3.2 pg/ml) (Fig. 2A). The median TNF- α concentration in the control group was 13.60 pg/ml (range, 40-211.6 pg/ml), whereas the median concentration in the ALL group was 65.40 pg/ml (range, 1.24-496 pg/ml) (Fig. 2B). The IL-6 concentration was 3.20 pg/ml (range, 0.00-87.85 pg/ml) in the control group and 8.79 pg/ml (range, 0.00-615 pg/ml) in the ALL group (Fig. 2C). These results suggest the presence of an important pro-inflammatory profile in patients with ALL at diagnosis in the absence of clinically apparent infection.

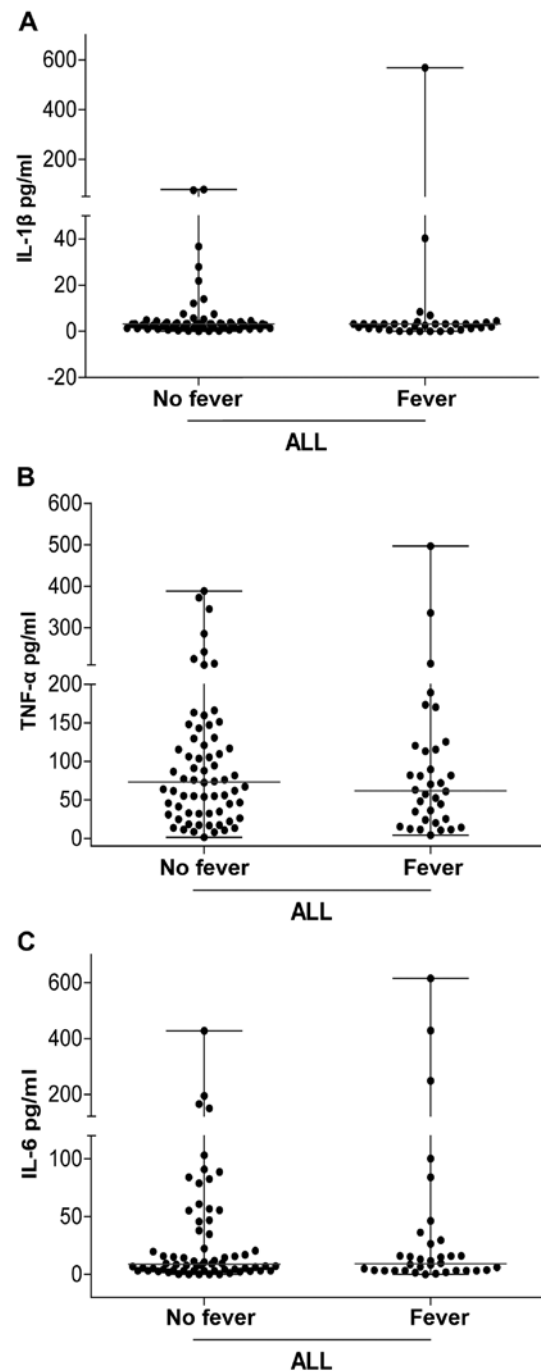


Figure 1. The levels of circulating pro-inflammatory cytokines in patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL) were similar in the presence and absence of fever. The serum levels of (A) interleukin (IL)-1 β , (B) tumor necrosis factor (TNF)- α , and (C) IL-6 in patients with ALL and fever and without fever were measured by xMAP. The values are plotted as the median with range. Comparisons between groups were performed using the Mann-Whitney U test. $P<0.05$ is considered to indicate a statistically significant result.

The concentration of circulating pro-inflammatory chemokines is elevated in patients with ALL at diagnosis. The pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α induce the production of two important inflammatory chemokines that participate in carcinogenesis, MCP-1 and IL-8. As we found elevated levels of TNF- α in children with ALL, we were interested in determining the levels of these chemokines in these

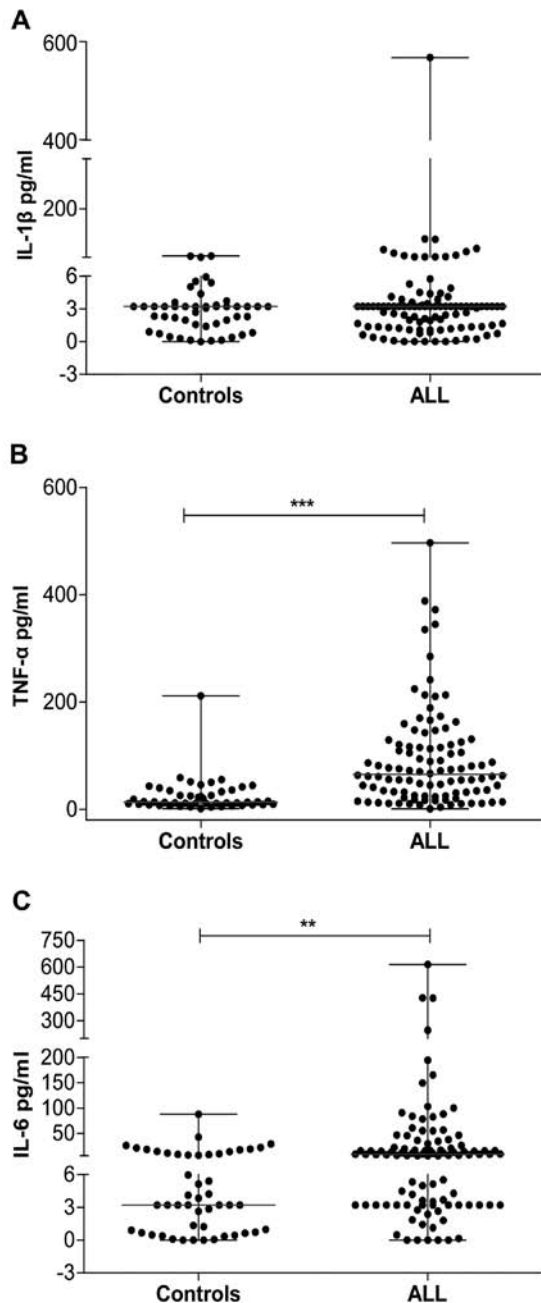


Figure 2. The levels of pro-inflammatory cytokines are increased in patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL). The serum levels of (A) interleukin (IL)-1 β , (B) tumor necrosis factor (TNF)- α , and (C) IL-6 in patients with ALL were measured by xMAP. The values are plotted as the median with range. Comparisons between groups were performed using the Mann-Whitney U test. *** $P < 0.0001$, and ** $P < 0.0006$ are considered to indicate a statistically significant result.

patients. We found that IL-8 levels were significantly higher in the ALL group (median, 78.75 pg/ml; range, 4.80-24,937 pg/ml) than they were in the control group (median, 13.03 pg/ml; range, 2.99-522 pg/ml) (Fig. 3A). The concentration of MCP-1 was also higher in the ALL group (median, 1,090 pg/ml; range, 4.28-4,382 pg/ml) compared with the control group (median, 381 pg/ml; range, 2.99-2,001 pg/ml) (Fig. 3B).

T-cell-polarizing cytokines in patients with ALL at diagnosis.
We also analyzed the levels of T-cell-polarizing cytokines in

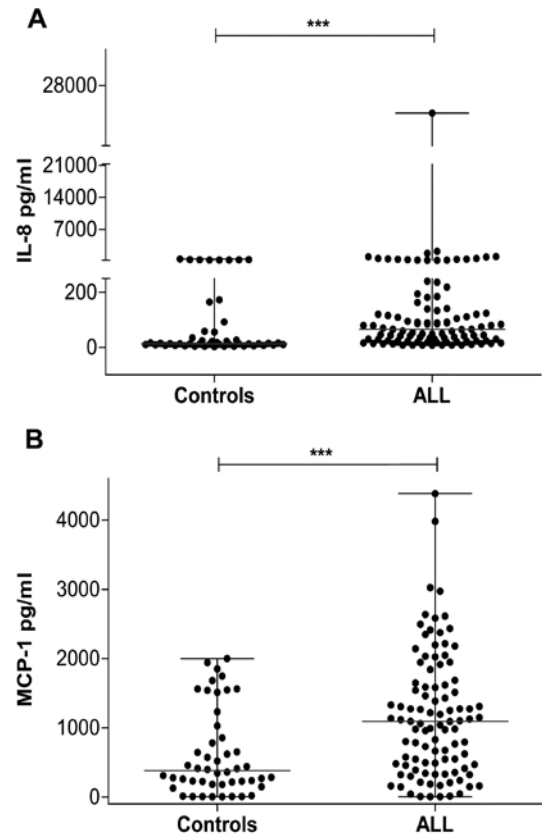


Figure 3. The levels of chemokines are increased in patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL). The serum levels of (A) interleukin (IL)-8 and (B) monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in the control group and in patients with ALL were measured by xMAP. The values are plotted as the median with interquartile range. Comparisons between groups were performed using the Mann-Whitney U test. MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1. *** $P < 0.0001$ is considered to indicate a statistically significant result.

patients with ALL without clinically apparent infection. We analyzed Th1 cytokines such as IFN- γ , IL-12 and IL-2 (Fig. 4). The circulating levels of IFN- γ and IL-12 were significantly higher in patients with ALL than they were in the control group (IFN- γ in ALL: median, 6.50 pg/ml; range, 0.0-456.60 pg/ml; IFN- γ in controls: median, 3.34 pg/ml; range, 0.38-45.90 pg/ml; IL-12 in ALL: median, 3.20 pg/ml; range, 0.0-175.0 pg/ml; IL-12 in controls: median, 2.63 pg/ml; range, 0.0-70.56 pg/ml) (Fig. 4A and B). The levels of IL-2 in patients with ALL (median, 3.20 pg/ml; range, 0.0-83.11 pg/ml) and in controls (median, 3.05 pg/ml; range, 0.0-13.61 pg/ml) were not significantly different (Fig. 4C).

The levels of Th2 cytokines such as IL-4 and IL-13 were also measured to obtain an idea of the Th1/Th2 cytokine balance in patients with leukemia. The level of IL-4 in patients with ALL was not significantly different from that in the control group. We found that the control and ALL groups had similar circulating levels of this cytokine (Fig. 5A). Conversely, the level of IL-13 was lower in patients with ALL compared with the control group (median, 3.20 vs. 3.20 pg/ml; range of IL-13 in patients with ALL, 0.0-547.10 pg/ml, but only three patient had a level >100 pg/ml; range of IL-13 in the control group, 1.93-110.90 pg/ml) (Fig. 5B). The Th2 response in these patients was decreased, thereby favoring the Th1 response.

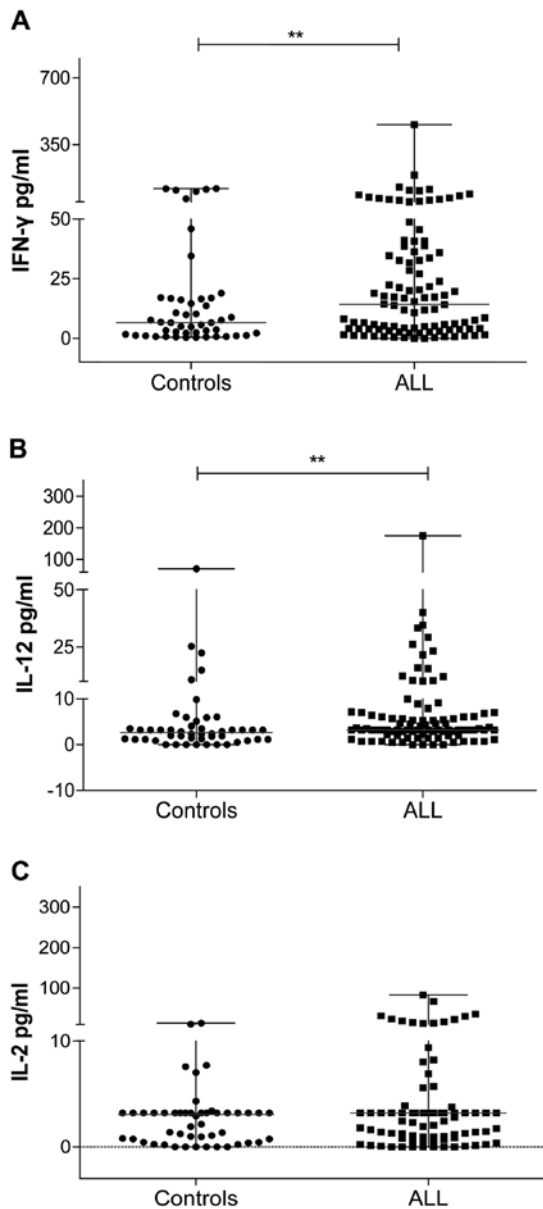


Figure 4. Patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL) had an increased Th1 cytokines. The serum levels of (A) interferon- γ (IFN- γ), (B) interleukin (IL)-12, and (C) IL-2 in the control group and in patients with ALL were measured by xMAP. The values are plotted as the median with interquartile range. Comparisons between groups were performed using the Mann-Whitney U test. ** $P=0.0234$ and * $P=0.0092$ are considered to indicate a statistically significant result.

Together, these results suggest an inclination toward a Th1 profile in ALL, driven by increased Th1 and decreased Th2 cytokines in patients with ALL.

Higher concentration of circulating immunoregulatory cytokines in ALL at diagnosis. The circulating levels of IL-10 were higher in patients with ALL than they were in the control group, with a median of 91.81 vs. 5.15 pg/ml (range, 2.47-3,209 pg/ml for ALL vs. 0.0-73.63 pg/ml for the control group) (Fig. 6A). The IL-17 level was higher in ALL than it was in the control group, with a median of 3.20 pg/ml (range, 0.0-139.20 pg/ml) in ALL, while in the control group the median was also

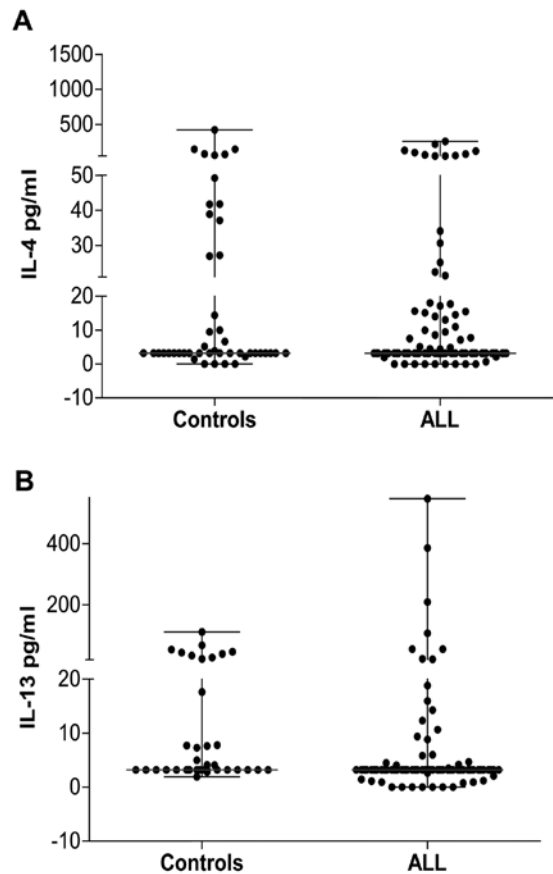


Figure 5. Patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL) have a decreased Th2 response. The serum levels of (A) interleukin (IL)-4 and (B) IL-13 in the control group and in patients with ALL were measured by xMAP. The values are plotted as the median with range. Comparisons between groups were performed using the Mann-Whitney U test. $P>0.05$ is not significant.

3.20 pg/ml but the range was 0.0-75.75 pg/ml (Fig. 6B). However, TGF- β levels were lower in patients with ALL than they were in the control group (median, 1,438 vs. 4,407 pg/ml; range, 0.0-29,507 vs. 0.0-33,777 pg/ml) (Fig. 6C).

The balance of inflammatory, T cell-polarizing and immunoregulatory cytokines produced in patients with ALL without apparent infection was highly altered; a schematic representation of this alteration is shown in Fig. 7.

Discussion

Cytokines are regulators of host responses to infection, inflammation and trauma. Some cytokines promote inflammation (pro-inflammatory cytokines), whereas others serve to reduce inflammation and promote the healing of tissue (anti-inflammatory cytokines). Thus, to maintain tissue homeostasis and integrity, the levels of different cytokines are finely tuned and controlled. The deregulation of cytokines plays an important role in different pathologies, including cancer (10-12).

In this study, we showed that, at the systemic level, there was an important pro-inflammatory condition at diagnosis in children with ALL and no apparent infection, i.e., children for whom evidence of infection could not be obtained. We report for the first time the higher concentrations of TNF- α and IL-6 in patients with ALL with no infection, as elevated levels

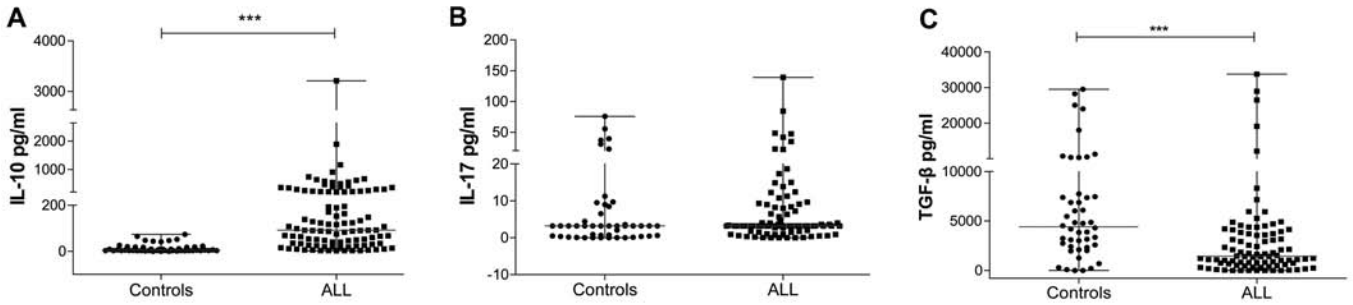


Figure 6. Deregulation of regulatory cytokines in patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL). The serum levels of (A) interleukin (IL)-10, (B) transforming growth factor β (TGF- β), and (C) IL-17 in the control group and in patients with ALL were measured by xMAP or ELISA. The values are plotted as the median with range. Comparisons between groups were performed using the Mann-Whitney U test. *** $P \leq 0.0001$ is considered to indicate a statistically significant result.

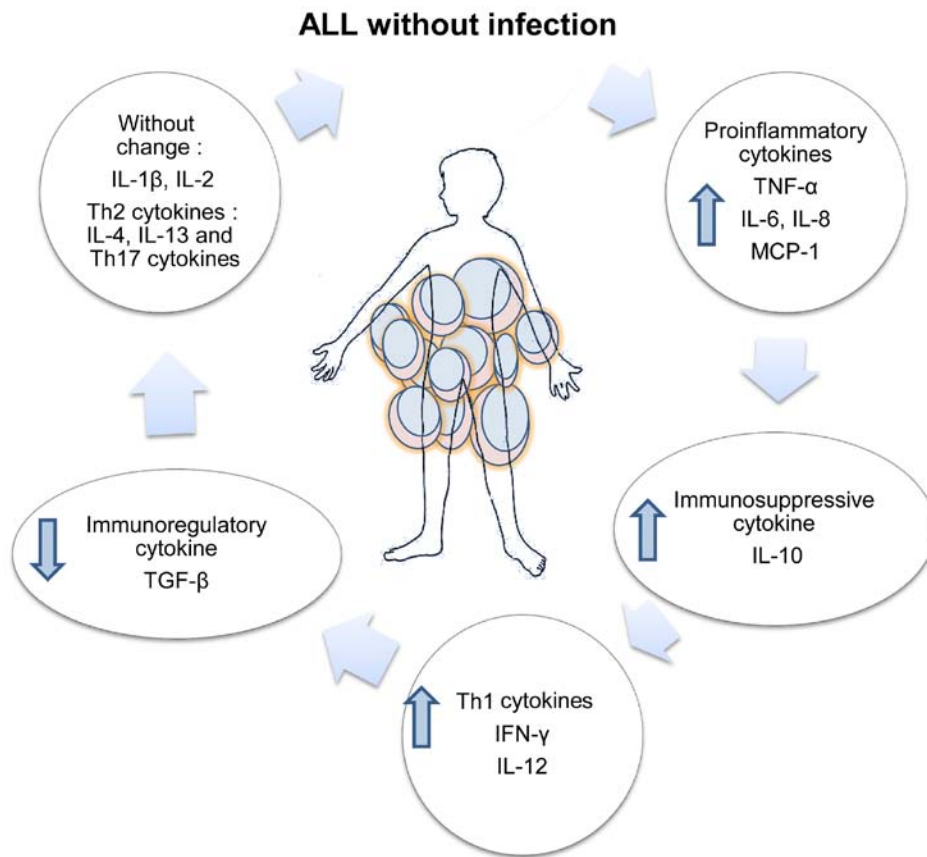


Figure 7. Disrupted cytokine balance in patients with ALL without apparent infection. Schematic representation of the strong inflammatory response, T-cell-polarizing, and altered regulatory cytokines produced in patients with ALL and without apparent infection.

of these cytokines have only been reported in the presence of infectious processes (13,14), but not in sterile conditions. The higher concentrations of TNF- α and IL-6 found in this research in patients with ALL may be associated with the febrile state presented by some of the children, possibly as a consequence of the activation of the immune cells by DAMPs, which have the ability to generate an immune response in the absence of infectious agents (15). Different cellular signaling pathways operate in response to varying levels of pro-inflammatory cytokines, which can lead to genotoxic damage, cell apoptosis, or cell growth. The increased concentration of pro-inflammatory cytokines in the serum of patients with leukemia

may favor a neoplastic process. Moreover, IL-1 β , TNF- α and IL-6 are pro-inflammatory cytokines that can induce fever and can regulate each other's levels, depending on their concentration (16).

Furthermore, we showed that this pro-inflammatory state had characteristics of a Th1-polarized response. We found that the concentrations of circulating TNF- α , IL-6, IL-8, MCP-1, IL-12, IFN- γ and IL-10, were significantly increased in children with ALL. In contrast, the concentrations of TGF- β were decreased in ALL and those of IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-13 and IL-17 showed no changes compared with the controls. This finding is significant since it may reflect a sterile inflammation

in ALL, as all children included in this study did not show apparent infection at diagnosis and had not received any antineoplastic treatment at the time of collection of the blood samples. Recently, the levels of circulating cytokines were studied in adult patients with ALL, and IL-8 and MCP-1 were found to be elevated at diagnosis, thus reflecting disease activity (17).

The results of our study suggest that the increases in IL-6 and IL-8 in the absence of apparent infection are induced by the activation of other molecules or mechanisms that are independent of infectious microorganisms. IL-6 is important in the maintenance of cancer stem cells in the neoplastic microenvironment of leukemic cells (18) and has been shown to stimulate the growth of AML (acute myeloid leukemia) cells through signaling pathways (19).

Moreover, IL-6 has been reported as a sensitive predictor of bacterial infection in neutropenic as well as non-neutropenic febrile children with ALL (20); in addition, a study of the role of IL-6 and IL-8 in a small group of patients with hematological malignancies showed that they could be useful in excluding the possibility of high-risk infection (21). IL-8 in the serum of patients with ALL in association with Gram-negative infection was found to be increased by 10-fold compared with the control group (22).

In the present study, we found that high levels of the monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2), which is a member of the CC chemokine family, was significantly altered in these patients and may contribute to a sterile inflammatory environment. MCP-1 has previously been shown to play a major role in the migration of monocytes toward human leukemic cells; however, it was unable to increase the cytotoxic effects of monocytes on human leukemic cells (23). A higher level of MCP-1 in the cerebrospinal fluid of children with ALL is associated with central nervous system involvement during therapy (24).

There are reports of a high concentration of various inflammatory cytokines in ALL associated with the presence of infection or in response to chemotherapy (25-28). However, there are no reports of an initial inflammatory process in newly diagnosed patients with ALL without apparent infection.

The regulation of the immune response is important in the process of carcinogenesis, as a deregulated pro-inflammatory state may favor cancer, and inflammation also affects immune surveillance. Cytokines such as IL-10, IL-17 and TGF- β have an important function in immune regulation. The biological role of IL-10 in cancer is quite complex; however, the presence of IL-10 in advanced metastases and the positive correlation between serum IL-10 levels and the progression of other diseases suggest a critical role for IL-10 in the cancer microenvironment (29).

IL-17 is a cytokine that is produced by a subset of T helper cells, called 'Th17 cells', which are generated in response to signals from TGF- β , IL-6 and IL-23 (30,31). IL-17 activates many of the same signaling events as do inflammatory cytokines such as TNF- α and IL-1 β , and is considered to be an important bridging molecule between the innate and adaptive immune systems (32). A study of the role of this cytokine in leukemia showed that it is increased in the blood and bone marrow in AML patients with poor prognosis compared with healthy donors (33). However, in this study, we did not

find significant difference between patients with ALL and the control group. The role of IL-12 in immunosurveillance has been reported in cancer (34); in ALL, the study of this cytokine has been focused on immunotherapy (35,36). Our results indicate that IL-12 and IFN- γ were elevated in patients with ALL compared with the control group; thus, there was a Th1-biased immune response in patients with this neoplasia.

Elevated systemic concentrations of these Th1 cytokines may promote an inflammatory microenvironment in the early stages of neoplasia. Alterations in the Th1/Th2 ratio in cancer patients is a common feature of a malignant process and may be the result of a malfunction of Th1 cells, activation of Th2 lymphocytes, or both. We found no change in concentrations of IL-4 and IL-13 (Th2 cytokines) in patients with ALL vs. the controls, which confirmed a predominantly Th1-type response in the patients.

However, in patients with neutropenic fever, therapy is and should remain restricted to antibiotics, even though it is very likely that at least some of these patients do not have an infectious process that causes fever, and that the inflammatory-state-related cancer is the cause of the fever, which opens the possibility of seeking a non-infectious marker that induces cytokines associated with fever and with a strong pro-inflammatory response in children with ALL. Further investigation is needed to establish whether these alterations can be used as a prognostic indicator in ALL.

The findings of this study have important implications for understanding the inflammatory response in patients with ALL and no clinically apparent infection, and the bridge between the innate and adaptive immune responses through T-cell polarization. Higher levels of cytokines may play a crucial role in the pathogenesis of ALL and may be important therapeutic targets and prognostic predictors in episodes of fever of unknown origin and in strong inflammatory responses without apparent infection.

Acknowledgements

This study was supported by Hospital Infantil de México Federico Gómez, grant HIM/2011/22 and by Terry Fox Foundation, grant HIM/2010/076. Erandi Pérez-Figueroa is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received a fellowship from CONACYT.

References

- Gatta G, Botta L, Rossi S, Aareleid T, Bielska-Lasota M, Clavel J, Dimitrova N, Jakab Z, Kaatsch P, Lacour B, *et al*: EUROCORE Working Group: Childhood cancer survival in Europe 1999-2007: Results of EUROCORE-5 - a population-based study. *Lancet Oncol* 15: 35-47, 2014.
- Landskron G, De la Fuente M, Thuwajit P, Thuwajit C and Hermoso MA: Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *J Immunol Res* 2014: 149185, 2014.
- Chen GY and Nuñez G: Sterile inflammation: Sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol* 10: 826-837, 2010.
- Yang Q, Shi Y, Yang Y, Lou G and Chen Z: The sterile inflammation in the exacerbation of HBV-associated liver injury. *Mediators Inflamm* 2015: 508681, 2015.
- Demaria S, Pikarsky E, Karin M, Coussens LM, Chen YC, El-Omar EM, Trinchieri G, Dubinett SM, Mao JT, Szabo E, *et al*: Cancer and inflammation: Promise for biologic therapy. *J Immunother* 33: 335-351, 2010.

6. Agyeman P, Kontny U, Nadal D, Leibundgut K, Niggli F, Simon A, Kronenberg A, Frei R, Escobar H, Kühne T, *et al*: A prospective multicenter study of microbiologically defined infections in pediatric cancer patients with fever and neutropenia: Swiss Pediatric Oncology Group 2003 fever and neutropenia study. *Pediatr Infect Dis J* 33: e219-e225, 2014.
7. Khurana M, Lee B and Feusner JH: Fever at diagnosis of pediatric acute lymphoblastic leukemia: Are antibiotics really necessary? *J Pediatr Hematol Oncol* 37: 498-501, 2015.
8. Santolaya ME, Alvarez AM, Becker A, Cofré J, Enríquez N, O'Ryan M, Payá E, Pilorget J, Salgado C, Tordecilla J, *et al*: Prospective, multicenter evaluation of risk factors associated with invasive bacterial infection in children with cancer, neutropenia, and fever. *J Clin Oncol* 19: 3415-3421, 2001.
9. Santolaya ME, Farfán MJ, De La Maza V, Cociña M, Santelices F, Alvarez AM, Avilés CL, Becker A, O'Ryan M, Román P, *et al*: Diagnosis of bacteremia in febrile neutropenic episodes in children with cancer: Microbiologic and molecular approach. *Pediatr Infect Dis J* 30: 957-961, 2011.
10. Barrera L, Montes-Servín E, Barrera A, Ramírez-Tirado LA, Salinas-Parra F, Bañales-Méndez JL, Sandoval-Ríos M and Arrieta O: Cytokine profile determined by data-mining analysis set into clusters of non-small-cell lung cancer patients according to prognosis. *Ann Oncol* 26: 428-435, 2015.
11. Mojtahedi Z, Khademi B, Erfani N, Taregh Y, Rafati Z, Malekzadeh M and Ghaderi A: Serum levels of interleukin-7 and interleukin-8 in head and neck squamous cell carcinoma. *Indian J Cancer* 51: 227-230, 2014.
12. Sato T, Terai M, Tamura Y, Alexeev V, Mastrangelo MJ and Selvan SR: Interleukin 10 in the tumor microenvironment: A target for anticancer immunotherapy. *Immunol Res* 51: 170-182, 2011.
13. Buyukberber N, Buyukberber S, Sevinc A and Camci C: Cytokine concentrations are not predictive of bacteremia in febrile neutropenic patients. *Med Oncol* 26: 55-61, 2009.
14. Fleischhack G, Cipic D, Juettner J, Hasan C and Bode U: Procalcitonin-a sensitive inflammation marker of febrile episodes in neutropenic children with cancer. *Intensive Care Med* 26 (Suppl 2): S202-S211, 2000.
15. Castellheim A, Brekke OL, Espevik T, Harboe M and Mollnes TE: Innate immune responses to danger signals in systemic inflammatory response syndrome and sepsis. *Scand J Immunol* 69: 479-491, 2009.
16. Dinarello CA: Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. *Int Rev Immunol* 16: 457-499, 1998.
17. Horacek JM, Kupsa T, Vasatova M, Jebavy L and Zak P: Evaluation of serum levels of multiple cytokines and adhesion molecules in patients with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia using biochip array technology. *Exp Oncol* 35: 229-230, 2013.
18. Zhao C, Chen A, Jamieson CH, Fereshteh M, Abrahamsson A, Blum J, Kwon HY, Kim J, Chute JP, Rizzieri D, *et al*: Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia. *Nature* 458: 776-779, 2009.
19. Su YC, Li SC, Wu YC, Wang LM, Chao KS and Liao HF: Resveratrol downregulates interleukin-6-stimulated sonic hedgehog signaling in human acute myeloid leukemia. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013: 547430, 2013.
20. Abrahamsson J, Pålman M and Mellander L: Interleukin 6, but not tumour necrosis factor-alpha, is a good predictor of severe infection in febrile neutropenic and non-neutropenic children with malignancy. *Acta Paediatr* 86: 1059-1064, 1997.
21. Diepold M, Noellke P, Duffner U, Kontny U and Berner R: Performance of interleukin-6 and interleukin-8 serum levels in pediatric oncology patients with neutropenia and fever for the assessment of low-risk. *BMC Infect Dis* 8: 28, 2008.
22. Wu W, Jia Y, Du S, Tang H, Sun Y and Sun L: Changes of sulfur dioxide, nuclear factor- κ B, and interleukin-8 levels in pediatric acute lymphoblastic leukemia with bacterial inflammation. *Chin Med J (Engl)* 127: 4110-4113, 2014.
23. Civini S, Jin P, Ren J, Sabatino M, Castiello L, Jin J, Wang H, Zhao Y, Marincola F and Stroncek D: Leukemia cells induce changes in human bone marrow stromal cells. *J Transl Med* 11: 298, 2013.
24. Eisenkraft A, Keidan I, Bielgorai B, Keller N, Toren A and Paret G: MCP-1 in the cerebrospinal fluid of children with acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 30: 1259-1261, 2006.
25. Bertolizio G, Stucchi R, Sahillioglu E, Somaini M, Dander E, Biondi A, Jankovic M, D'Amico G and Ingelmo PM: The effects of propofol and ketamine on the cytokine levels of children with acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 35: e296-e300, 2013.
26. Du S, Jia Y, Tang H, Sun Y, Wu W, Sun L, Du J, Geng B, Tang C and Jin H: Immune regulation of hydrogen sulfide in children with acute lymphoblastic leukemia. *Chin Med J (Engl)* 127: 3695-3699, 2014.
27. Hatzistilianou M, Rekliti A, Athanassiadou F and Catriu D: Procalcitonin as an early marker of bacterial infection in neutropenic febrile children with acute lymphoblastic leukemia. *Inflamm Res* 59: 339-347, 2010.
28. Matti BF, Saleem MA and Sabir SF: Assessment of interleukin 1 β serum level in different responder groups and stages of chronic myeloid leukemia patients on imatinib mesylate therapy. *Indian J Hematol Blood Transfus* 30: 247-252, 2014.
29. Wang S, Sun M, Gu C, Wang X, Chen D, Zhao E, Jiao X and Zheng J: Expression of CD163, interleukin-10, and interferon-gamma in oral squamous cell carcinoma: Mutual relationships and prognostic implications. *Eur J Oral Sci* 122: 202-209, 2014.
30. Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR and Harrington LE: IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol* 25: 821-852, 2007.
31. Weaver CT: Th17: The ascent of a new effector T-cell subset. Preface. *Eur J Immunol* 39: 634-636, 2009.
32. Kolls JK and Lindén A: Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 21: 467-476, 2004.
33. Han Y, Ye A, Bi L, Wu J, Yu K and Zhang S: Th17 cells and interleukin-17 increase with poor prognosis in patients with acute myeloid leukemia. *Cancer Sci* 105: 933-942, 2014.
34. Zitvogel L and Kroemer G: CD103⁺ dendritic cells producing interleukin-12 in anticancer immunosurveillance. *Cancer Cell* 26: 591-593, 2014.
35. Lehmann D, Spanholtz J, Osl M, Tordoir M, Lipnik K, Bilban M, Schlechta B, Dolstra H and Hofer E: Ex vivo generated natural killer cells acquire typical natural killer receptors and display a cytotoxic gene expression profile similar to peripheral blood natural killer cells. *Stem Cells Dev* 21: 2926-2938, 2012.
36. Pegram HJ, Purdon TJ, van Leeuwen DG, Curran KJ, Giralt SA, Barker JN and Brentjens RJ: IL-12-secreting CD19-targeted cord blood-derived T cells for the immunotherapy of B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 29: 415-422, 2015.