



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud

Investigación Clínica Experimental en Salud

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DE GRP78 COMO BLANCO TERAPÉUTICO
EN LA LEUCEMIA AGUDA INFANTIL**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. TANIA ANGELES FLORIANO

TUTOR

DR. RICARDO VALLE RIOS

División de Investigación, Facultad de Medicina UNAM

COMITÉ TUTOR

Dra. Paula Licon Limón, Instituto de Fisiología Celular UNAM

Dra. Silvia Patricia Pérez Vera, Instituto Nacional de Pediatría

Dr. Andrés Eliu Castell Rodríguez, Facultad de Medicina UNAM

Dr. Luis Felipe Montaña Estrada, Facultad de Medicina UNAM

Ciudad de México

Noviembre 2023



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.

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Investigación en inmunología y Proteómica del Hospital Infantil de México Federico Gómez, bajo la dirección del Dr. Ricardo Valle Ríos. Durante el desarrollo del mismo, la autora fue becaria de CONACYT (No. 309157). Este trabajo fue apoyado por el CONACYT: Problemas Nacionales 3385 y FOSSIS 261227, y Fondos Federales: HIM SSA 1372 y HIM SSA 1263.

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS	7
2. RESUMEN	9
3. ABSTRACT.....	10
4. INTRODUCCIÓN.....	11
.....	13
CLASIFICACIÓN DE LA LEUCEMIA AGUDA	13
LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA	14
FACTORES GENÉTICOS EN LA LLA	15
MICROAMBIENTE EN LA LLA	16
DIAGNÓSTICO DE LA LLA	19
PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO (HSPs).....	21
PROTEÍNA 78kDa REGULADA POR GLUCOSA (GRP78).....	22
.....	23
GRP78 Y CÁNCER.....	23
GRP78 EN LA LEUCEMIA	24
LIGANDOS DE sGRP78	25
ISTHMIN 1	26
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	27
6. JUSTIFICACIÓN.....	28
7. HIPÓTESIS	29
8. OBJETIVOS.....	29
OBJETIVO GENERAL	29
OBJETIVOS PARTICULARES.....	29
9. MATERIALES Y MÉTODOS	29
OBTENCIÓN DE MUESTRAS	29
DECLARACIÓN ÉTICA.....	30
LÍNEAS CELULARES	30
AISLAMIENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES.....	31
CITOMETRÍA DE FLUJO MULTIPARAMÉTRICA	31
MICROSCOPIA DE FLUJO	31
ANÁLISIS DE AGRUPACIÓN FLOW SOM Y DE DISTRIBUCIÓN T-SNE.....	32
ENSAYO DE VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS DE PACIENTES LLA-B INFUNDIDAS EN RATONES BALB/C.....	32
ESPECIFICIDAD DE LOS ANTICUERPOS ANTI HUMANO EN RATÓN BALB/C	32
ENSAYO DE XENOTRASPLANTE.....	33
DETERMINACIÓN DE NIVELES DE ISM1 EN PLASMA.....	33
EVALUACIÓN DE APOPTOSIS	33
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	34

10. RESULTADOS	35
UNA ALTA PROPORCIÓN DE CÉLULAS LEUCÉMICAS DE MÉDULA ÓSEA EXPRESAN GRP78 EN LA SUPERFICIE. 35	
LOS INDIVIDUOS CON LLA-B DE ALTO RIESGO PRESENTAN CÉLULAS sGRP78+ CON EXPRESIÓN DE MARCADORES CD34, CD38, CD10 Y CXCR4.....	38
ANÁLISIS DE ALTA DIMENSIÓN DE LA POBLACIÓN sGRP78+ CON LOS MARCADORES CD34, CD38, CD10 Y CXCR4 EN LA MISMA CÉLULA, DE ACUERDO CON EL RIESGO DE LOS PACIENTES LLA-B.....	40
LAS CÉLULAS LEUCÉMICAS CIRCULANTES EXPRESAN sGRP78 Y CXCR4.....	43
.....	44
EVALUACIÓN DE CÉLULAS LEUCÉMICAS sGRP78+ EN UN MODELO DE XENOTRASPLANTE.....	45
.....	46
.....	48
DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE ISTHMIN 1 (ISM1) EN PACIENTES LLA-B	49
EVALUACIÓN APOPTOSIS EN CÉLULAS sGRP78+ MEDIANTE ISM1 RECOMBINANTE (ISM1R).....	50
11. DISCUSIÓN	51
12. CONCLUSIÓN	55
13. PERSPECTIVAS	55
14. LISTA DE FIGURAS	55
FIGURA 1. ESQUEMA DE DIFERENCIACIÓN HEMATOPOYÉTICA.	55
FIGURA 2. ESTRUCTURA PROTEICA DE GRP78.	55
FIGURA 3. GRP78 COMO REGULADOR DE LA VÍA DE RESPUESTA A PROTEÍNAS MAL PLEGADAS (UPR).	56
FIG. 4. FUNCIÓN DE sGRP78 COMO RECEPTOR DE SEÑALIZACIÓN CAPAZA DE MEDIAR PROLIFERACIÓN Y APOPTOSIS CELULAR.....	56
FIG. 5. EXPRESIÓN DE sGRP78 EN CÉLULAS DE MÉDULA ÓSEA DE PACIENTES PEDIÁTRICOS CON LLA-B DE RECIENTE DIAGNÓSTICO Y LÍNEAS CELULARES DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA.	56
FIGURA 6. ANÁLISIS DE LA POBLACIÓN sGRP78+ DE ACUERDO CON EL RIESGO, BLASTOS Y LEUCOCITOS AL DIAGNÓSTICO.	56
FIGURA 7. TINCIÓN MULTIPARAMÉTRICA DE LA COEXPRESIÓN DE CÉLULAS sGRP78+ CON LOS MARCADORES CD34, CD10, CD38, CD19 Y CXCR4.	56
FIGURA 8. EVALUACIÓN DE CÉLULAS sGRP78+ CD34+ DE MO DE PACIENTES DE RA Y RE.....	56
FIGURA 9. GRÁFICA DE LA POBLACIÓN sGRP78+, CD34+, CD38+, CD10+, CD19+, CXCR4+ DE ACUERDO CON EL RIESGO.	56
FIGURA 10. REDUCCIÓN DIMENSIONAL DE LOS DATOS DE CITOMETRÍA DE FLUJO DE PACIENTES CON LLA-B ESTÁNDAR Y DE ALTO RIESGO.....	56
FIGURA 11. CÉLULAS sGRP78+ CXCR4+ PRESENTES EN SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES PEDIÁTRICOS CON LLA-B AL DIAGNÓSTICO.	56
FIGURA 12. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL DE CÉLULAS HUMANAS DE MO DE UN PACIENTE LLA-B INFUNDIDAS VÍA SUBCUTÁNEA EN UN RATÓN BALB/C.	56
FIGURA 13. EVALUACIÓN DE LOS ANTICUERPOS ANTI-HUMANO ANTI-GRP78, CD45, CD34 Y CXCR4 EN CÉLULAS DE MÉDULA ÓSEA DE RATÓN BALB/C.	56
FIGURA 14. LAS ÉLULAS sGRP87+ DE PACIENTES LLA-B RA INFUNDIDAS VÍA SUBCUTÁNEA EN RATONES DESNUDOS BALB/C SON CAPACES DE MIGRAR A MO Y GANGLIOS.....	56
FIGURA 15. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE ISM1 DE INDIVIDUOS LLA-B E INDIVIDUOS SANOS, EN SANGRE PERIFÉRICA.	57

FIGURA 16. EVALUACIÓN DE CÉLULAS SUP-B15 POSITIVAS PARA AENXINA LUEGO DE UN TRATAMIENTO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ISM1 RECOMBINANTE.....57

15. BIBLIOGRAFÍA57

1. ABREVIATURAS

ATF6. Factor de transcripción activador 6 (del inglés activating transcription factor 6).

CAR-T. Células T con receptores quiméricos de antígenos (del inglés T-CAR cells).

CTL. Control

CXCR4. Receptor de quimicocinas CXC tipo 4 (del inglés CXC motif chemokine receptor 4).

GRP78. Proteína Regulada por Glucosa 78-kDa (del inglés 78-kDa glucose-regulated protein).

HSC. Célula troncal hematopoyética (del inglés hematopoietic stem cell).

HSCPs. Células troncales hematopoyéticas y células progenitoras (del inglés hematopoietic stem cells and progenitors).

HSP70. Proteína de choque térmico 70 (del inglés heat shock protein 70).

IL. Interleucina (del inglés interleukin).

IRE1. Enzima 1 que requiere serina/treonina-proteína quinasa/ endoribonucleasa inositol (del inglés inositol-requiring enzyme type 1).

ISM1. Proteína Isthmin 1.

LA. Leucemia aguda.

LLA-B. Leucemia Linfoblástica aguda de células B.

LLC. Leucemia linfocítica crónica.

LMA. Leucemia Mieloide Aguda.

MNC. Células mononucleares (del inglés mononuclear cells).

MO. Médula ósea

PCB. Progenitor de células B

PE. Progenitor eritroide.

PERK. Proteína quinasa del retículo endoplásmico tipo quinasa R (del inglés protein kinase RNA-like ER kinase).

RE. Retículo Endoplásmico

SCF. Factor de células troncales (del inglés stem cell factor).

sGRP78. Proteína Regulada por Glucosa 78 de superficie.

SP. Sangre periférica

TPO. Trombopoyetina.

TSLP. Linfopoyetina derivada del estroma tímico

UPR. Vía de respuesta a proteínas mal plegadas (del inglés unfolded protein response).

2. RESUMEN

Las leucemias agudas (LAs) son un grupo de enfermedades malignas que se caracterizan por la proliferación incontrolada de un determinado tipo de células inmaduras de la hematopoyesis. La leucemia linfoblástica aguda de células B (LLA-B) es el tipo de cáncer más frecuente en la edad pediátrica. Se ha observado que las proteínas de choque térmico 70 se encuentran sobre expresadas en diferentes tipos de leucemias dentro de esta familia la proteína regulada por glucosa de 78 kDa (GRP78) es una chaperona que se localiza en el retículo endoplásmico (RE) facilitando el plegamiento y ensamblaje de las proteínas y que regula la vía de respuesta a las proteínas mal plegadas (UPR), siendo el principal sensor del estrés del RE manteniendo la homeostasis y la supervivencia celular. En tumores sólidos se ha observado la sobreexpresión de GRP78 y su relocalización en la superficie celular (sGRP78) promoviendo la supervivencia de las células tumorales, así como la resistencia a los fármacos. En la superficie, sGRP78 funciona como receptor de proteínas endógenas que, de acuerdo con el sitio de unión, activan vías de apoptosis o supervivencia celular. En el presente trabajo, exploramos la presencia de sGRP78 en las células de LLA-B pediátrica al momento del diagnóstico, así como a la proteína Isthmin1 (ISM1) como posible ligando pro apoptótico de sGRP78 en estas. Observamos la presencia de células sGRP78+ en pacientes con LLA-B y en una proporción altamente significativa en pacientes con características de alto riesgo, tanto en médula ósea como en sangre periférica. Mediante el uso de citometría de flujo y análisis de alta dimensión, encontramos una subpoblación celular distintiva con niveles de expresión altos de sGRP78, CD10, CD19 y CXCR4 en muestras de médula ósea obtenidas de pacientes con leucemia de alto riesgo ausente en el compartimento de pacientes de riesgo estándar. Observamos que las células sGRP78+ CXCR4+ son más frecuentes en sangre periférica de pacientes con riesgo alto. Al analizar la capacidad de diseminación de células leucémicas sGRP78+ en un modelo de xenotrasplante, estas migraron a la médula ósea y los ganglios linfáticos, manteniendo la expresión de GRP78 y CXCR4. Por primera vez, determinamos los niveles de ISM1 tanto en individuos control como en pacientes LLA-B. Sin embargo, no se pudo determinar la capacidad pro apoptótica de ISM1 recombinante (ISM1r) con las concentraciones evaluadas.

3. ABSTRACT

Acute leukemias (ALs) are a group of malignant diseases that are characterized by the uncontrolled proliferation of a certain type of immature cells of hematopoiesis. B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) is the most common type of cancer in children. It has been observed that heat shock proteins 70 are overexpressed in different types of leukemia within this family. The 78 kDa glucose-regulated protein (GRP78) is a chaperone that is located in the endoplasmic reticulum (ER) facilitating folding and assembly of proteins and that regulates the response pathway to misfolded proteins (UPR), being the main sensor of ER stress, maintaining homeostasis and cell survival. In solid tumors, the overexpression of GRP78 and its relocation to the cell surface (sGRP78) have been observed, promoting the survival of tumor cells, as well as drug resistance. On the surface, sGRP78 functions as a receptor for endogenous proteins that, depending on the binding site, activate apoptosis or cell survival pathways. In the present work, we explored the presence of sGRP78 in pediatric B-ALL cells at the time of diagnosis, as well as the Isthmin1 (ISM1) protein as a possible pro-apoptotic ligand of sGRP78 in these. We observed the presence of sGRP78⁺ cells in patients with B-ALL and in a highly significant proportion in patients with high-risk characteristics, both in bone marrow and peripheral blood. Using flow cytometry and high-dimensional analysis, we found a distinctive cell subpopulation with high expression levels of sGRP78, CD10, CD19, and CXCR4 in bone marrow samples obtained from patients with high-risk leukemia absent in the compartment of standard-risk patients. We observed that sGRP78⁺ CXCR4⁺ cells are more frequent in the peripheral blood of high-risk patients. When analyzing the dissemination capacity of sGRP78⁺ leukemic cells in a xenograft model, they migrated to the bone marrow and lymph nodes, maintaining the expression of GRP78 and CXCR4. For the first time, we determined ISM1 levels in both control individuals and B-ALL patients. However, it was not possible to determine the pro-apoptotic capacity of recombinant ISM1 (ISM1r) with the concentrations tested.

4. INTRODUCCIÓN

La hematopoyesis es el proceso por el cual los componentes sanguíneos son continuamente renovados durante el tiempo de vida de un organismo. El sistema hematopoyético consiste en diferentes poblaciones de células altamente especializadas que tienen funciones únicas, como el transporte de oxígeno y la defensa inmune (1). Se estima que un adulto humano puede generar alrededor de $4-5 \times 10^{11}$ células hematopoyéticas por día (2). En mamíferos, las células troncales hematopoyéticas (HSCs) ocupan el nivel jerárquico más alto de la organización hematopoyética, encontrándose primariamente en la médula ósea (MO) en adultos y se caracterizan por su capacidad de autorrenovación y producción de diferentes progenitores que proliferan y se diferencian en las células sanguíneas maduras (3) (Fig.1).

La poza de HSCs y progenitores contiene células troncales de autorenovación a largo plazo (LT-HSCs, por sus siglas en inglés) y células troncales de autorenovación a corto plazo (ST-HSCs, por sus siglas en inglés), y progenitores multipotentes no autorenovables (MPPs). Diferentes grupos de MPP mieloides funcionan junto con los MPP linfoides para la generación de los componentes sanguíneos. Los MPPs se producen en paralelo con las HSCs, en niveles y cinéticas diferentes de acuerdo con las necesidades hematopoyéticas (4). El nicho hematopoyético constituye un microambiente especializado, compuesto por diversos tipos celulares que participan en el mantenimiento, la inducción, la diferenciación y la proliferación de las HSCs, en la MO. Este incluye; células troncales mesenquimales (MSCs), células sinusoidales, células de osteolinaje y células de Schwann no mielinizantes, localizadas junto a las HSCs en la matriz extracelular. Las diferentes poblaciones celulares regulan el balance entre la proliferación y quiescencia de las HSCs durante la homeostasis o la regeneración (5).

Para asegurar la homeostasis hematopoyética a lo largo de la vida, el balance entre la diferenciación y la autorrenovación debe estar altamente regulado; la diferenciación excesiva o la autorrenovación insuficiente disminuye la poza de HSCs, mientras que la diferenciación insuficiente o la autorrenovación no restringida puede conducir a enfermedades mieloproliferativas o a la leucemia, así la actividad de las HSCs es regulada por factores

celulares intrínsecos, como reguladores epigenéticos , transcripcionales, vías metabólicas y factores extrínsecos que incluyen señales humorales y neuronales de largo alcance o factores locales desde el microambiente en la MO (3).

Anormalidades en el proceso de la hematopoyesis irrumpen la homeostasis y conducen a la acumulación de progenitores intermedios y/o células maduras en la médula ósea, sangre periférica y/o órganos linfoides dando como resultado una variedad de enfermedades malignas (6).

El cáncer en el sistema sanguíneo resulta de eventos patogénicos que alteran el balance homeostático normal entre el proceso de generación de células hematopoyéticas maduras y su reposición por las células HSCs y los progenitores, ya sea por la proliferación desregulada que conduce el incremento de células progenitores o por la adquisición de funciones de autorrenovación en el compartimento de progenitores (7). Las leucemias agudas (LA) son enfermedades hematológicas malignas caracterizadas por la proliferación incontrolada de células indiferenciadas, denominadas blastos, los cuales alteran la hematopoyesis normal, tanto en la MO como en sangre periférica (SP), con infiltración secundaria a otros tejidos (8). La diferenciación incontrolada de precursores linfoides o mieloides sostiene el crecimiento tumoral a expensas de la producción sanguínea normal, mientras que la selección y dominancia entre las clonas leucémicas ocurre en competencia por los recursos del nicho hematopoyético, generado microambientes en MO anormales que participan en la patobiología de la enfermedad (9).

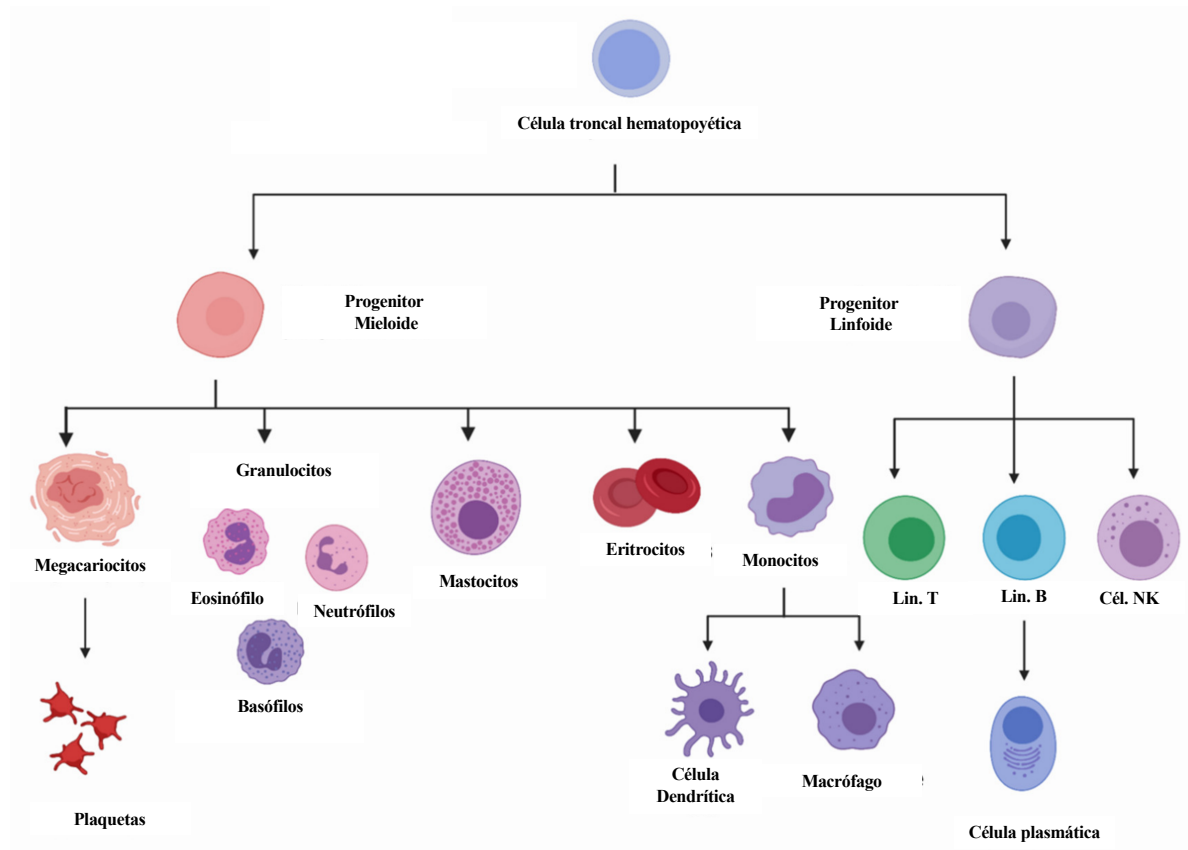


Fig. 1. Esquema de diferenciación hematopoyética. Las células troncales hematopoyéticas (HSC) desempeñan un papel central en el mantenimiento de la hematopoyesis y se caracterizan por la autorrenovación, multipotencia y dormancia. Cuando una HSC se somete a un compromiso de linaje, toma una decisión celular para generar descendencia río abajo con una restricción en el potencial de diferenciación. Modificado de Raza Y., et al. 2021.

CLASIFICACIÓN DE LA LEUCEMIA AGUDA

La leucemia es una enfermedad compleja de las células sanguíneas con tipos y subtipos diferentes. La clasificación de la leucemia infantil se basa en la línea celular predominante afectada y el nivel de diferenciación celular. Los términos mielóide y linfóide denotan el tipo de línea celular involucrada. Tanto las líneas celulares mieloides como las linfoides pueden proliferar en formas agudas o crónicas de leucemia. La leucemia aguda (LA) es una enfermedad que progresa rápidamente y que afecta principalmente a células inmaduras e indiferenciadas. Estas células no pueden realizar sus funciones normales. La leucemia crónica (LC) es una enfermedad que progresa menos rápidamente y permite la producción

de células maduras y más diferenciadas. Estas células mantienen parte de su función normal (10).

La enfermedad letal más importante en el sistema hematopoyética en la edad pediátrica es la leucemia aguda, constituyendo la principal causa de muerte a nivel mundial (11). Los tipos principales de LA en la edad infantil son; la leucemia linfoblástica aguda (LLA), que ocurre en un 75-80% de los casos de leucemia infantil, la leucemia mieloide aguda (LMA), en un 20-25% de las leucemias infantiles y la leucemia mieloide crónica (LMC), que ocurre un <5% de los casos infantiles y raramente se presenta en niños (12). En Estados Unidos, la LLA es el tipo de cáncer más frecuente en la etapa infantil, con un pico de incidencia entre los 3-5 años de edad siendo la causa más frecuente de muerte por cáncer antes de los 20 años, con una sobrevida aproximadamente del 80-98% (13,14).

En particular, la LLA infantil en México muestra una de las tasas de incidencia más altas con una heterogeneidad extraordinaria y resultados inferiores. Casi el 85% de los casos comprometen el linaje linfoide, mientras que el 15-20% son de origen mieloide. Históricamente, las leucemias de linaje T han sido consideradas el subtipo con características más adversas (15). En América Latina, países como Chile y Argentina han demostrado avances significativos en el cuidado de los niños con LLA, logrando un porcentaje de sobrevida del 71.6% al 72.1%, respectivamente, mientras que en nuestro país la sobrevida estimada es del 50% (16).

LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

El 85% de los casos de LLA infantil son de linaje B, la leucemia linfoblástica aguda de células B (LLA-B) es un desorden hematológico caracterizado por la proliferación maligna e incontrolada de las células precursoras linfoides B, en MO. Usualmente los blastos en las leucemias de células B son arrestados en los estadios ProB y PreB (17).

La incidencia varía significativamente de acuerdo con la raza y el grupo étnico: 14.8 casos por millón en afrodescendientes, 35.6 casos por millón en caucásicos y 40.9 casos por millón en hispanos. La LLA infantil se presenta con mayor frecuencia en niños que en niñas en una relación 55%:45% (18).

FACTORES GENÉTICOS EN LA LLA

Diferentes factores genéticos se han asociado con un incremento de riesgo a la LLA, sin embargo, en la mayoría de los pacientes no se observan factores hereditarios. En estudios de asociación de genoma completo se han identificados variantes polimórficas en genes como ARID5B, CEBPE, GATA3 e IKZF1, los cuales se han asociado con un aumento de riesgo a LLA o a subtipos de LLA. Las mutaciones raras en línea germinal en los genes PAX5 y ETV6 se han asociado a LLA familiar. Dentro de los factores ambientales de riesgo se encuentran la exposición a la radiación y la exposición a ciertos químicos, sin embargo, estos solo explican una pequeña minoría de los casos (13,19,20).

La LLA comprende múltiples alteraciones genéticas somáticas, aneuploidías (alteraciones en el número de cromosomas), arreglos cromosómicos que desregulan la expresión génica o que resultan en la expresión de proteínas quiméricas de fusión, deleciones y ganancia de ADN, así como mutaciones en la secuencia de ADN. En promedio, en el genoma de LLA infantil se han observado de 10 a 20 mutaciones silentes no codificantes al diagnóstico y alrededor de 2 veces más en la recaída (18).

Se han observado reordenamientos cromosómicos raros que yuxtaponen la porción que codifica el dominio quinasa del gen JAK2 con regiones genómicas codificantes del dominio oligomerizante de otros genes como TEL, BCR, PCM1, PaX5 o ETV6 en la LLA (6). En el 25 al 30% de los niños con LLA-B, las células leucémicas poseen hiperdiploidías (>50 cromosomas), debido a ganancias cromosómicas no aleatorias. Este subtipo está asociado a un excelente pronóstico (18). Ejemplos importantes son la fusión de los genes ETV6-RUNX1, el cual involucra dos factores de transcripción, la fusión de TGF3-PBX1, la translocación t(9;22) que resulta en la formación del cromosoma Filadelfia (Ph) y los reordenamientos cromosómicos del gen de la leucemia de linaje mixto, MLL, del cromosoma 11q23. El cromosoma Ph involucra la fusión de genes BCR-ABL, los cuales dan como resultado de su fusión una proteína tirosina quinasa activada. Se han determinado más de 70 translocaciones diferentes que involucran MLL, creando proteínas de fusión que median autorrenovación aberrante en las células progenitoras hematopoyéticas (21).

Las modificaciones epigenéticas son parte del desarrollo normal de las células sanguíneas desde una célula troncal hasta una célula madura. Sin embargo, pueden ocurrir cambios en la programación epigenética derivados de adaptaciones a cambios ambientales. Este tipo de adaptación es esencial para “los orígenes evolutivos de la salud y la enfermedad” iniciales que permiten entender las adaptaciones tempranas en la vida que más tarde conducen a factores de riesgo para enfermedades, tal y como se ha demostrado que la inanición in utero puede conducir a riesgo de obesidad y enfermedades cardíacas posteriormente. Las adaptaciones pueden ocurrir como resultado a factores específicos ambientales, por ejemplo, la desmetilación de CpG en el gen AHRR se ha relacionado directamente al humo del cigarro. El entendimiento de los efectos específicos de las exposiciones ambientales sobre las características epigenéticas aún es limitado, y se desconoce si estas perturbaciones pueden afectar la leucemogénesis (22).

MICROAMBIENTE EN LA LLA

Los tumores tienen una pequeña subpoblación de células responsables del inicio y la recaída del cáncer (23–25). Las células troncales leucémicas (LSC), al igual que las células troncales hematopoyéticas normales, dependen de la interacción con el microambiente o del nicho para su propia autorrenovación y mantenimiento (26).

El microambiente está formado por tejidos fisiológicos que incluyen el estroma (andamio de sostén) con fibroblastos, vasos sanguíneos y glóbulos blancos, especialmente linfocitos T y macrófagos, cuyos precursores son los monocitos derivados del linaje mieloide. Algunos tumores tienen un rico infiltrado de linfocitos T (27). Las células de la inmunidad innata como macrófagos, granulocitos y células mieloides inmaduras de las que derivan monocitos o macrófagos también se encuentran en diferentes cantidades (28). Actualmente, es cada vez más claro que el sistema inmune puede tener una doble función, es decir, manifestar actividad antitumoral u ofrecer una contribución significativa al desarrollo tumoral, constituyendo así una barrera que se opone a la eficacia de los fármacos anticancerosos al crear quimiorresistencia (29). El papel paradójico que juega el sistema inmune en el control tumoral puede explicarse por su plasticidad que conduce a propiedades pro o antitumorales (30,31).

El sitio óptimo para las HSC es la MO, que incluye áreas especializadas llamadas nichos que consisten en diferentes tipos de células que controlan el número, la inactividad, la autorrenovación, la diferenciación y la distribución de estas (32). Los nichos se dividen en dos áreas distintas, pero igualmente conectadas: la primera en la que el osteoblasto juega un papel principal (nicho osteoblástico); el segundo donde predominan las células endoteliales y ha sido denominado nicho vascular (33).

En particular, en el nicho vascular, las células endoteliales sinusoidales favorecen la supervivencia, proliferación y diferenciación de progenitores mieloides y megacariocitos. Las HSC en el nicho vascular están expuestas a hormonas, factores de crecimiento, oxígeno y nutrientes, por lo tanto, pueden detectar señales y estímulos de la circulación periférica. Esto favorece el automantenimiento, la proliferación y/o la diferenciación (5,34).

Por el contrario, el nicho osteoblástico puede actuar como reservorio ya que favorece el mantenimiento del estado de quiescencia (35). Sin embargo, no todas las células de la superficie endóstica realizan estas funciones; los que definen el nicho osteoblástico están representados por la subpoblación N-cadherina+ y CD45- (SNO).

Por lo tanto, el contacto directo entre el microambiente y las células leucémicas es esencial, y también la activación de diferentes vías de señalización caracteriza el microambiente de manera específica. La fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K)/AKT-Bcl2 o NOTCH1 parecen ser vías relevantes para ser inducidas por el microambiente y las conexiones de células leucémicas (36).

Finalmente, la hiperactividad a largo plazo de las especies reactivas de oxígeno (ROS) podría tener efectos nocivos sobre las células madre y sobre la incidencia de leucemia (37), y en este contexto se activan varias redes en respuesta al incremento de ROS como P53, AKT y MAPK (26).

Una mejor comprensión de la contribución de los estímulos microambientales en la mediación de la leucemogénesis puede proporcionar un mejor escenario de nuevos objetivos terapéuticos en el tratamiento de las leucemias (26).

El microambiente inflamatorio que rodea a las células cancerosas es una red compleja en la que la infiltración inmunitaria se ha considerado durante mucho tiempo un mecanismo de defensa contra los tumores malignos. De hecho, puede contribuir al desarrollo, la propagación del cáncer, la metástasis y la aparición de resistencia a las terapias contra el cáncer (38). Las citocinas son esenciales para la homeostasis del nicho de MO, y los primeros estudios sobre LLA-B informaron una mayor expresión de estas moléculas en comparación con muestras de MO sanas, lo que sugiere una regulación autocrina/paracrina de células leucémicas y citocinas (39). Entre las citocinas con mayor actividad moduladora se encuentran la IL-7, la IL-8 y la IL-15.

También se ha demostrado que el ligando 2 de quimiocina motivo C-C (CCL2) e IL-8 pueden aumentar la adhesión de las células de LLA a las células estromales en MO, de manera dependiente del estroma, y promover la supervivencia y proliferación de las células estromales, mientras que parecen no tener efecto en la mayoría de la supervivencia o migración de LLA-B. Se ha observado que los niveles plasmáticos CCL2 e IL-8 en niños con LLA al diagnóstico son significativamente más altos que en los individuos sanos. Además, en la LLA-T la producción de IL-8 está fisiológicamente regulada por una red de señalización específica, representada por el eje CXCL12/CXCR4 y las vías del factor nuclear- κ B (NF- κ B) y JNK/AP-1 (40,41).

El factor 1 derivado de células del estroma (SDF-1 o CXCL12) es un miembro de la familia de quimiocinas CXC que contrarresta el eje CXCL12/CXCR4 en la patogénesis de la LLA con sus receptores afines, el receptor 4 de quimiocinas CXC (CXCR4), ampliamente expresado en numerosos tejidos, incluidos los osteoblastos inmaduros y las células endoteliales dentro de la MO, las células epiteliales en muchos órganos, el sistema nervioso central y las células hematopoyéticas, para estimular los procesos fisiológicos. La señalización de CXCL12/CXCR4 es esencial para mantener el conjunto de células hematopoyéticas progenitoras y también regula la unión de las células madre hematopoyéticas dentro del nicho de la médula ósea (42).

Se ha observado que la sobreexpresión de CXCR4 en blastos leucémicos y la activación del eje CXCL12/CXCR4 está involucrado en la progresión de la leucemia y la interrupción de la

hematopoyesis normal (43). También se ha asociado a un pronóstico pobre en los pacientes con LLA-B, esto potencialmente debido al papel de CXCR4 en el mantenimiento de las células leucémicas dentro la MO, activando vías que favorecen la supervivencia y crecimiento, y la resistencia a la quimioterapia (44).

DIAGNÓSTICO DE LA LLA

Los pacientes con LLA desarrollan síntomas relacionados con la infiltración de blastos en la médula ósea, el sistema linfoide y sitios extramedulares (incluido el sistema nervioso central [SNC] y los testículos). Estos síntomas pueden incluir fatiga o letargo, síntomas constitucionales (p. ej., fiebre, sudores nocturnos, pérdida de peso), disnea, mareos, infecciones y moretones o sangrado. La trombocitopenia con conteo plaquetario menor a 100,000 se presenta en el 75% de los pacientes. Aproximadamente el 40% de los pacientes pediátricos con LLA presentan niveles de hemoglobina menor a 7g/dL. Aunque un conteo de leucocitos mayor a 50,000/mm³ ocurre en el 20% de los casos, la neutropenia es definida como un conteo absoluto de neutrófilos menor a 500 y comúnmente se asocia con mayor riesgo a infección. En los niños, el dolor en las extremidades o las articulaciones puede ser el único síntoma de presentación. La presencia de linfadenopatía, esplenomegalia y/o hepatomegalia en el examen físico se puede encontrar en aproximadamente el 20% de los pacientes (45).

Aunque los blastos periféricos con anemia y trombocitopenia sugieren fuertemente LLA, el diagnóstico definitivo se basa en el aspirado de médula ósea. La inmunofenotipificación mediante citometría de flujo multiparamétrica se ha convertido en el procedimiento estándar para el diagnóstico y la subclasificación de la LLA. El consenso del Grupo Europeo para la caracterización inmunológica de las leucemias (EGIL) determina la presencia de al menos 20% de blastos en médula ósea para considerar una leucemia (46).

De acuerdo con clasificaciones internacionales en el linaje y la etapa de maduración, según el número y grado de especificidad de los antígenos expresados por las células leucémicas; 80 a 85 % de los casos tiene inmunofenotipo de células B, mientras que casi 10 a 15 % muestra inmunofenotipo de células T. La leucemia congénita, una entidad distinta de la LLA típica, representa solo 3 % de las leucemias agudas, mientras que las leucemias de linaje

mixto, con propiedades de células de dos estirpes, constituyen aproximadamente 2 %. La mayor contribución a la supervivencia libre de enfermedad está dada por un tratamiento adecuado de la enfermedad, basado en la estratificación de los pacientes por grupos de riesgo y la identificación de factores de recaída (45).

En la actualidad, los indicadores pronósticos más útiles son el inmunofenotipo, la detección de enfermedad mínima detectable (MDR) y la respuesta a la terapia de inducción. El inmunofenotipo de las células leucémicas es uno de los factores que establecen el riesgo de recaída, que ocurre en 20 a 30 % de los pacientes, particularmente en las leucemias de linaje T y de linaje mixto (47).

Tanto el origen, como su progresión, resultan de múltiples factores que incluyen los genéticos, microambientales, macroambientales e inmunológicos. En los casos de LLA de células precursoras B, el uso de anticuerpos anti-CD19 y anti-CD79a citoplasmáticos es el enfoque más potente para identificar el linaje de las células neoplásicas. Para determinar su grado de diferenciación se sugiere incluir a los anticuerpos anti-CD34, CD45, CD20 y CD38, mientras que para subclasificar la variante se recomienda la investigación de CD10, inmunoglobulina de superficie y cadenas μ citoplásmicas (48).

La estratificación de los pacientes con LLA permite la identificación de características asociadas con el pronóstico de la enfermedad. Los pacientes suelen clasificarse de acuerdo con el riesgo a la falla en el tratamiento. Aquellos con características favorables podrán ser tratados con regímenes menos tóxicos, mientras que los regímenes o tratamientos serán más agresivos para aquellos con enfermedad de alto riesgo (14).

Por lo tanto, características clínicas como la edad y el conteo de glóbulos blancos (WBC, por sus siglas en inglés), al diagnóstico, suelen ser criterios de estratificación de riesgo, de acuerdo con el Instituto Nacional de Cáncer (NCI, por sus siglas en inglés). Los pacientes entre 1 a 10 años suelen considerarse de riesgo estándar, mientras que por arriba de 10 años, suelen presentar una enfermedad más agresiva. En parte por el alto rango de factores citogenéticos favorables en edades tempranas (1-10 años). El conteo inicial de WBC al debut, se ha asociado directamente con un aumento en el riesgo, $>50,000/uL$ (49).

PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO (HSPs)

El retículo endoplásmico (RE) es un orgánulo unido a la membrana que es responsable del plegamiento, modificación y síntesis de proteínas secretoras y unidas a orgánulos. El proceso de síntesis y plegamiento de proteínas está altamente controlado, en particular, un gran número de proteínas dentro del RE son críticas para el control del plegamiento y ensamble de las proteínas que van naciendo, éstas son conocidas como “chaperonas” e incluyen una amplia familia de proteínas no relacionadas (50).

Las proteínas de choque térmico (HSPs) son una gran familia de proteínas tipo chaperonas que participan en el plegamiento y maduración de proteínas nacientes en el RE. Por lo que son reguladores significativos de la proliferación celular, la diferenciación y están implicadas en el desarrollo y progresión del cáncer ya que muchas de las proteínas sobre las que participan son oncoproteínas. Las HSPs son evolutivamente conservadas y expresadas de manera oblicua en todos los organismos en diferentes compartimentos subcelulares. Están involucradas en procesos celulares como ensamble de proteínas, secreción, transporte, translocación y degradación de proteínas, así como regulación de factores de transcripción, especialmente replegando las proteínas mal plegadas (51).

Las células tumorales con alta demanda metabólica requieren su participación para su supervivencia, participan tanto en el desarrollo del cáncer como en la modulación de la respuesta a la terapia citotóxica (52).

La respuesta de las HSPs se regula diferencialmente durante la carcinogénesis, por lo que estas proteínas pueden participar en la patogénesis de ciertos tipos de cáncer pero no en otros. No todas las chaperonas moleculares se sobreexpresan durante el desarrollo/formación del tumor, lo que sugiere que existen cambios moleculares específicos que producen la regulación a la alza o a la baja de HSPs específicas. Varios estudios informan sobreexpresión de Hsps en una amplia variedad de tumores sólidos humanos. Se ha observado que la sobre regulación está relacionada a una mayor resistencia a la quimioterapia (53).

PROTEÍNA 78KDA REGULADA POR GLUCOSA (GRP78)

La proteína de 78kDa regulada por glucosa (GRP78), es un miembro de la familia de Proteínas de Choque térmico 70 (HSP70). Se encuentra en todos los eucariontes en la membrana interna del RE, facilitando el plegamiento de proteínas, siendo un control de calidad y regulando la Vía de respuesta a proteínas mal plegadas UPR (54–56). GRP78 contiene diferentes dominios críticos para su localización y su función; el péptido señal en la región amino terminal permite su localización en el RE y el motivo KDEL en la región carboxilo terminal confiere la retención en este. Como chaperona, GRP78 posee un dominio ATPasa y un dominio de unión a sustrato, el cual facilita el plegamiento de las proteínas nacientes (Fig. 2). Condiciones de estrés en el RE conduce a la acumulación de proteínas incorrectamente plegadas así como al incremento en la expresión de GRP78 y la liberación de los sensores de la vía UPR (PERK, IRE1 y ATF6) permitiendo su activación (56–58) (Fig. 3).

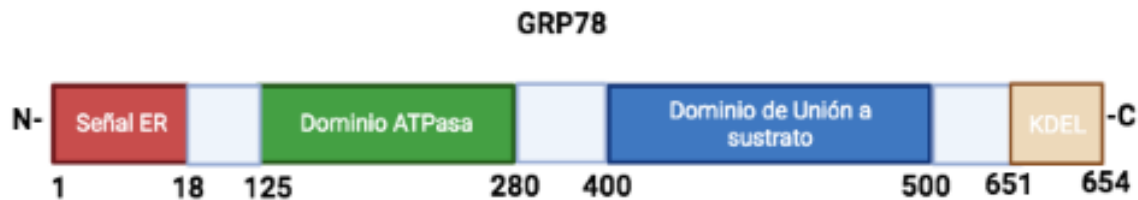


Fig. 2. Estructura proteica de GRP78. La estructura de GRP78 está compuesta por una secuencia señal ER en el extremo amino, un dominio de ATPasa, un dominio de unión a sustrato y una secuencia de 4 péptidos, KDEL, en el extremo carboxilo. Creada con BioRender.

En condiciones de estrés, la sobreexpresión de GRP78 permite que una fracción escape a los receptores del motivo de retención KDEL y pueda translocar en la superficie celular. Por otra parte los receptores para este motivo, al estar completamente saturados permiten que GRP78 escape a la retención (59). Se ha propuesto que otro posible mecanismo para el transporte de GRP78 hacia la superficie celular puede involucrar la glicosilación del motivo KDEL o sitios adyacentes a este en la región carboxilo terminal (57).

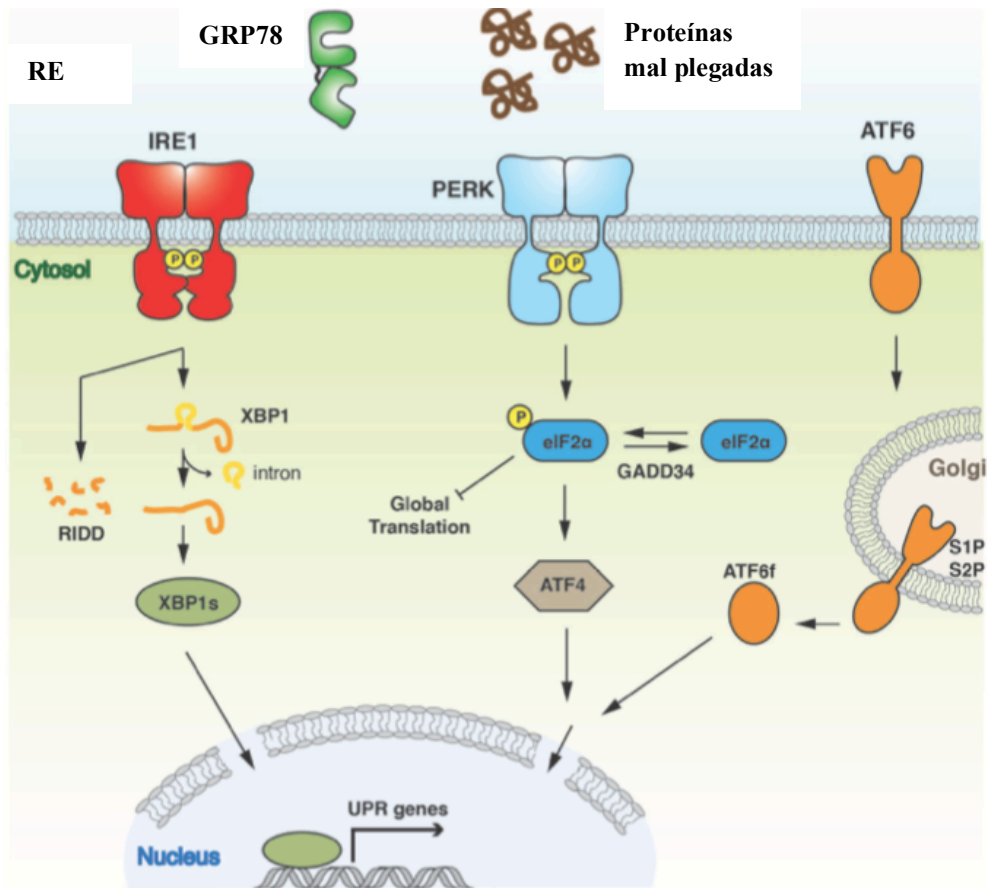


Fig. 3. GRP78 como regulador de la vía de respuesta a proteínas mal plegadas (UPR). La vía UPR consiste en una respuesta transcripcional y traduccional frente al estrés del RE, en donde GRP78 funciona como el regulador principal de las proteínas sensoras que componen la vía. La activación de los sensores; IRE1, PERK y ATF6 dan lugar a tres ramas separadas de la respuesta, las cuales tienen como objetivo liberar la acumulación de las proteínas en el RE y garantizar la homeostasis. IRE 1; Enzima 1 que requiere serina/treonina-proteína quinasa/ endoribonucleasa inositol, PERK; quinasa del retículo endoplásmico tipo quinasa R, ATF6; factor de transcripción activador 6. Modificada de Adams C., et al. 2019.

GRP78 Y CÁNCER

La progresión del cáncer está caracterizada por células tumorales que proliferan rápidamente y que por lo tanto tienen un incremento en la síntesis de proteínas. Así la actividad del RE es requerida para facilitar el plegamiento, ensamble y transporte de proteínas de membrana y secretoras. Estas funciones son realizadas por proteínas chaperonas del RE (56). En la membrana plasmática de diversas líneas celulares tumorales tales como;

SH-SY57 (neuroblastoma), LoVo (adenocarcinoma de colón), A549 (adenocarcinoma de pulmón) y Sup-B15 (leucemia linfoblástica aguda de células B) se ha observado la presencia abundante de proteínas chaperonas como GRP78, GRP75, HSP70, HSP60, HSP54 y HSP27 (60). Estas, al ser derivadas de células tumorales son reconocidas por células T tanto mediante receptores T tipo α , β como γ , δ . Se ha observado que la interacción entre las proteínas de choque térmico y los TLR (Gp96-TLR2/4) da como resultado la activación de genes reporteros NF κ B. Además, HSP70 puede activar la vía de señalización del receptor IL-1. Durante el reconocimiento del lipopolisacárido bacteriano por el sistema inmunológico se observa la formación de un complejo de receptores de señalización que incluyen a las proteínas de choque térmico 70 y 90, al receptor CXCR4 y el factor de diferenciación de crecimiento 5 (61–64).

En el cáncer, la sobre regulación de GRP78 se asocia con un crecimiento agresivo e invasividad del tumor (58,65,66). Si bien GRP78 se considera tradicionalmente como una proteína del lumen del RE, han surgido estudios que muestran que GRP78 se puede detectar en otros compartimentos celulares que incluyen la superficie celular, el citosol, el núcleo y las mitocondrias (67). De estos, la proteína GRP78 en superficie celular (sGRP78) ha sido la más estudiada y particularmente relevante en el contexto tumoral, actuando como mediador y potencial blanco en la terapia (58). A diferencia de su papel en el RE en el procesamiento y plegamiento de proteínas nacientes, sGRP78 exhibe diferentes funciones en la superficie, donde regula vías de señalización oncogénicas críticas (68,69). GRP78 se traslada del RE a la superficie celular bajo estrés típico del microambiente tumoral, incluidas las condiciones de hipoxia y la depleción de glucosa, por otro lado las células cancerosas que han adquirido resistencia terapéutica expresan niveles más altos de sGRP78 que las células parentales sensibles (57,70).

La expresión preferencial de GRP78 en la superficie de las células cancerosas, pero no en las normales *in vivo*, abre la posibilidad de utilizar sGRP78 en la terapia específica (70–73).

GRP78 EN LA LEUCEMIA

GRP78 proporciona señales de supervivencia y funciona como un co-receptor de crecimiento en la leucemogénesis. Se ha observado un incremento en el ARN mensajero de

GRP78 en blastos leucémicos de LLA-B y en células de leucemia linfocítica crónica (LLC), asociado a la recaída en la enfermedad, así como a la resistencia a la quimioterapia (74).

El ratón “knockout” de GRP78 muestra proliferación reducida del compartimento de células HSCs, pérdida de progenitores linfoides y mieloides, así como disminución en las poblaciones linfoides maduras. Mientras que en el ratón “knockout” condicionante del sistema hematopoyético se observa un papel tanto en la leucemogénesis como en la supervivencia de las HSC (72). En estudios preclínicos, GRP78 induce señales oncogénicas mediante AKT y leucemogénesis en ratones PTEN-nulos y en superficie, sGRP78, se observa asociada a la proteína Cripto confiriéndole quiescencia a las células HSC (75).

La vía UPR tiene un papel en múltiples estados en la ontogenia de los linfocitos B y es el regulador principal en la supervivencia y la quimioresistencia en linfoma y en LLA-B (76,77). Se ha observado una sobre expresión de GRP78 en clonas residuales de precursores leucémicos (76).

Recientemente se ha observado la presencia de sGRP78 en blastos primarios en leucemia mieloide aguda (LMA) pero no en HPCs, lo que ha permitido el diseño de una terapia dirigida contra sGRP78 mediante células T con receptores quiméricos de antígenos (CAR-T) (73).

LIGANDOS DE sGRP78

En la superficie celular, GRP78, funciona como un multireceptor capaz de regular tanto la proliferación como la apoptosis celular (Fig.4) (78). Por lo que se han descrito diferentes ligandos endógenos solubles para este; alfa-2- macroglobulina (α_2M) estimula la vía PI3K/AKT y MAPK promoviendo la proliferación celular (79). Mediante la proteína CRIPTO se activa la supervivencia celular suprimiendo la señalización de Smad2/3 en cáncer de próstata (80). En contraste, la unión del plasminógeno Kringle a sGRP78 induce la apoptosis en células endoteliales y tumorales mediante la activación de caspasa 7 en células de fibrosarcoma (81). Adicionalmente, mediante Par-4 se induce caspasa 8 y caspasa 3, los principales componentes de la vía extrínseca de apoptosis en la línea celular de cáncer de próstata, PC-3 (82).

En células endoteliales, la unión de la proteína Isthmin-1 (ISM1), una adipoquina, permite la internalización de un complejo ISM1-sGRP78, ocasionando disrupción en el transporte mitocondrial de ATP y finalmente apoptosis (83). De todos los ligandos de sGRP78, ISM1 es el único secretado por células del sistema inmune.

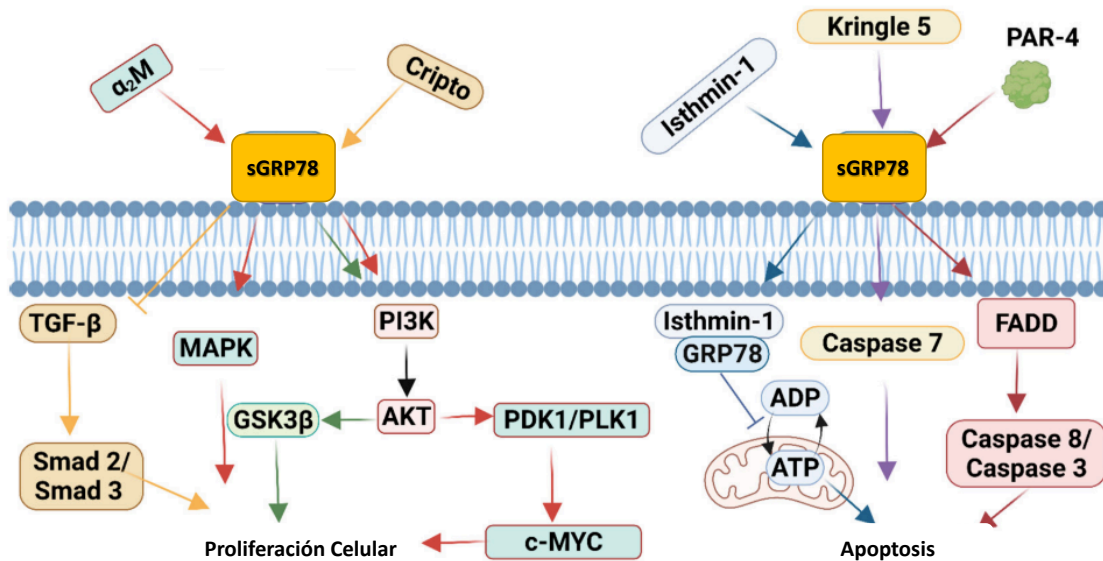


Fig. 4. Función de sGRP78 como receptor de señalización capaz de mediar proliferación y apoptosis celular. La unión de α_2M a sGRP78 activa la vía PI3K/AKT, estimulando la vía PDK1/PLK1 para sobreregular la expresión de c-MYC y así la proliferación celular. Mientras que la unión de Cripto inhibe la activación de Smad2/3 mediada por TGF- β . La interacción de Isthmin-1 con sGRP78 promueve la apoptosis mediante la internalización del complejo formado, conduciendo a la inhibición del transporte ATP en la mitocondria. Otro ligando Par-4 activa la vía de caspasas 3 y 8 inducida por FADD activando la apoptosis celular. TGF- β ; Factor de crecimiento transformante beta, MAPK; Proteína quinasa activada por mitógeno, PI3K; Fosfoinositol 3-cinasa, GSK3 β ; Glucógeno sintasa quinasa-3beta, AKT; Serina/treonina quinasa, PDK1/PLK1; Proteína quinasa-1 dependiente de 3-fosfoinositida, c-MYC; Proto-oncogen Myc, ADP; Adenosín difosfato, ATP; Adenosín trifosfato, FADD; Proteína de dominio de muerte asociada a FAS. Modificado de Chen, J., et al. 2022.

ISTHMIN 1

Isthmin 1 (ISM1) es una proteína secretada que se identificó por primera vez en el cerebro de *Xenopus laevis*, en la región organizadora el *isthmus*, de donde toma su nombre (84). En el desarrollo ISM1 es parte del grupo de expresión del factor de crecimiento de

fibroblastos 8 (FGF8), donde es necesaria para el correcto remodelamiento craneofacial (85). ISM1 posee dos dominios proteicos altamente conservados, un dominio de repetidos de trombospondina (TSR) y un dominio asociado a adhesión en MUC4 y otras proteínas (AMOP) (86). En mamíferos adultos se ha descrito que ISM1 se expresa abundantemente en la piel, el pulmón, el pericardio y en algunas células del sistema inmunológico como las NK $DX5^+NKp46^+$, las NKT y los linfocitos Th17, y se ha observado en circulación en el torrente sanguíneo (87).

De los dos receptores que se han descrito para ISM1, uno de baja afinidad, es el dímero de integrinas $\alpha v \beta 5$ ($K_d=40$ uM) que promueve la apoptosis inducida por integrinas y otro de alta afinidad, sGRP78 ($K_d=8.6$ nM) (83,88,89).

Como ya se ha mencionado, el complejo ISM1-sGRP78 promueve la apoptosis mientras que el bloqueo con anticuerpos anti-GRP78 contra la región N-terminal reduce los niveles de apoptosis inducidos por ISM1 (90) (91).

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las leucemias agudas (LAs) constituyen las neoplasias más frecuentes en la edad pediátrica. A nivel mundial, su incidencia se estima entre 20 a 35 casos por cada millón de habitantes al año. Sin embargo, en México, la incidencia es mayor, se estima que ocurren 49.5 casos nuevos por millón (92). La leucemia linfoblástica aguda B (LLA-B) es el subtipo más común en individuos en edad pediátrica, a pesar del uso de nuevos fármacos y dosis más elevadas, el resultado en el tratamiento de la LLA sigue siendo deficiente, las tasas de supervivencia libre de enfermedad oscilan entre el 30-40% en aquellos pacientes con rearrreglos en el gen MLL (93) y los efectos secundarios a largo plazo incluyen daños en el desarrollo neurocognitivo y del sistema endócrino, además del impacto en los costos del tratamiento.

Aún con el considerable progreso en el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda en la infancia, la recaída de la enfermedad es un problema persistente y difícil de resolver, ocurre con frecuencia en países en vías de desarrollo en donde se observan porcentajes mayores al 30%. Por otro lado, la tasa de supervivencia es variable y no refleja apropiadamente el

impacto que tiene sobre cada niño en relación a la salud influenciada por el tipo de tratamiento (16).

Por ello los estudios que permitan el descubrimiento de nuevos biomarcadores involucrados en el desarrollo y/o establecimiento de la leucemogénesis permitirán mejorar los resultados en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la enfermedad.

Ya que GRP78 en la superficie celular (sGRP78) se expresa selectivamente en células tumorales y su interacción con ligandos endógenos permite la activación de diferentes señales celulares asociadas a la migración, invasión, resistencia a la quimioterapia, así como a características troncales tumorales (90,94), es importante la evaluación de esta proteína en la leucemia infantil, en el desarrollo de la enfermedad, como biomarcador y potencial blanco terapéutico mediante el uso de proteínas endógenas.

6. JUSTIFICACIÓN

El procedimiento quimioterapéutico utilizado disminuye sensiblemente la calidad de vida de los individuos afectados y en general, los costos de los tratamientos médicos, incluyendo los cuidados que un paciente con leucemia requiere, son elevados. En este contexto, se ha estimado que en México, el valor de los medicamentos utilizados para tratar la leucemia puede ir entre los 5000 a los 7000 dólares (USD) por individuo (95), aunque en nuestro país a través del INSABI (antes Seguro Popular), el gobierno federal y la sociedad aportan recursos al Fideicomiso de Protección Social en Salud, canalizados para los medicamentos y el tratamiento médico de los menores de 18 años que padecen esta enfermedad, la investigación enfocada al descubrimiento de moléculas que permitan diagnosticar de manera temprana el establecimiento de la enfermedad, es fundamental para canalizar a los individuos diagnosticados a centros de salud de alto nivel para encausarlos en protocolos de observación y que puedan ser tratados de manera oportuna. De esta forma, se aumentaría la calidad de vida de los individuos que sufren esta neoplasia, disminuiría su tasa de mortalidad y a la par, habría una reducción en los costos de los tratamientos utilizados actualmente. Con el fin de mejorar la calidad de vida de los individuos que padecen leucemia, disminuir su tasa de mortalidad y simultáneamente, reducir los costos de los tratamientos utilizados actualmente; es importante enfocar el desarrollo científico al descubrimiento de

moléculas involucradas en el desarrollo y estavlecimiento de la leucemogénesis así como potencial blanco terapéutico .

7. HIPÓTESIS

La presencia selectiva de GRP78 en la superficie de células leucémicas de pacientes pediátricos permite su uso potencial como blanco terapéutico.

8. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el papel de GRP78 como blanco terapéutico en la leucemia aguda infantil.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar la expresión de GRP78 en la superficie celular (sGRP78) de líneas celulares de leucemia linfoblástica aguda (Sup-B15, RS4;11 y Reh) .
2. Evaluar la expresión de sGRP78 en células mononucleares obtenidas de médula ósea y sangre periférica de pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda (LLA) al diagnóstico y de individuos control.
3. Analizar la expresión de sGRP78 junto con los marcadores: CD45, CD34, CD38, CD19, CD10 y CXCR4, en la misma célula.
4. Evaluación *in vivo* de la capacidad migratoria de células sGRP78+ en un modelo de xenotrasplante con el uso de ratones BALB/c-nude.
5. Determinar los niveles de la proteína Isthmin (ISM1) en plasma de la pacientes LLA e individuos control.
6. Evaluación *in vitro* de apoptosis en células sGRP78+ mediada por ISM1.

9. MATERIALES Y MÉTODOS

OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Muestras de pacientes. Se obtuvieron 43 muestras de médula ósea (MO) y 26 muestras de sangre periférica (SP) de pacientes pediátricos (<18 años) con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda (LLA) del Hospital Infantil de México Federico Gómez y del Hospital Pediátrico de Moctezuma, de acuerdo con las guías Internacionales e Institucionales, sin algún tratamiento previo.

Clasificación de los pacientes. De acuerdo con las guías Romo del Instituto Nacional de Cáncer (NCI) se establecieron los criterios para la clasificación de riesgo, se consideró de alto riesgo alto (HR) a individuos con un conteo leucocitario $\geq 50 \times 10^9/L$ o ≥ 10 años y de riesgo estándar (SR) a aquellos con un conteo leucocitario $< 50 \times 10^9/L$ y edad de $1 < 10$ años.

Muestras de individuos control (CTL). Se obtuvieron células mononucleares de biopsia de cadera de 4 pacientes < 18 años y 9 muestras de sangre periférica, como parte del protocolo para cirugía de cadera, sin diagnóstico hemato-oncológico.

DECLARACIÓN ÉTICA

En el presente estudio sólo se utilizaron los remanentes de las muestras, el protocolo de investigación fue aprobado por el comité de ética del Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIM-2016-023) y del Hospital Pediátrico de Moctezuma (2016-01-3385). Pacientes y tutores legales autorizaron participar en el estudio de acuerdo con el consentimiento informado firmado. El estudio fue realizado de acuerdo con la Declaración de Helsinki.

LÍNEAS CELULARES

Se utilizaron líneas celulares de leucemia linfoblástica aguda (LLA); SUP-B15, RS4;11 y Reh de la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). La SUP-B15 es una línea celular de LLA-B, aislada de médula ósea de un individuo pediátrico (8 años) con arreglo cromosómico t(9;22). Mientras que RS4;11 es una línea LLA de médula ósea, establecida de un individuo adulto 32 años, con t(4;11). Reh corresponde a una línea celular obtenida de sangre periférica de un paciente LLA-B de 15 años, con arreglo cromosómico t(12;21). Las líneas celulares fueron cultivadas en medio IMDM, RPMI 1640, suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB), 1% de antibiótico estreptomina-penicilina, siguiendo las guías de ATCC y mantenidas en incubación a 5% CO₂ 37°C, hasta su uso.

AISLAMIENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES

Se aislaron células mononucleares (MNC) de médula ósea y sangre periférica mediante gradiente de densidad utilizando la solución Ficoll-Paque. En tubos de polipropileno se colocó un volumen de 1 a 2 mL de medio de separación Ficoll-High Paque y se agregó muestra de MO o SP con PBS 1x (volumen 1:1), cuidando no mezclar el medio de separación con la muestra, se realizó una centrifugación a 800xg por 30 min. Las MNCs fueron colectadas tomando el anillo formado entre ambas fases. Posteriormente se colocaron en un tubo de polipropileno nuevo y se realizaron dos lavados de 5mL con PBS 1x para ser centrifugadas a 800xg por 5min. Finalmente se evaluó la viabilidad en las células obtenidas mediante el colorante de exclusión azul tripán y un conteo en cámara de Neubauer, en el microscopio óptico.

CITOMETRÍA DE FLUJO MULTIPARAMÉTRICA

Para determinar la presencia de sGRP78 junto con los marcadores CD34, CD38, CD10, CD19 y CXCR4 en las células leucémicas se colocaron de $1-2 \times 10^6$ células en 200 uL de PBS 1x, en hielo y se añadieron anticuerpos, se homogenizaron y se incubaron por 30min en oscuridad. Las células fueron lavadas con PBS 1x y se centrifugaron a 800xg por 5min, al menos 2 veces. Finalmente fueron adquiridas en el citómetro CytoFLEX LX (Beckman Coulter). La colección de datos y el análisis se realizó mediante el software CytExpert. Para la tinción se utilizaron los siguientes anticuerpos anti humano: AF488 anti-GRP78 (clona: C38), AF700 anti-CD45 (clona: HI30), APC anti-CD34 (clona: 561), PE/CY7 anti-CD38 (clona: HB-7), PerCP/Cy5.5 anti-CD19 (clona: HIN19), PE/Dazzle anti-CD10 (clona: HI10a), Violeta brillante 421 anti-CD184 (clona: 12G5) y el kit de viabilidad Zombie Aqua™, siguiendo las recomendaciones del fabricante (Biolegend).

MICROSCOPIA DE FLUJO

Para corroborar la expresión de más de un marcador en la misma célula se realizó microscopía de flujo. 1×10^6 células de MO se incubaron con anticuerpo anti GRP78 humano acoplado a AF488 y anti CD34 humano acoplado a APC, en 200 uL de PBS 1x en hielo,

durante 30min en oscuridad. Las células fueron lavadas con PBS 1x y se centrifugaron a 800xg por 5min. Las imágenes fueron capturadas usando el equipo Amnis ImageStream Mark II (EMD Millipore) a 60x y analizados con el software Amnis *IDEAS*.

ANÁLISIS DE AGRUPACIÓN FLOWSOM Y DE DISTRIBUCIÓN T-SNE

Se realizó un análisis de alta dimensión para visualizar el conjunto de todos los datos obtenidos por citometría de flujo multiparámetro en la misma célula. Una vez que las muestras fueron adquiridas por citometría de flujo, se analizaron los datos excluyendo dobles eventos y se realizó el análisis sobre la población viva CD45⁺ en cada muestra, considerando 40,000 eventos, los cuales fueron exportados utilizando el software CytExpert 2.0. Los archivos FACS previamente procesados y compensados fueron cargados y analizados con el Studio R mediante los programas Flow Core, Flow Vix, Flow SOM y CATALYST (96,97). El análisis de vecinos estocásticos distribuidos en t (tSNE) se basó realizó sobre 2000 células vivas, teñidas con los marcadores CD19, CD10, CD34, CXCR4 y GRP78. Se seleccionaron 2000 células al azar en cada muestra.

ENSAYO DE VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS DE PACIENTES LLA-B INFUNDIDAS EN RATONES BALB/C

La viabilidad de las células LLA utilizadas en el ensayo de xenotrasplante se determinó con el uso del colorante lipofílico Dil. Se obtuvieron 1×10^6 células de pacientes de alto riesgo y se incubaron con 5 μ L de colorante, durante 20min a 37°C. Posteriormente, se introdujeron vía subcutánea en un ratón BALB/c nude y luego de 4 semanas fueron recuperadas de médula ósea. Las células recuperadas fueron lavadas con medio RPM1 y se centrifugaron a 1500rpm por 5min y analizadas mediante citometría de flujo.

ESPECIFICIDAD DE LOS ANTICUERPOS ANTI HUMANO EN RATÓN BALB/C

Se analizó la especificidad de los anticuerpos anti-GR978, anti-CD45 anti-CD34 y anti-CXCR4, antihumano que posteriormente serían utilizados para el reconocimiento de las células en el ensayo de xenotrasplante. Se obtuvieron de 300,000-50,000 células de médula ósea de ratones BALB/C y se incubaron con anticuerpos AF488 anti-GRP78 (clona: C38), AF700 anti-CD45 (clona: HI30), APC anti-CD34 (clona: 561) y violeta brillante 421 anti-

CD184 (clona: 12G5) por 30min, en frío. Las células fueron lavadas 2 veces con PBS1x, SFB 3% para ser adquiridas en el citómetro CytoFLEX LX (Beckman Coulter). La colección de datos y el análisis se realizó mediante el software CytExpert.

ENSAYO DE XENOTRASPLANTE

Para evaluar la capacidad de diseminación de las células leucémicas; 250,000-500,000 células sGRP78+ fueron separadas mediante el uso de *FACS Aria III*, y fueron colocadas en 100uL de RPMI con 100uL de matrigel, la suspensión fue infundida subcutáneamente en el dorso de cada ratón de la cepa BALB/c nude (n=3). Los ratones fueron examinados diariamente y luego de 3 semanas posterior al xenotrasplante, se obtuvieron células de la médula ósea y del ganglio linfático, las cuales fueron analizadas por citometría de flujo. El análisis multiparamétrico se llevó a cabo sobre la región CD45+ humano y se analizaron los siguientes marcadores; GRP78, CD34 (581) y CXCR4 (12G5).

DETERMINACIÓN DE NIVELES DE ISM1 EN PLASMA

Los niveles de SM1 fueron evaluados en plasma obtenido de médula ósea y de sangre periférica mediante ELISA sandwich utilizando el kit BioLegend's LEGEND MAX™. El ensayo se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La absorbancia se determinó a 450nm en los primeros 30min.

EVALUACIÓN DE APOPTOSIS

Para el ensayo de apoptosis, se colocaron 250,000 células/pozo de la línea celular SupB15, en placas de 24 pozos en medio IMDM suplementado con 5% SFB y se incubaron por 24h a 37°C, 5% CO₂, con PBS 1X ó 2000pM, 4000pM, 6000pM y 20ng/uL de ISM1 recombinante (ISM1r). Luego se realizó una tinción multiparamétrica con anticuerpo anti-Anexina (BV510), las muestras fueron adquiridas en el citómetro CytoFLEX LX (Beckman Coulter). La colección de datos y el análisis se realizó mediante el software CytExpert.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron analizados usando el software Prism V3.02 (GraphPad). La diferencia entre los grupos fue establecida mediante pruebas no paramétricas considerando valores significados aquellos con valor de <0.05 .

10. RESULTADOS

UNA ALTA PROPORCIÓN DE CÉLULAS LEUCÉMICAS DE MÉDULA ÓSEA EXPRESAN GRP78 EN LA SUPERFICIE.

En el presente estudio se incluyeron 43 pacientes con LLA-B al diagnóstico; el 42% fue de riesgo estándar de acuerdo y el 58% de riesgo alto, el porcentaje de pacientes femeninos y masculinos fue del 24% y 18%, y del 32% y 26%, respectivamente. Los rangos de edad fueron de 1-7 años para el grupo de RE y de 2-17 años para el de AR. El conteo leucocitario en RE fue de $\leq 50 \times 10^3$ Leucos/uL y 60-97% de blastos en MO mientras que de RA fue de $> 50 \times 10^3$ Leucos/uL y 56-100% (Tabla 1).

Tabla 1. Características de los pacientes LLA-B.

	Riesgo Estándar (n=18)	Riesgo Alto (n=25)
Edad (años)	1-7	2-17
Sexo (%)		
F	24	32
M	18	26
Leucocitos (uL)	$\leq 50 \times 10^3$	$> 50 \times 10^3$
Alteraciones genéticas (%)	18.75	--
Blastos (%)	60-97	56-100

Se evaluó la expresión de GRP78 en la superficie de 3 líneas celulares de leucemia linfoblástica aguda; RS4;11, Reh y SUP-B15 mediante citometría de flujo (Fig. 5A). En las líneas celulares se observó que la expresión de sGRP78 en las células SUP-B15 fue del 90% mientras que en las líneas celulares Reh y RS4;11, sGRP78% solo se expresó en un 1% (Fig.5B), sugiriendo que la expresión de sGRP78 varía de acuerdo con la línea celular leucémica evaluada. Para analizar la presencia selectiva de sGRP78 en células leucémicas,

se tiñeron células de MO de pacientes pediátricos con LLA-B al diagnóstico y se compararon con células de médula ósea de individuos control (MO-CTL) (Fig. 5C-D). Se observó una elevada proporción de células CD45+ sGRP78 en los individuos LLA-B con respecto a los individuos CTL (Fig. 5D), la cual fue estadísticamente significativa $p < 0.0001$.

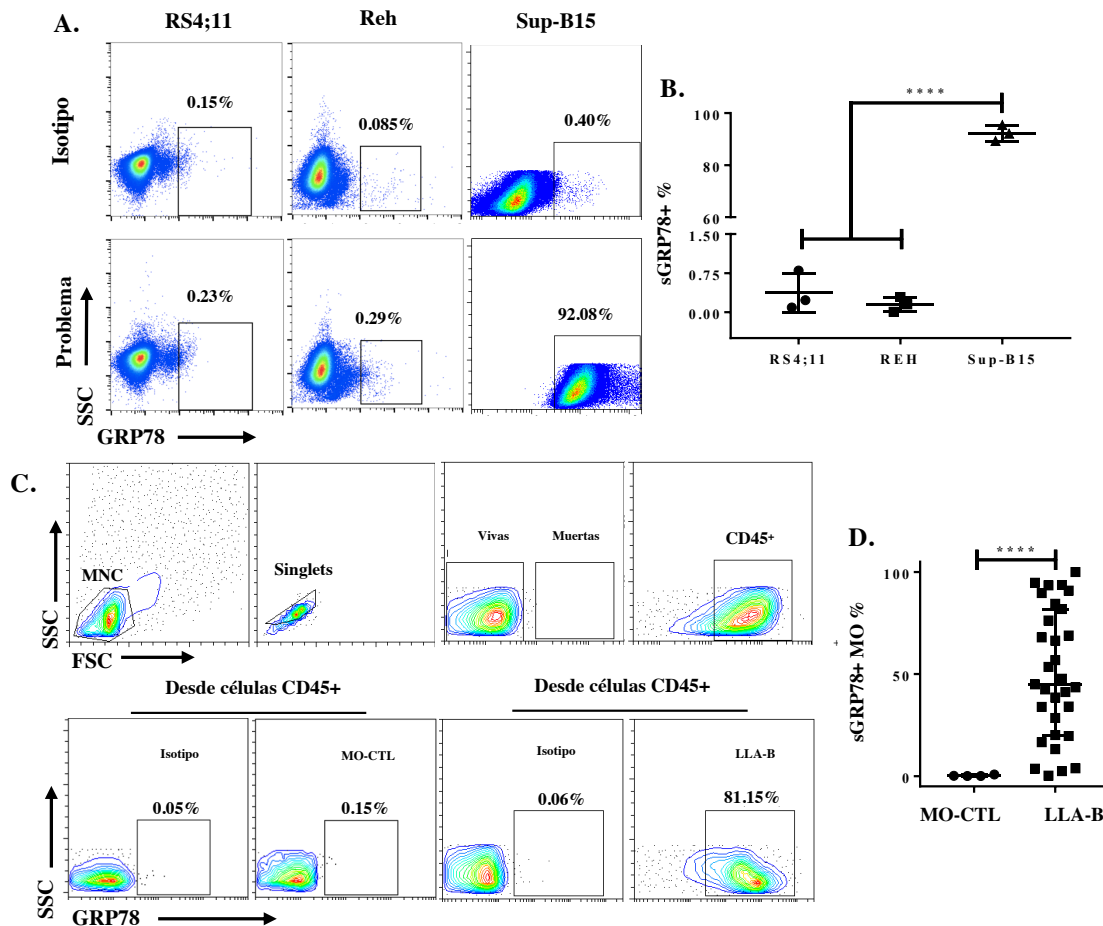


Fig. 5. Expresión de sGRP78 en células de médula ósea de pacientes pediátricos con LLA-B de reciente diagnóstico y líneas celulares de leucemia linfoblástica aguda. (A) Tinción superficial con anticuerpo anti-GRP78 en 3 líneas celulares de leucemia linfoblástica aguda; RS4;11, Reh y SUP-B15. (B) Se muestra la representación estadística de las células sGRP78+ en las líneas de células leucémicas evaluadas (n=3), el análisis estadístico se realizó mediante ANOVA unidireccional, $p < 0,0001$. (C) Estrategia de selección para el análisis de células sGRP78+ en células mononucleares (MNC) de médula ósea de individuos pediátricos con LLA-B versus células de médula ósea de individuos control (MO-CTL). (D) Representación estadística de las células sGRP78+ en MO-CTL (n = 4) y B-ALL (n = 43). El análisis estadístico se realizó mediante la prueba U de Mann-Whitney de dos colas, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Posteriormente se estratificó a los pacientes LLA-B de acuerdo con el riesgo tomando en cuenta la edad, el conteo de blastos y leucocitos al diagnóstico y se analizó si la presencia de las células sGRP78+ se asociaba al riesgo, en donde se observó una mayor proporción de células sGRP78+ en pacientes con RE y RA comparado con el grupo CTL ($p=0.01$ y $p=0.05$, respectivamente) (Fig. 6A), sin embargo no se observó asociación de la presencia de células sGRP78+ con estado de diferenciación, el porcentaje de blastos o el conteo leucocitario en SP (Fig. 6B-D).

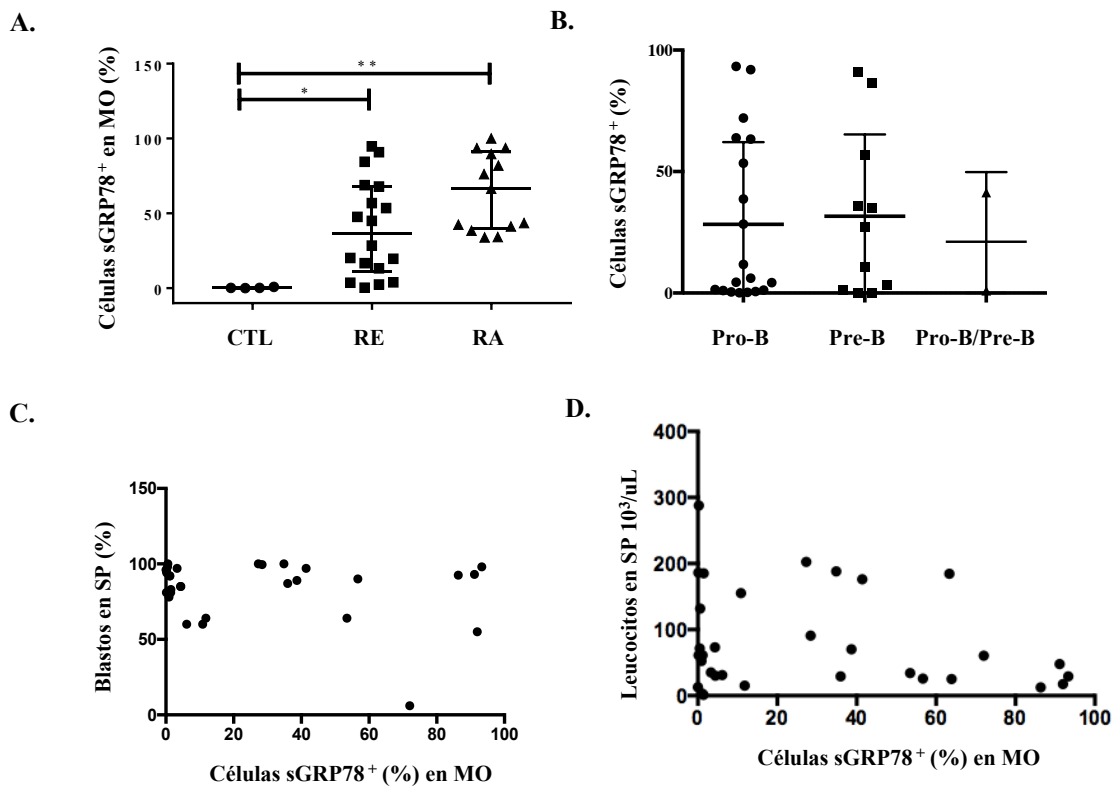


Fig. 6. Análisis de la población sGRP78+ de acuerdo con el riesgo, blastos y leucocitos al diagnóstico.

(A) Se evaluó la asociación de células sGRP78+ en MO de acuerdo con el riesgo, el estado de diferenciación (B), la presencia de blastos en SP (C) y el número de leucocitos en SP (D). El análisis estadístico se realizó mediante la prueba U de Mann-Whitney de dos colas, * $p < 0,01$, ** $p < 0,05$.

LOS INDIVIDUOS CON LLA-B DE ALTO RIESGO PRESENTAN CÉLULAS sGRP78+ CON EXPRESIÓN DE MARCADORES CD34, CD38, CD10 Y CXCR4

Para caracterizar la población sGRP78+ en la LLA-B, se realizó una tinción multiparamétrica con anticuerpos contra GRP78 y marcadores utilizados en el diagnóstico de la leucemia por citometría de flujo: CD34, CD38, CD19, CD10 y CXCR4, en células MNC obtenidas de MO (Fig.7).

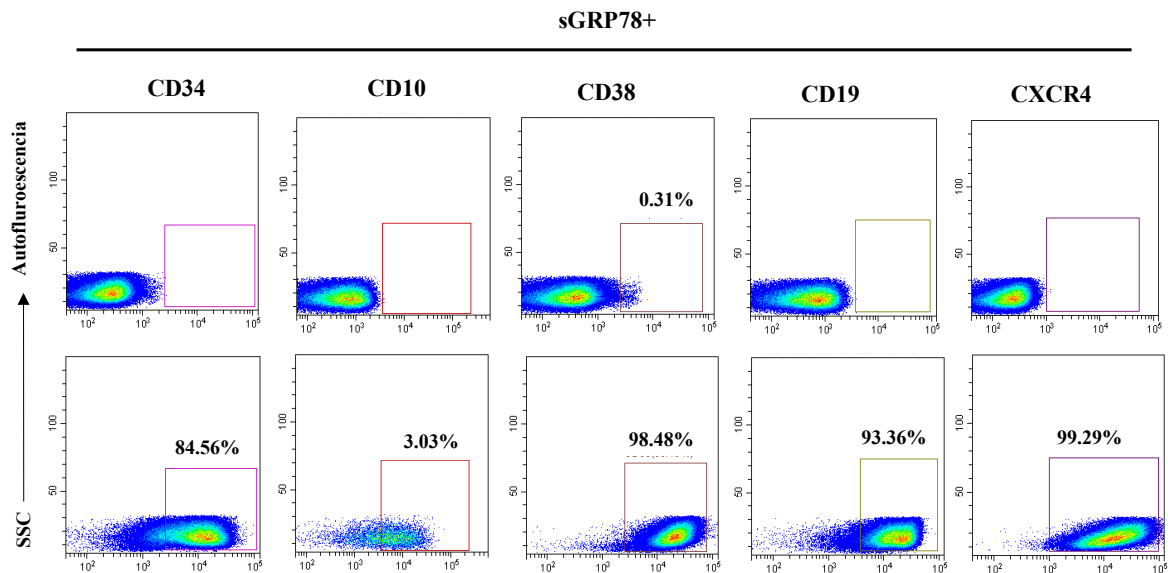


Fig. 7. Tinción multiparamétrica de la coexpresión de células sGRP78+ con los marcadores CD34, CD10, CD38, CD19 y CXCR4. (A) Figura representativa de la tinción superficial de células de MO de pacientes LLA-B con anticuerpos anti-GRP78, anti-CD34, anti-CD10, anti-CD38, anti-CD19 y anti-CXCR4. La imagen fue obtenida con el software de análisis CytExpert.

La presencia de células positivas para más de un marcador fue corroborada por la técnica de microscopía de flujo, para GRP78 y CD34 en dos pacientes LLA-B, uno de RA y otro de RE. En donde se observó una población mayor de células sGRP78+ CD34+ en MO en el paciente de RA con respecto al paciente de RE (70.7% vs 23.8%) (Fig. 8A,B).

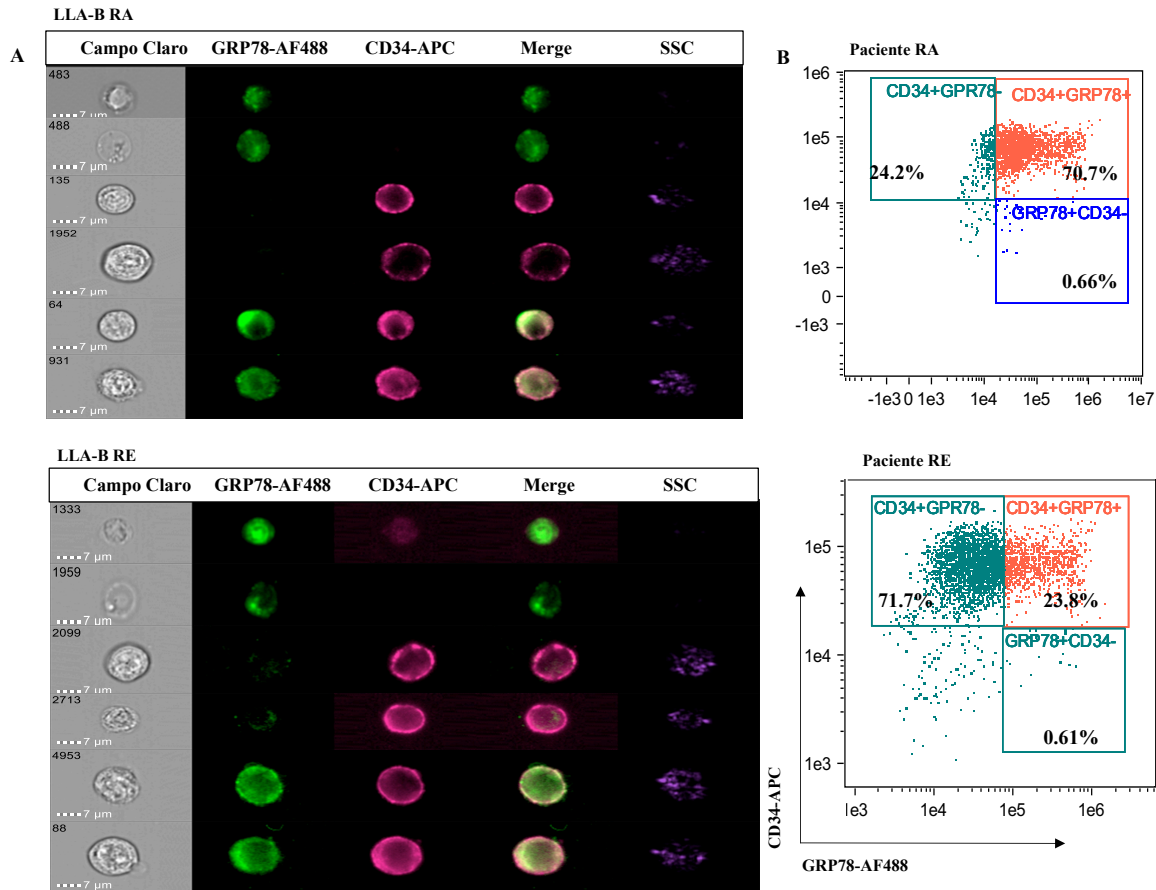


Fig. 8. Evaluación de células sGRP78+ CD34+ de MO de pacientes de RA y RE. (A) Imagen de células de médula ósea de un paciente de RA y uno de RE obtenida mediante microscopia de flujo y analizada con el software Amnis II. (B) Porcentaje de la población sGRP78+ CD34+ obtenida en ambos pacientes.

Al realizar el análisis gráfico de los datos previamente obtenidos: CD34, CD38, CD10 y CD19 en la población sGRP78+, se observó que la proporción de células sGRP78 que coexpresan CD34, CD38 CD10 y CXCR4 es mayor en el grupo RA con respecto al RE ($p < 0.01$, $p < 0.05$, $p < 0.001$, $p < 0.01$, respectivamente), sin embargo, no se observaron diferencias en la proporción de células CD19+ sGRP78 entre los grupos (Fig. 9 A-E).

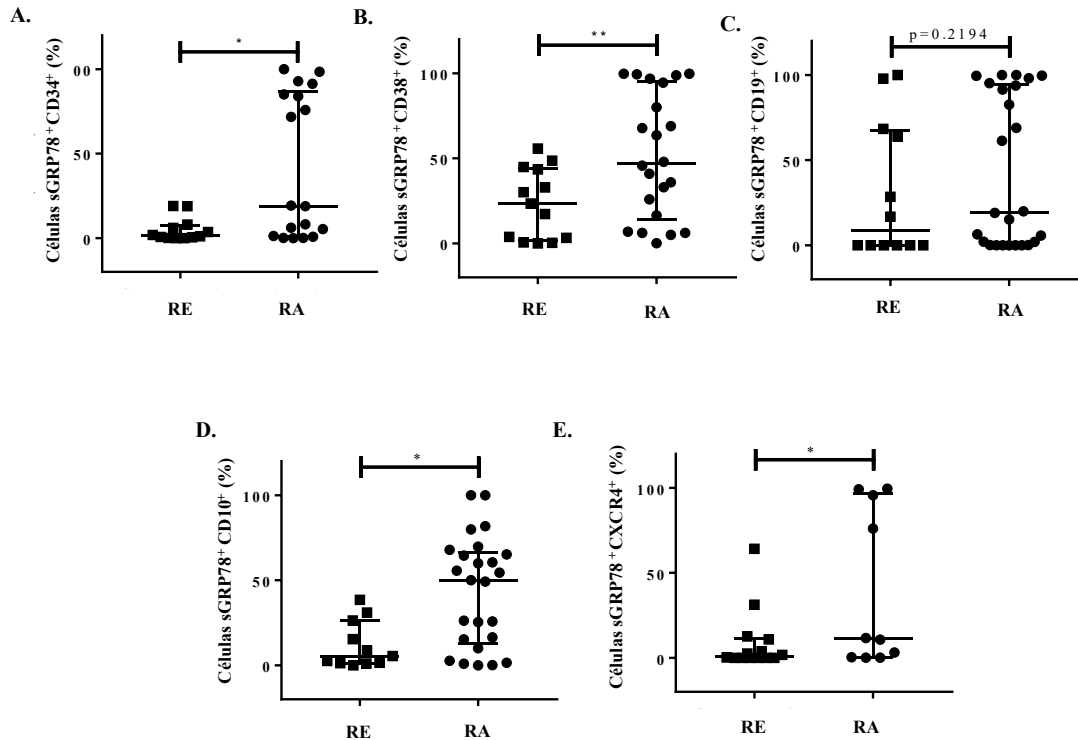


Fig. 9. Gráfica de la población sGRP78+ CD34+, CD38+, CD10+, CD19+ y CXCR4+ de acuerdo con el riesgo. (A-E) Evaluación de células sGRP78+ con los marcadores CD34+, CD38+, CD10+, CD19+ y CXCR4+, obtenidas de MO de pacientes LLA-B de RE. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba U de Mann-Whitney, * $p < 0.01$, ** $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$.

ANÁLISIS DE ALTA DIMENSIÓN DE LA POBLACIÓN sGRP78+ CON LOS MARCADORES CD34, CD38, CD10 Y CXCR4 EN LA MISMA CÉLULA, DE ACUERDO CON EL RIESGO DE LOS PACIENTES LLA-B.

Ya que se había observado una expresión diferencial de más de un marcador en la población LLA-B de MO entre ambos riesgos por citometría de flujo multiparamétrica, se decidió visualizar mediante la prueba t-SNE la expresión de todos los marcadores (CD34, CD38, CD10, CD19 y CXCR4) en la misma célula en la población sGRP78+. Se analizaron los componentes celulares en MO de 5 pacientes de RE y 6 de RA. Se generaron grupos de acuerdo con los niveles de expresión de los marcadores analizadas. De los 10 grupos generados, dos

mostraron los niveles más altos de expresión de sGRP78, el grupo 2 y el 9, representando el 34.26% y 17.41% de todas las células analizadas, respectivamente (Fig. 10A). Ya que el grupo 2 fue el más destacado de los 10 grupos generados, se analizó la distribución de este en las muestras observándose que se encontraba asociados en las muestras de riesgo alto (Fig. 10B). Por otro lado, el grupo 9 estuvo asociado a las muestras de riesgo estándar (Fig. 10B). La distribución de los marcadores individuales a lo largo de las muestras confirmó que sGRP78, CXCR4, CD10 y CD19 se encontraban enriquecidos en el grupo 2 en comparación del grupo 9. Mientras que CD34 y sGRP78 estuvieron en el grupo 9 con niveles de expresión bajos de CXCR4 (Fig. 10C). Además, en otros 3 grupos se observaron niveles elevados de CD38 con baja expresión de CD34 (grupos 3, 8 y 10), dos de ellos con poca o casi nula expresión de sGRP78 (grupo 3 y 8), los cuales fueron observados solamente en las muestras de pacientes de riesgo estándar (Fig. 10C).

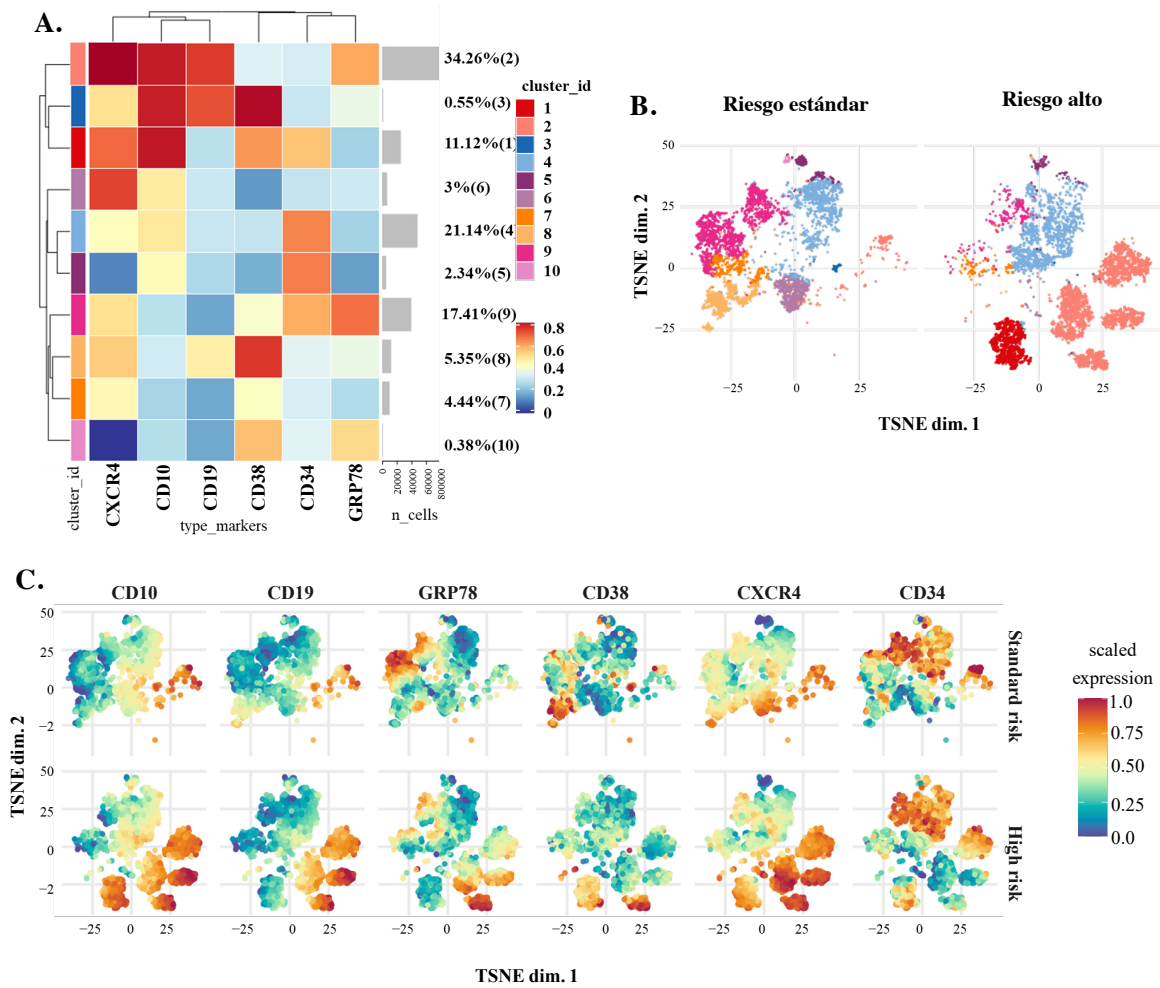


Fig. 10. Reducción dimensional de los datos de citometría de flujo de pacientes con LLA estándar y de alto riesgo. (A) Organización de grupos y mapa de calor de las intensidades de marcador medianas de los marcadores de linaje y sGRP78. (B) t-SNE basado en los 10 clústeres obtenidos por FlowSOM que comparan el grupo de RE vs RA. (C) Grupos de expresión de cada marcador por grupo de riesgo. Los mapas de calor se construyeron utilizando herramientas de análisis de datos de citometría (CATALYST). <https://bioconductor.org/packages/3.10/bioc/html/CATALYST.html>.

LAS CÉLULAS LEUCÉMICAS CIRCULANTES EXPRESAN sGRP78 Y CXCR4

Ya que las células leucémicas tienen la capacidad de migrar de médula ósea a otros tejidos periféricos, se evaluó si las células sGRP78+ podrían encontrarse en sangre periférica en los pacientes. Por lo que se evaluó la presencia de sGRP78 mediante citometría de flujo en muestras de SP de pacientes LLA-B al diagnóstico y en SP de individuos CTL. Se observó la presencia de células sGRP78+ circulantes en SP de individuos con LLA-B, la cual fue significativamente mayor con respecto a los individuos CTL ($p=0.01$) (Fig. 11A,B). Al estratificar por grupo de riesgo en los pacientes con LLA-B, se observó que la frecuencia de la población sGRP78+ en circulación, es mayor en el grupo de RA vs CTL ($p=0.01$) (Fig.11C). Debido a que CXCR4 es un receptor que confiere migración celular se evaluó su expresión en la población sGRP78+ y se observó que la proporción de células CXCR4+ sGRP78+ es mayor en los individuos LLA-B de RA con respecto a los LLA-B RE ($p=0.01$) (Fig. 11D,E).

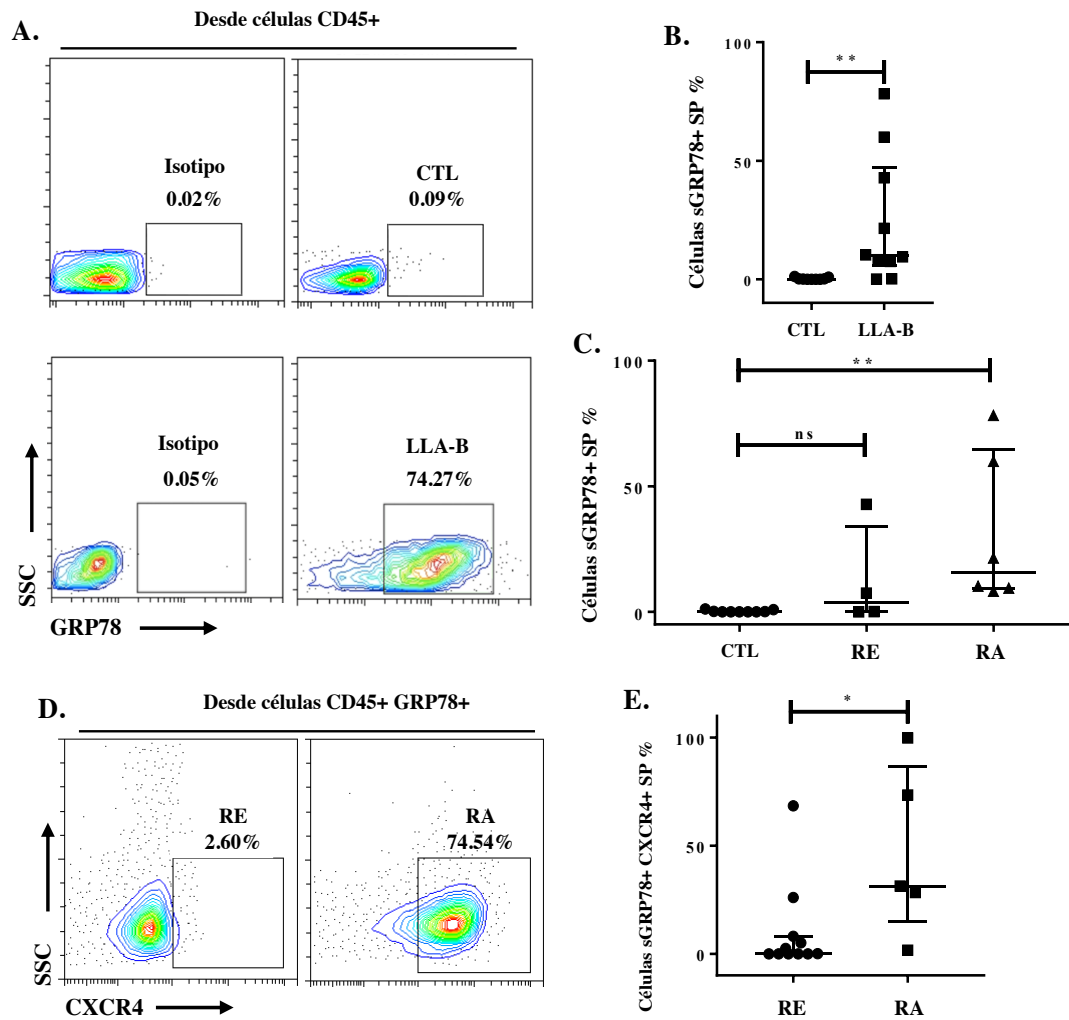


Fig. 11. Las células sGRP78+ CXCR4+ están presentes en la sangre periférica de pacientes pediátricos con LLA-B recién diagnosticada. (A) Células vivas de SP de pacientes con LLA-B y CTL se tiñeron con anti-CD45 y anti-GRP78. (B) Representación estadística de células sGRP78+ en pacientes y controles con LLA-B. (C) Se representan los porcentajes de células sGRP78+ de acuerdo con el riesgo. (D) Las células vivas de SP se tiñeron con anticuerpos anti-CD45, anti-GRP78 y anti-CXCR4. Se representan los gráficos de un paciente RE (izquierda) y un paciente de RA (derecha). (E) Gráfica de la proporción de células sGRP78+ CXCR4+ en RA y RE en SP. Datos son las medianas más los rangos. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba U de Mann-Whitney de dos colas, **p < 0,01, ***p < 0,001.

EVALUACIÓN DE CÉLULAS LEUCÉMICAS sGRP78+ EN UN MODELO DE XENOTRASPLANTE

Debido a los resultados anteriores en donde se observó la presencia de células sGRP78+ CXCR4+ en muestras de pacientes de alto riesgo, tanto en médula ósea como en sangre periférica, se decidió evaluar si estas pudieran migrar y diseminarse. Se infundieron 500,00 células de MO totales vía subcutánea, teñidas con colorante vital DiL, de un paciente con LLA-B de RA en un ratón BALB/c/nuce y luego de 4 semanas se evaluó la presencia de estas células en médula ósea y ganglios linfáticos del ratón, se observó que éstas eran viables y se localizaban tanto en ambos sitios (Fig. 12).

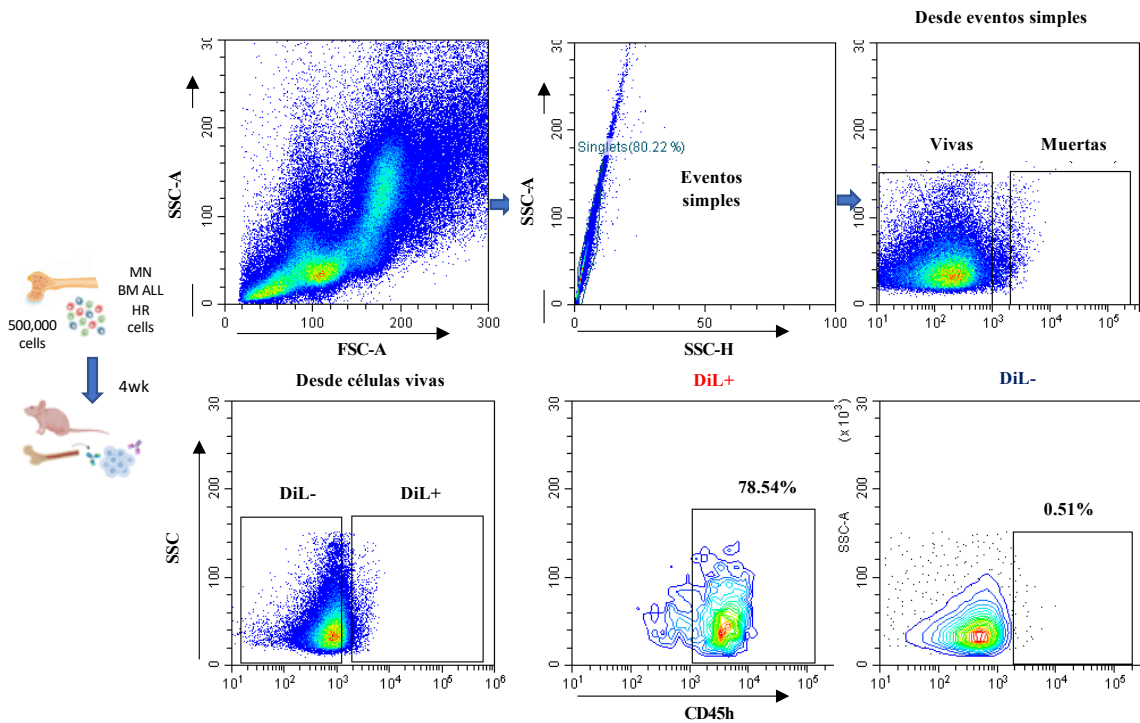


Fig. 12. Estrategia experimental de células humanas de MO un paciente LLA-B infundidas vía subcutánea en un ratón BALB/c. Se observaron células CD45h+ vivas y positivas para el colorante de viabilidad DiL, en la médula ósea del ratón, luego de ser infundidas vía subcutánea, a las 4 semanas.

Se realizó un ensayo para evaluar la especificidad de los anticuerpos anti humano; anti-GRP78, anti-CXCR4 y anti-CD34 en células de médula ósea de ratones BALB/c (Fig. 13).

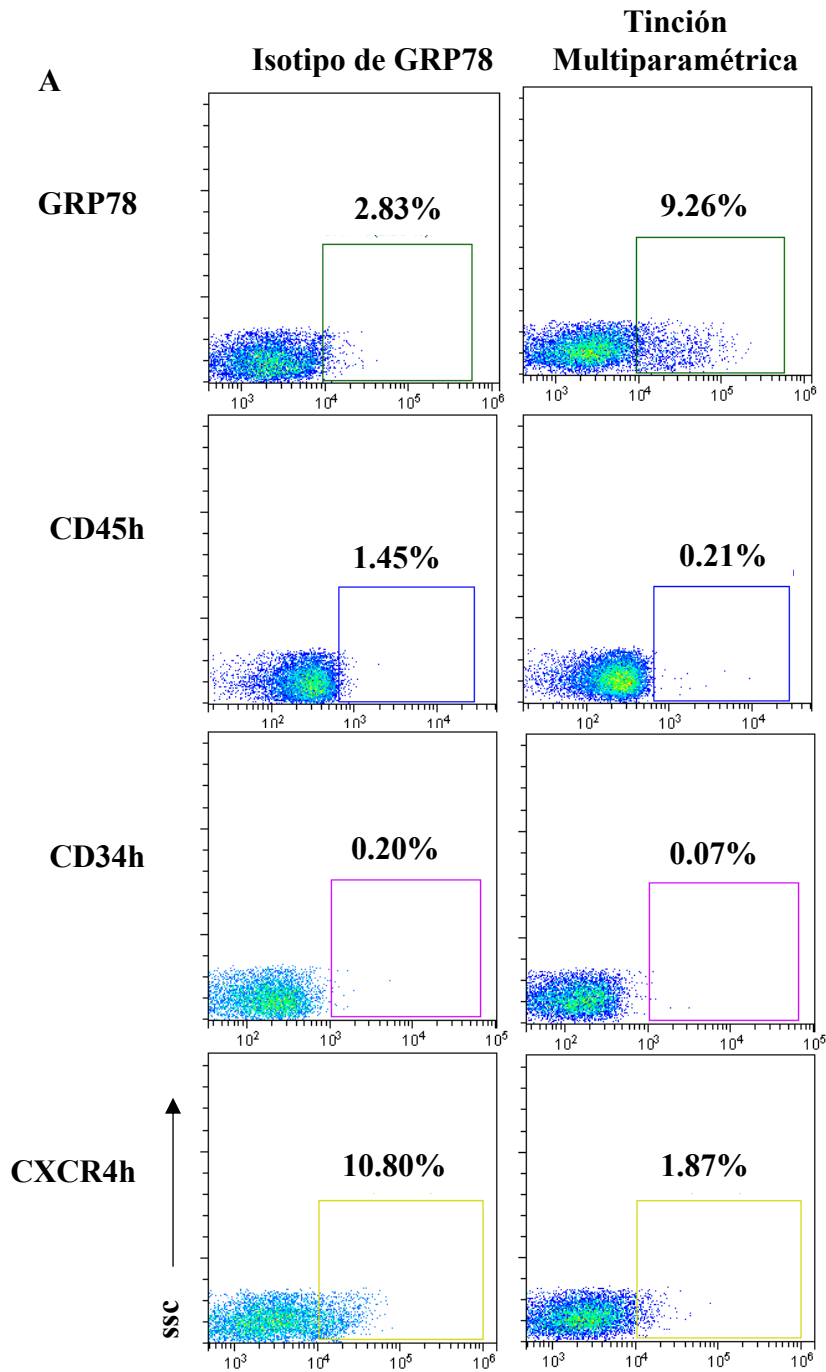


Fig. 13. Evaluación de los anticuerpos antihumano anti-GRP78, CD45, CD34 y CXCR4 en células de médula ósea de ratón BALB/c. (A) Se incubaron 3×10^5 células de MO de ratones BALB/c y se tiñeron con anticuerpos antihumano (GRP78, CD45, CD34 y CXCR4).

Para evaluar la capacidad de migración de las células sGRP78, se purificaron células sGRP78+ vivas de pacientes con LLA-B de RA mediante citometría de flujo acoplada a sort y se infundieron vía subcutánea en ratones BALB/c nude (Fig. 14A). Luego de 3 semanas del xtrasplante se analizó la población de células hematopoyéticas humanas sobre la región CD45 humano (CD45h) en células obtenidas de médula ósea y ganglio de los ratones, y sobre esta la expresión de GRP78, CXCR4 y CD34 (Fig. 14B-D). Del 60-100%- de las células humanas recuperadas expresaban sGRP78+, tanto en MO como en ganglio (Fig. 14E,G). Mientras que la proporción de células que expresaban CD34 fue >10% en MO y en gánglio del 40-60%. En relación a CXCR4, los niveles de expresión en MO fueron del 15-100% en MO y del 5-20% en ganglios (Fig. 14E,G).

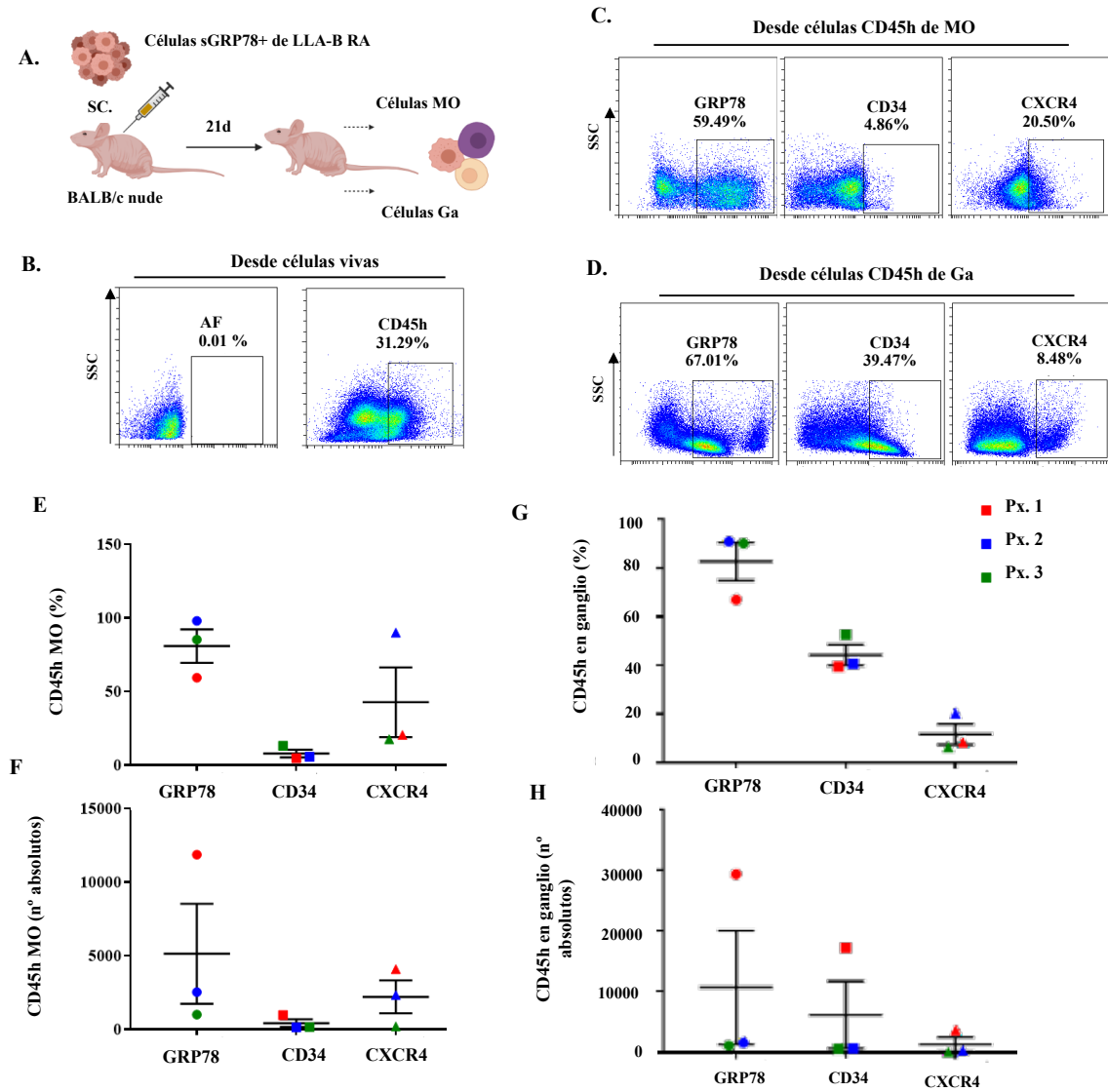


Fig. 14. Células sGRP78+ de pacientes LLA-B RA infundidas vía subcutánea en ratones desnudos BALB/c son capaces de migrar a MO y ganglios. (A) Estrategia experimental del ensayo de xenotrasplante. (B-D) Evaluación de células recuperadas de MO y ganglio de ratones BALB/c, sobre la región CD45 humano (CD45h) y la proporción de los marcadores GRP78, CD34 y CXCR4, en esta población. (E,F) Representación gráfica en porcentajes y números totales de células GRP78, CD34 y CXCR4 evaluadas sobre la población CD45h recuperadas de MO de los ratones BALB/c. (G,H) Representación gráfica en porcentajes y números totales de células GRP78, CD34 y CXCR4 evaluadas sobre la población CD45h recuperadas de ganglios de los ratones BALB/c, luego de 3 semanas.

DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE ISTHMIN 1 (ISM1) EN PACIENTES LLA-B

De los ligandos endógenos que activan la apoptosis vía sGRP78, ISM1 es expresado por células del sistema inmune (NK) y los niveles de esta no han sido descritos en la LLA. Se detectaron los niveles de ISM1 mediante el ensayo de Elisa Sandwich, en muestras plasma de SP y MO de pacientes pediátricos con LLA-B al diagnóstico y de SP de individuos control. Se observó que los niveles de ISM1 en SP de los pacientes LLA-B se encontraban disminuidos en comparación con los niveles de ISM1 en individuos sanos (Fig.15A). Se correlacionó la proporción de células sGRP78+ con los niveles de ISM1 en MO de pacientes LLA-B y se observó una correlación negativa ($r = -0.55$) (Fig.15B).

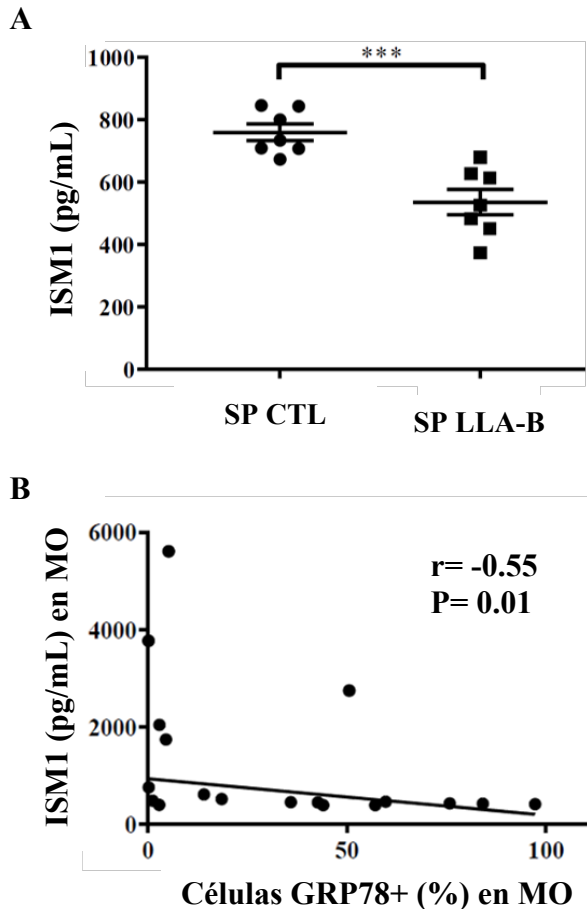


Fig. 15. Determinación de los niveles de ISM1 de individuos LLA-B e individuos sanos, en sangre periférica. (A) Gráfica comparativa de los niveles de ISM1 de pacientes LLA-B vs CTL, mediante la prueba de t-student, $p < 0.05$. (B) Análisis de correlación entre la proporción de células sGRP78+ con los niveles de ISM1, en MO de pacientes LLA-B (prueba de spearman, $r = -0.55$, $p = 0.018$).

EVALUACIÓN APOPTOSIS EN CÉLULAS SGRP78+ MEDIANTE ISM1 RECOMBINANTE (ISM1R)

Para evaluar el efecto potencial de apoptosis de ISM1 sobre células GRP78+ se realizó un ensayo exploratorio en células de la línea celular Sup-B15 incubadas con ISM1r con diferentes concentraciones (2000pM, 4000pM 6000pM y 20ng/uL), durante 24h. Posteriormente, las células fueron teñidas contra anexina y analizadas por citometría de flujo (n=2) (Fig.16 A). De las concentraciones evaluadas solo se observó mayor proporción de células anexina positivas con 20ng/uL comparado con las células CTL ($p < 0.0001$) (Fig. 16B).

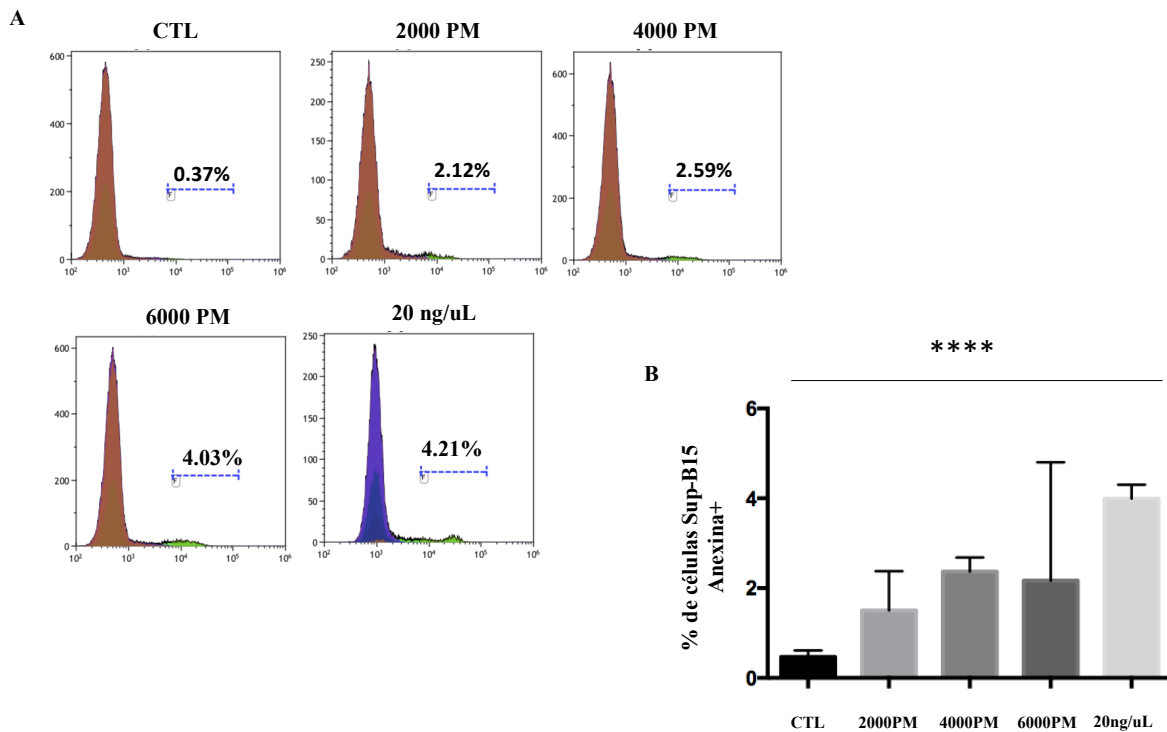


Fig. 16. Ensayo de apoptosis en células Sup-B15 tratadas con ISM1 recombinante. (A) Histograma de células Sup-B15 tratadas con PBS1X, 2000PM, 4000PM, 6000PM y 20ng/uL de ISM1r, durante 24h. (B) Gráfica de los porcentajes de células Sup-B15 anexina positivas. One way ANOVA $p < 0.0001$.

11. DISCUSIÓN

Recientemente se ha observado que GRP78 juega un papel importante en la supervivencia y muerte en células tumorales (56,98). De manera interesante, se ha señalado que GRP78 es un marcador de superficie celular (sGRP78) en las células tumorales tipo troncal (90). Además sGRP78 ha sido asociado con la recaída a la enfermedad en la leucemia mieloide sugiriendo que su presencia juega un rol en el mantenimiento de las células leucémicas en esta enfermedad (99).

Sin embargo, se desconoce si sGRP78 puede estar relacionado a la leucemia linfoblástica aguda infantil al diagnóstico y si pudiera funcionar como potencial blanco terapéutico. Utilizando citometría de flujo multiparamétrica, en el presente trabajo se investigó la presencia de GRP78 en la superficie de líneas celulares de leucémica aguda y se confirmó que sGRP78 se encontraba enriquecida en la línea celular Sup-B15 como se había observado por análisis proteómico (100), sólo una pequeña proporción en las líneas celulares Reh y RS4;11 expresan sGRP78, sugiriendo que las características particulares de cada línea pueden influir en la expresión de GRP78 a la membrana celular. Dado que la línea celular Sup-B15 fue establecida de un paciente con recaída secundaria, se hipotetizó que sGRP78 podía estar asociado con la leucemia de alto riesgo.

En este estudio se encontró que la mayoría de las muestras de MO analizadas contenían una fracción celular con elevada proporción de células sGRP78+ que, al estratificar por riesgo al paciente, esta población se asoció a riesgo alto.

Lo anterior, como en otros estudios, podría reflejar la respuesta de la vía UPR en las células leucémicas, las propiedades de agresividad y resistencia al tratamiento así como el desenlace a recaída, como ha sido observado en otros tipos de cáncer (101,102). Además, puede indicar que las células sGRP78+ pueden ser seleccionadas para sobrevivir una vez que el tratamiento es iniciado (103,104).

Los resultados aquí presentados sugieren que la presencia de sGRP78 puede estar intrínsecamente asociada con los estados tempranos en la leucemia. Adicionalmente, la expresión de sGRP78 está ligada a la supervivencia de las células troncales hematopoyéticas

y se ha propuesto como un regulador de pluripotencialidad y oncogénesis en otros tipos celulares (90,99). Al evaluar la presencia de marcadores del desarrollo de células B, tales como, CD34, CD38 y CD10 en conjunto con sGRP78, se encontró que las células sGRP78+ de los pacientes de alto riesgo coexpresan dichos marcadores de manera significativa comparadas con las obtenidas de los pacientes de riesgo estándar, lo que sugiere que los pacientes de alto riesgo tienen proporciones mayores de células leucémicas sGRP78+ primitivas potenciales que pueden representar una leucemia linfoblástica aguda de células precursoras de linfocitos B (105). Con el uso de la citometría de flujo combinada con un análisis dimensional alto, observamos un grupo distintivo de células que son CD10+ CD19+ CXCR4+ sGRP78+ (grupo 2) asociado con leucemia infantil de alto riesgo al momento del diagnóstico. Además, un grupo distintivo (grupo 9) observado en el grupo de riesgo estándar compartió marcadores leucémicos como CD34 y sGRP78, con baja expresión de CXCR4. Por lo tanto, por primera vez se mostró que la presencia tanto de sGRP78 como de CXCR4 está asociada con la leucemia de alto riesgo al momento del diagnóstico, pero no con la leucemia de riesgo estándar.

Además, se observaron dos grupos con CD38 elevado, pero CD34 bajo en el grupo de riesgo estándar (grupo 3 y 8), curiosamente ninguno de ellos mostró una expresión marcada de sGRP78. Este hallazgo respalda datos previos que indican que el subconjunto CD38+ CD34- se asocia con un mejor pronóstico en la LLA-B (106).

Al evaluar si las células LLA sGRP78 se encontraban en circulación se observó que las células sanguíneas de pacientes con leucemia también expresaban sGRP78, sin que esto estuviera asociado al número de blastos o al número de leucocitos presentes al diagnóstico. El subconjunto de células sGRP78+ CXCR4+ se enriqueció en el grupo de alto riesgo de forma similar a los hallazgos observados en las células de médula ósea. Por lo tanto, la presencia de células sanguíneas leucémicas sGRP78+ CXCR4+ puede indicar que este subconjunto podría invadir tejidos periféricos como se ha observado en tumores sólidos (107,108).

Ya que GRP78 facilita la invasión y establecimiento de células cancerosa, se analizó si las células leucémicas sGRP78+ podían diseminarse en un modelo de xenotrasplante (109). Se

encontró que las células sGRP78+ inyectadas subcutáneamente migraron y sobrevivieron, por al menos, 3 semanas en los ratones trasplantados, también fueron detectadas en médula ósea y ganglios. Aunque los porcentajes y los números absolutos de células recuperadas de los xenoinjertos fueron mixtos, probablemente debido a cambios en el fenotipo de las células trasplantadas o capacidades migratorias alteradas influenciadas por el eje CXCL12/CXCR4 (110,111); la mayoría de las células CD45+ humanas vivas mantuvieron la expresión de sGRP78 y una proporción menor mantuvo la expresión de CD34 y CXCR4. Aunque se han utilizado varios modelos de ratón para analizar la capacidad de diseminación, localización y formación de tumores de las células leucémicas (112), los resultados también respaldan que los ratones inmunodeficientes desnudos BALB/c podrían usarse para estudiar el proceso de diseminación de la leucemia aguda mediante inyección subcutánea.

En conjunto, proponemos que sGRP78 es un marcador de superficie probablemente asociado con el fenotipo migratorio y similar a un fenotipo tipo troncal de las células leucémicas de pacientes pediátricos con LLA-B al momento del diagnóstico. Por lo tanto, la evaluación de los marcadores sGRP78, CXCR4 junto con CD10 y CD19 en muestras pediátricas leucémicas al momento del diagnóstico podría contribuir a una mejor categorización de la leucemia pediátrica de riesgo alto y estándar. Se debe evaluar más a fondo si la presencia de células leucémicas sGRP78+ CXCR4+ podría conducir a un mayor riesgo de recaída, como ocurre en pacientes con leucemia mieloide que expresan altos niveles de transcritos de GRP78 (99,109). Finalmente, la presencia de sGRP78 en células cancerosas y su ausencia o baja expresión en células normales, lo convierte en un potencial blanco terapéutico. Existe evidencia que muestra que GRP78 confiere propiedades de resistencia a múltiples fármacos a las células cancerosas, por lo que la eliminación de células sGRP78+ podría mejorar los tratamientos para la leucemia infantil (113).

Finalmente, sGRP78 es capaz de unir proteínas ligando, activando vías de supervivencia y proliferación (α 2M y Cripto) o vías de apoptosis (Par-4 y Kringle 5) (Ni et al., 2011). En este contexto se ha reportado que la proteína de secreción de 60kDa, ISM1, la cual es producida por células NK y NKT, puede interactuar con GRP78 en membrana plasmática (87,114), durante esta interacción se ha observado la activación de apoptosis en células tumorales, a través de la disfunción mitocondrial. Por lo tanto evaluar la vía ISM1-GRP78

puede ser un potencial blanco en la terapia tumoral (88). En diversos estudios se ha observado que la proteína ISM1 inhibe la formación de la red de capilares en células endoteliales, interfiriendo con los estadios iniciales de angiogénesis en matrigel *in vitro*. La sobre expresión en línea celular de melanoma, B16, inhibe el crecimiento tumoral y la angiogénesis en ratón. Sin embargo en condiciones fisiológicas el papel de esta molécula no ha sido evaluada. En este trabajo, mediante el uso del ensayo de Elisa sandwich, se evaluaron los niveles fisiológicos en plasma de individuos pediátricos control, los cuales fueron de 673-845pg/mL, en plasma de sangre periférica individuos LLA-B se observó una tendencia a la disminución, aunque en algunos pacientes los valores se encontraron aumentados (451-3839pg/mL), mientras que en médula ósea estos individuos presentaron niveles con una reducción mayor 396-5611pg/mL, sin embargo como en sangre periférica, algunos individuos presentaron un aumento. El papel de ISM1 circulante no ha sido descrito y por primera vez se observan los niveles fisiológicos de la proteína en circulación por lo que su evaluación puede ser de utilidad como parte del diagnóstico. A diferencia de otros estudios en donde se ha observado un aumento en el porcentaje de células en apoptosis mediante la incubación con ISM1r (115), en el presente trabajo no se pudo observar ese efecto, sin embargo las células utilizadas en este trabajo tienen una alta expresión de sGRP78 por lo que las concentraciones utilizadas pudieran no ser suficientes para activar la vía apoptótica, además de explorarse por vez primera en el contexto leucemogénico.

Por primera vez se muestra la presencia de GRP78 en la leucemia linfoblástica aguda infantil, tanto en células de médula ósea como de sangre periférica, lo cual puede contribuir a un enriquecimiento en los marcadores utilizados para el diagnóstico de la enfermedad. Por otro lado, la presencia en sangre periférica puede hacer el diagnóstico menos invasivo para los pacientes. Ya que estas células son capaces de migrar a otros tejidos en un modelo de ratón, se sugiere que podrían estar participando en la recaída de la enfermedad ya que en otros modelos se ha observado que esta población es seleccionada por la quimioterapia y son resistentes a esta. Es el primer estudio en donde se observan niveles fisiológicos de la proteína Isthmin 1 en individuos sanos y con LLA-B, en donde se observó una disminución de estos, lo cual sugiere un papel en la homeostasis por lo que es necesario continuar con estudios sobre esta proteína. Aunque no se observó apoptosis mediada por Isthmin, recientemente se han

evaluado otros mecanismos de eliminación mediante GRP78 como blanco en el contexto de leucemia mieloide, por lo que la evaluación de esta sigue siendo relevante. Sin embargo, es necesario realizar el estudio en un mayor número de muestras.

12. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos muestran que sGRP78 es una proteína que puede utilizarse en el estudio y estratificación de pacientes con LLA-B al diagnóstico, tanto en médula ósea como en sangre periférica. Además, las células sGRP78+ comparten características con marcadores de troncalidad y de migración a través de CD34 y CXCR4, por lo que su papel en el desarrollo y progresión de la leucemia debe ser estudiado.

13. PERSPECTIVAS

1. Evaluar la presencia de GRP78 en la superficie de células de pacientes LLA-B con recaída.
2. Determinar sGRP78 en otros tipos leucémicos como LMA.
3. Evaluar la señalización pro apoptótica de las células sGRP78+, mediante su purificación y activación *in vitro* con ligandos endógenos descritos. Realizar ensayos de evaluación apoptótica; Liberación de citocromo y TUNEL.
4. Evaluar el efecto pro apoptótico *in vivo*, de ISM1, en un modelo de xenotrasplante de células LLA-B humanas en ratones de la cepa BALBc/nude.

14. LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. ESQUEMA DE DIFERENCIACIÓN HEMATOPOYÉTICA.

FIGURA 2. ESTRUCTURA PROTEICA DE GRP78.

FIGURA 3. GRP78 COMO REGULADOR DE LA VÍA DE RESPUESTA A PROTEÍNAS MAL PLEGADAS (UPR).

FIG. 4. FUNCIÓN DE sGRP78 COMO RECEPTOR DE SEÑALIZACIÓN CAPAZ DE MEDIAR PROLIFERACIÓN Y APOPTOSIS CELULAR.

FIG. 5. EXPRESIÓN DE sGRP78 EN CÉLULAS DE MÉDULA ÓSEA DE PACIENTES PEDIÁTRICOS CON LLA-B DE RECIENTE DIAGNÓSTICO Y LÍNEAS CELULARES DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA.

FIGURA 6. ANÁLISIS DE LA POBLACIÓN sGRP78+ DE ACUERDO CON EL RIESGO, BLASTOS Y LEUCOCITOS AL DIAGNÓSTICO.

FIGURA 7. TINCIÓN MULTIPARAMÉTRICA DE LA COEXPRESIÓN DE CÉLULAS sGRP78+ CON LOS MARCADORES CD34, CD10, CD38, CD19 Y CXCR4.

FIGURA 8. EVALUACIÓN DE CÉLULAS sGRP78+ CD34+ DE MO DE PACIENTES DE RA Y RE.

FIGURA 9. GRÁFICA DE LA POBLACIÓN sGRP78+, CD34+, CD38+, CD10+, CD19+, CXCR4+ DE ACUERDO CON EL RIESGO.

FIGURA 10. REDUCCIÓN DIMENSIONAL DE LOS DATOS DE CITOMETRÍA DE FLUJO DE PACIENTES CON LLA-B ESTÁNDAR Y DE ALTO RIESGO

FIGURA 11. CÉLULAS sGRP78+ CXCR4+ PRESENTES EN SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES PEDIÁTRICOS CON LLA-B AL DIAGNÓSTICO.

FIGURA 12. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL DE CÉLULAS HUMANAS DE MO DE UN PACIENTE LLA-B INFUNDIDAS VÍA SUBCUTÁNEA EN UN RATÓN BALB/C.

FIGURA 13. EVALUACIÓN DE LOS ANTICUERPOS ANTI-HUMANO ANTI-GRP78, CD45, CD34 Y CXCR4 EN CÉLULAS DE MÉDULA ÓSEA DE RATÓN BALB/C.

FIGURA 14. LAS CÉLULAS sGRP78+ DE PACIENTES LLA-B RA INFUNDIDAS VÍA SUBCUTÁNEA EN RATONES DESNUDOS BALB/C SON CAPACES DE MIGRAR A MO Y GANGLIOS.

FIGURA 15. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE ISM1 DE INDIVIDUOS LLA-B E INDIVIDUOS SANOS, EN SANGRE PERIFÉRICA.

FIGURA 16. EVALUACIÓN DE CÉLULAS SUP-B15 POSITIVAS PARA AENXINA LUEGO DE UN TRATAMIENTO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ISM1 RECOMBINANTE.

15. BIBLIOGRAFÍA

1. Jagannathan-bogdan M, Zon LI. Hematopoiesis. 2013;2467:2463–7.
2. Kaushansky K. Lineage-Specific Hematopoietic Growth Factors. 2006;2034–45.
3. Pinho S, Frenette P. Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;May(5):303–20.
4. Fasouli ES, Katsantoni E. JAK-STAT in Early Hematopoiesis and Leukemia. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9(May).
5. Méndez-Ferrer S, Bonnet D, Steensma DP, Hasserjian RP, Ghobrial IM, Gribben JG, et al. Bone marrow niches in haematological malignancies. *Nat Rev Cancer.* 2020;20(5):285–98.
6. Springuel L, Renaud JC, Knoops L. JAK kinase targeting in hematologic malignancies: A sinuous pathway from identification of genetic alterations towards clinical indications. *Haematologica.* 2015;100(10):1240–53.
7. Passegué E. Hematopoietic Stem Cells , Leukemic Stem Cells and Chronic Myelogenous. 2005;4(2):265–7.
8. Cazzola A, Cazzaniga G, Biondi A, Meneveri R, Brunelli S, Azzoni E. Prenatal Origin of Pediatric Leukemia : Lessons From Hematopoietic Development. 2021;8(January).
9. Vilchis-ordoñez A, Contreras-quiros A, Vadillo E, Dorantes-acosta E, Reyes-lópez A, Martin H, et al. Bone Marrow Cells in Acute Lymphoblastic Leukemia Create a Proinflammatory Microenvironment Influencing Normal Hematopoietic Differentiation Fates. 2015;2015.
10. Colby-graham MF, Chordas C. The Childhood Leukemias. 2003;18(2).

11. Bhojwani D, Yang JJ, Pui C-H. Biology of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Clin North Am*. 2015;62(1):47–60.
12. Campana D, Behm FG. Immunophenotyping of leukemia. *J Immunol Methods*. 2000;243(1–2):59–75.
13. Brady SW, Roberts KG, Gu Z, Shi L, Pounds S, Pei D, et al. The genomic landscape of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Nature Genetics*. Springer US; 2022.
14. Cooper SL, Brown PA. Treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Clin North Am* [Internet]. 2015;62(1):61–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pcl.2014.09.006>
15. Baladrán JC, Vadillo E, Dozal D, Reyes-López A, Sandoval-Cabrera A, Laffont-Ortiz MD, et al. Analysis of Normal Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Contents in Childhood Acute Leukemia Bone Marrow. *Arch Med Res* [Internet]. 2016 Nov;47(8):629–43. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0188440916302211>
16. Muñoz-aguirre P, Huerta-gutierrez R, Zamora S, Mohar A, Vega-vega L, Hernández-ávila JE, et al. Acute Lymphoblastic Leukaemia Survival in Children Covered by Seguro Popular in Mexico : A National Comprehensive Analysis 2005 – 2017 Acute Lymphoblastic Leukaemia Survival in Children Covered by Seguro Popular in Mexico : A National Comprehensive Analys. *Heal Syst Reform* [Internet]. 2021;7(1). Available from: <https://doi.org/10.1080/23288604.2021.1914897>
17. Purizaca J, Meza I, Pelayo R. Early Lymphoid Development and Microenvironmental Cues in B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Arch Med Res*. 2012;43(2):89–101.
18. Hunger SP, Mullighan CG. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. Longo DL, editor. *N Engl J Med* [Internet]. 2015 Oct 15;373(16):1541–52. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra1400972>
19. Zhang M, Churpek J, Keel S, Walsh T, Lee MK, Loeb KR. Germline ETV6 mutations in familial thrombocytopenia and hematologic malignancy. *Nat Genet*. 2015;47(2):180–5.
20. Shah S, Schrader K, Waanders E, Timms A, Vijai J, Miething C. Identification of a recurrent germline PAX5 mutation and susceptibility to pre-B acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* [Internet]. 2013 Mar;45(10):1226–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20402989>
21. Meyer C, Hofmann J, Burmeister T, Gröger D, Park TS, Emerenciano M, et al. The MLL recombinome of acute leukemias in 2013. *Leukemia*. 2013;27(11):2165–76.
22. Whitehead T, Metayer C, Wiemels J, Singer A, Miller M. Childhood Leukemia and Primary Prevention. *Curr Probl Pediatr Adolesc Heal Care*. 2016;46(10):317–52.

23. Ebbe J, Treisman D, Zorniak M, Kutty R, Clark P, Kuo J. The Cancer Stem Cell Paradigm: A New Understanding of Tumor Development and Treatment Johnathan. *Expert Opin Ther Targets*. 2010;14(6):621–32.
24. Ayob AZ, Ramasamy TS. Cancer stem cells as key drivers of tumour progression. *J Biomed Sci*. 2018;25(1):1–18.
25. Walcher L, Kistenmacher AK, Suo H, Kitte R, Dluczek S, Strauß A, et al. Cancer Stem Cells—Origins and Biomarkers: Perspectives for Targeted Personalized Therapies. *Front Immunol*. 2020;11(August):1–33.
26. Simioni C, Conti I, Varano G, Brenna C, Costanzi E, Neri LM. The Complexity of the Tumor Microenvironment and Its Role in Acute Lymphoblastic Leukemia: Implications for Therapies. *Front Oncol*. 2021;11(May):1–14.
27. Martinet L, Garrido I, Filleron T, Guellec S Le, Bellard E, Fournie JJ, et al. Human solid tumors contain high endothelial venules: Association with T- and B-lymphocyte infiltration and favorable prognosis in breast cancer. *Cancer Res*. 2011;71(17):5678–87.
28. Fang P, Li X, Dai J, Cole L, Camacho JA, Zhang Y, et al. Immune cell subset differentiation and tissue inflammation. *J Hematol Oncol*. 2018;11(1):1–22.
29. Kulkarni B, Kirave P, Gondaliya P, Jash K, Jain A, Tekade RK, et al. Exosomal miRNA in chemoresistance, immune evasion, metastasis and progression of cancer. *Drug Discov Today [Internet]*. 2019;24(10):2058–67. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.06.010>
30. Jo Y, Choi N, Kim K, Koo HJ, Choi J, Kim HN. Chemoresistance of cancer cells: Requirements of tumor microenvironment-mimicking in vitro models in anti-cancer drug development. *Theranostics*. 2018;8(19):5259–75.
31. Yonucu S, Yılmaz D, Phipps C, Unlu MB, Kohandel M. Quantifying the effects of antiangiogenic and chemotherapy drug combinations on drug delivery and treatment efficacy. *PLoS Comput Biol*. 2017;13(9):1–17.
32. Chiarini F, Lonetti A, Evangelisti C, Buontempo F, Orsini E, Evangelisti C, et al. Advances in understanding the acute lymphoblastic leukemia bone marrow microenvironment: From biology to therapeutic targeting. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res [Internet]*. 2016;1863(3):449–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.08.015>
33. Gomariz A, Istringhausen S, Helbling PM, Nombela-Arrieta C. Imaging and spatial analysis of hematopoietic stem cell niches. *Ann N Y Acad Sci*. 2019;1–12.

34. Fung TS, Liu DX. Coronavirus infection , ER stress , apoptosis and innate immunity. *Front Microbiol.* 2014;5(June):1–13.
35. Duan CW, Shi J, Chen J, Wang B, Yu YH, Qin X, et al. Leukemia propagating cells rebuild an evolving niche in response to therapy. *Cancer Cell [Internet].* 2014;25(6):778–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2014.04.015>
36. Ding L, Saunders T, Enikolopov G, Morrison S. Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature.* 2012;481(7382):457–62.
37. Samimi A, Kalantari H, Lorestani MZ, Shirzad R, Saki N. Oxidative stress in normal hematopoietic stem cells and leukemia. *Apmis.* 2018;126(4):284–94.
38. Giles AJ, Chien CD, Reid CM, Fry TJ, Park DM, Kaplan RN, et al. The functional interplay between systemic cancer and the hematopoietic stem cell niche. *Pharmacol Ther [Internet].* 2016;168:53–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.09.006>
39. Kebelmann-Betzing C, Körner G, Badiali L, Buchwald D, Möricke A, Korte A, et al. Characterization of cytokine, growth factor receptor, costimulatory and adhesion molecule expression patterns of bone marrow blasts in relapsed childhood B cell precursor all. *Cytokine.* 2001;13(1):39–50.
40. Ferreira de Vasconcellos J, Albertoni A, Tonin N, Otubo R, Vaz T, Almeida Cardoso A, et al. Increased CCL2 and IL-8 in the Bone Marrow Microenvironment in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pediatr Blood Cancer.* 2011;56:568–77.
41. Scupoli MT, Donadelli M, Cioffi F, Rossi M, Perbellini O, Malpeli G, et al. Bone marrow stromal cells and the upregulation of interleukin-8 production in human T-cell acute lymphoblastic leukemia through the CXCL12/CXCR4 axis and the NF- κ B and JNK/AP-1 pathways. *Haematologica.* 2008;93(4):524–32.
42. De Lourdes Perim A, Amarante MK, Guembarovski RL, De Oliveira CEC, Watanabe MAE. CXCL12/CXCR4 axis in the pathogenesis of acute lymphoblastic leukemia (ALL): A possible therapeutic target. *Cell Mol Life Sci.* 2015;72(9):1715–23.
43. Crazzolaro R, Kreczy A, Mann G, Heitger A, Eibl G, Fink FM, et al. High expression of the chemokine receptor CXCR4 predicts extramedullary organ infiltration in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol.* 2001;115(3):545–53.
44. Cancilla D, Rettig MP, DiPersio JF. Targeting CXCR4 in AML and ALL. *Front Oncol.* 2020;10(September).

45. Brown P, Inaba H, Annesley C, Beck J, Colace S, Dallas M, et al. Pediatric acute lymphoblastic leukemia, version 2.2020. *JNCCN J Natl Compr Cancer Netw*. 2020;18(1):81–112.
46. Béné MC, Nebe T, Bettelheim P, Buldini B, Bumbea H, Kern W, et al. Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: A consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10. *Leukemia*. 2011;25(4):567–74.
47. Arriaga-pizano L, Ramírez-ramírez D, Prieto-chávez J, Pelayo R. Reporte de la Primera Reunión Nacional de Consenso para la Inmunofenotipificación de Leucemias Agudas. *Gac Med Mex*. 2019;155:20–9.
48. Arriaga-Pizano L, Ramírez-Ramírez D, Prieto-Chávez J, Pelayo R, Ruiz-Argüelles A. Reporte de la primera reunión nacional de consenso para la inmunofenotipificación de leucemias agudas. *Gac Med Mex*. 2019;155(1):20–9.
49. Lustosa de Sousa DW, de Almeida Ferreira FV, Cavalcante Félix FH, de Oliveira Lopes MV. Acute lymphoblastic leukemia in children and adolescents: Prognostic factors and analysis of survival. *Rev Bras Hematol Hemoter* [Internet]. 2015;37(4):223–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjhh.2015.03.009>
50. Wiersma VR, Michalak M, Abdullah TM, Bremer E, Eggleton P. Mechanisms of translocation of ER chaperones to the cell surface and immunomodulatory roles in cancer and autoimmunity. *Front Oncol*. 2015;5(January):1–14.
51. Chatterjee N, Bivona TG. Polytherapy and Targeted Cancer Drug Resistance. *Trends in Cancer* [Internet]. 2019;5(3):170–82. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2019.02.003>
52. Ciocca DR, Calderwood SK. Heat shock proteins in cancer : diagnostic , prognostic , predictive , and treatment implications . Targeting heat shock proteins in cancer . Heat shock proteins in obesity : links to cardiovascular disease . *Cell Stress Chaperones* [Internet]. 2005;10(2):86–103. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1176476/pdf/i1466-1268-10-2-86.pdf>
53. Sedlackova L, Spacek M, Holler E, Imryskova Z, Hromadnikova I. Heat-shock protein expression in leukemia. *Tumor Biol*. 2011 Feb;32(1):33–44.
54. Ibrahim IM, Abdelmalek DH, El AA. GRP78 : A cell ' s response to stress. 2019;226(March):156–63.
55. Ni M, Zhang Y, Lee AS. Beyond the endoplasmic reticulum: Atypical GRP78 in cell viability, signalling and therapeutic targeting. *Biochem J*. 2011;434(2):181–8.
56. Luo B, Lee AS. The critical roles of endoplasmic reticulum chaperones and unfolded protein response

in tumorigenesis and anticancer therapies. *Oncogene*. 2013;32(7):805–18.

57. Zhang Y, Liu R, Ni M, Gill P, Lee AS. Cell Surface Relocalization of the Endoplasmic Reticulum. *J Biol Chem* [Internet]. 2010;285(20):15065–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109.087445>
58. Lee AS. Glucose-regulated proteins in cancer: Molecular mechanisms and therapeutic potential. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(4):263–76.
59. Ibrahim IM, Abdelmalek DH, Elfiky AA. GRP78: A cell's response to stress. *Life Sci* [Internet]. 2019 Jun;226:156–63. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0024320519302723>
60. Shin BK, Wang H, Yim AM, Le Naour F, Brichory F, Jang JH, et al. Global profiling of the cell surface proteome of cancer cells uncovers an abundance of proteins with chaperone function. *J Biol Chem* [Internet]. 2003;278(9):7607–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M210455200>
61. Harada M, Kimura G, Nomoto K. Heat shock proteins and the antitumor T cell response. *Biotherapy*. 1998;10(3):229–35.
62. Ohashi K, Burkart V, Flohé S, Kolb H. Cutting Edge: Heat Shock Protein 60 Is a Putative Endogenous Ligand of the Toll-Like Receptor-4 Complex. *J Immunol*. 2000;164(2):558–61.
63. Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, Ghose S, Kirschning CJ, Issels RD, Wagner H. HSP70 as endogenous stimulus of the toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J Biol Chem* [Internet]. 2002;277(17):15107–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111204200>
64. Triantafilou M, Triantafilou K. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends Immunol*. 2002;23(6):301–4.
65. Li J, Lee A. Stress Induction of GRP78/BiP and Its Role in Cancer. *Curr Mol Med*. 2006;6(1):45–54.
66. Lee AS. GRP78 Induction in Cancer : Therapeutic and Prognostic Implications. 2007;(8):3496–9.
67. Ni M, Zhang Y, Lee AS. Beyond the endoplasmic reticulum: atypical GRP78 in cell viability, signalling and therapeutic targeting. *Biochem J* [Internet]. 2011 Mar 1;434(2):181–8. Available from: <https://portlandpress.com/biochemj/article/434/2/181/45322/Beyond-the-endoplasmic-reticulum-atypical-GRP78-in>
68. Gronow MG, Selim MA, Papalas J, Pizzo S V. GRP78 : A Multifunctional Receptor on the Cell Surface. 2009;11(9).
69. Gray PC, Vale W. Cripto/GRP78 modulation of the TGF- β pathway in development and oncogenesis.

FEBS Lett [Internet]. 2012;586(14):1836–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2012.01.051>

70. Liu R, Li X, Gao W, Zhou Y, Wey S, Mitra SK, et al. Monoclonal antibody against cell surface GRP78 as a novel agent in suppressing PI3K/AKT signaling, tumor growth, and metastasis. *Clin Cancer Res*. 2013;19(24):6802–11.
71. Yoneda Y, Steiniger SCJ, Čapková K, Mee JM, Liu Y, Kaufmann GF, et al. A cell-penetrating peptidic GRP78 ligand for tumor cell-specific prodrug therapy. *Bioorganic Med Chem Lett*. 2008;18(5):1632–6.
72. Arap MA, Lahdenranta J, Mintz PJ, Hajitou A, Sarkis AS, Arap W, et al. Cell surface expression of the stress response chaperone GRP78 enables tumor targeting by circulating ligands. *Cancer Cell*. 2004;6(3):275–84.
73. Hebbar N, Epperly R, Vaidya A, Thanekar U, Moore SE, Umeda M, et al. CAR T cells redirected to cell surface GRP78 display robust anti-acute myeloid leukemia activity and do not target hematopoietic progenitor cells. *Nat Commun*. 2022;13(1):1–14.
74. Staquicini DI, Angelo SD, Ferrara F, Karjalainen K, Sharma G, Smith TL, et al. Therapeutic targeting of membrane-associated GRP78 in leukemia and lymphoma: preclinical efficacy in vitro and formal toxicity study of BMTP-78 in rodents and primates. *Pharmacogenomics J*. 2019;18(3):436–43.
75. Wey S, Luo B, Lee AS. Acute inducible ablation of GRP78 reveals its role in hematopoietic stem cell survival, lymphogenesis and regulation of stress signaling. *PLoS One*. 2012;7(6).
76. Uckun FM, Qazi S, Ozer Z, Garner AL, Pitt J, Ma H, et al. Inducing apoptosis in chemotherapy-resistant B-lineage acute lymphoblastic leukaemia cells by targeting HSPA5, a master regulator of the anti-apoptotic unfolded protein response signalling network. *Br J Haematol*. 2011;153(6):741–52.
77. Wang M, Wey S, Zhang Y, Ye R, Lee AS. Role of the Unfolded Protein Response Regulator GRP78/BiP in Development, Cancer, and Neurological Disorders. *Antioxid Redox Signal* [Internet]. 2009 Sep;11(9):2307–16. Available from: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ars.2009.2485>
78. Chen J, Lynn EG, Yousof TR, Sharma H, Macdonald ME, Byun JH, et al. Scratching the Surface—An Overview of the Roles of Cell Surface GRP78 in Cancer. *Biomedicines*. 2022;10(5):1–13.
79. Misra UK, Gonzalez-Gronow M, Gawdi G, Hart JP, Johnson CE, Pizzo S V. The role of Grp 78 in α 2-macroglobulin-induced signal transduction: Evidence from RNA interference that the low density lipoprotein receptor-related protein is associated with, but not necessary for, GRP 78-mediated signal transduction. *J Biol Chem* [Internet]. 2002;277(44):42082–7. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M206174200>

80. Shani G, Fischer WH, Justice NJ, Kelber JA, Vale W, Gray PC. GRP78 and Cripto Form a Complex at the Cell Surface and Collaborate To Inhibit Transforming Growth Factor β Signaling and Enhance Cell Growth. *Mol Cell Biol*. 2008;28(2):666–77.
81. Davidson DJ, Haskell C, Majest S, Kherzai A, Egan DA, Walter KA, et al. Kringle 5 of human plasminogen induces apoptosis of endothelial and tumor cells through surface-expressed glucose-regulated protein 78. *Cancer Res*. 2005;65(11):4663–72.
82. Burikhanov R, Zhao Y, Goswami A, Qiu S, Schwarze SR. The Tumor Suppressor Par-4 Activates an Extrinsic Pathway for Apoptosis. *Cell* [Internet]. 2009;138(2):377–88. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.05.022>
83. Zhang Y, Chen M, Venugopa SL, Zhou Y, Xiang W, Li YH, et al. Isthmin exerts pro-survival and death-promoting effect on endothelial cells through alphavbeta5 integrin depending on its physical state. *Cell Death Dis*. 2011;2(5):1–10.
84. Pera EM, Kim JI, Martinez SL, Brechner M, Li SY, Wessely O, et al. Isthmin is a novel secreted protein expressed as part of the Fgf-8 synexpression group in the *Xenopus* midbrain-hindbrain organizer. *Mech Dev*. 2002;116(1–2):169–72.
85. Lansdon LA, Darbro BW, Petrin AL, Hulstrand AM, Standley JM, Brouillette RB, et al. Identification of isthmin 1 as a novel clefting and craniofacial patterning gene in humans. *Genetics*. 2018;208(1):283–96.
86. Rossi V, Beffagna G, Rampazzo A, Bauce B, Danieli GA. TAIL1: An isthmin-like gene, containing type 1 thrombospondin-repeat and AMOP domain, mapped to ARVD1 critical region. *Gene*. 2004;335(1–2):101–8.
87. Valle-Rios R, Maravillas-Montero JL, Burkhardt AM, Martinez C, Buhren BA, Homey B, et al. Isthmin 1 is a secreted protein expressed in skin, mucosal tissues, and NK, NKT, and Th17 cells. *J Interf Cytokine Res*. 2014;34(10):795–801.
88. Chen M, Zhang Y, Yu VC, Chong YS, Yoshioka T, Ge R. Isthmin targets cell-surface GRP78 and triggers apoptosis via induction of mitochondrial dysfunction. *Cell Death Differ*. 2014;21(5):797–810.
89. Hu M, Zhang X, Hu C, Teng T, Tang QZ. A brief overview about the adipokine: Isthmin-1. *Front Cardiovasc Med*. 2022;9.
90. Conner C, Lager TW, Guldner IH, Wu MZ, Hishida Y, Hishida T, et al. Cell surface GRP78 promotes

stemness in normal and neoplastic cells. *Sci Rep.* 2020;10(1):1–11.

91. Menghuan L, Yang Y, Qianhe M, Na Z, Shicheng C, Bo C, et al. Advances in research of biological functions of Isthmin-1. *J Cell Commun Signal* [Internet]. 2023;17(3):507–21. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12079-023-00732-3>
92. Rendón-Macías ME, Reyes-Zepeda NC, Villasís-Keever MÁ, Meneses JS, Núñez AE. Tendencia mundial de la supervivencia en pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda. revisión de las últimas cuatro décadas. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 2012;69(3):153–63.
93. Pui CH, Carroll WL, Meshinchi S, Arceci RJ. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: An update. *J Clin Oncol.* 2011;29(5):551–65.
94. Gopal U, Pizzo S V. The Endoplasmic Reticulum Chaperone GRP78 Also Functions as a Cell Surface Signaling Receptor [Internet]. *Cell Surface GRP78, a New Paradigm in Signal Transduction Biology.* Elsevier Inc.; 2018. 9–40 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-812351-5.00002-7>
95. Acosta ED, Pasillas- EM. Estudio de caso : estimación de los costos de la quimioterapia aplicando el protocolo completo en niños con leucemia linfoblástica aguda o con linfoma de Hodgkin. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 2012;69(1):11–23.
96. Robinson MD, Nowicka M, Krieg C, Weber LM, Hartmann FJ, Guglietta S, et al. CyTOF workflow: Differential discovery in high-throughput high-dimensional cytometry datasets. *F1000Research.* 2017;6(May):1–53.
97. Crowell HL, Zanotelli VRT, Chevrier S, Robinson MD. CATALYST: Cytometry dATa anALYSIS Tools [Internet]. Bioconductor; 2020. Available from: <https://bioconductor.org/packages/3.10/bioc/html/CATALYST.html>
98. Park KW, Eun Kim G, Morales R, Moda F, Moreno-Gonzalez I, Concha-Marambio L, et al. The Endoplasmic Reticulum Chaperone GRP78/BiP Modulates Prion Propagation in vitro and in vivo. *Sci Rep.* 2017;7.
99. Wey S, Luo B, Tseng C-C, Ni M, Zhou H, Fu Y, et al. Inducible knockout of GRP78/BiP in the hematopoietic system suppresses Pten-null leukemogenesis and AKT oncogenic signaling. *Blood* [Internet]. 2012 Jan 19;119(3):817–25. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/119/3/817/135118/Inducible-knockout-of-GRP78BiP-in-the>
100. Malta TM, Sokolov A, Gentles AJ, Burzykowski T, Poisson L, Weinstein JN, et al. Machine Learning Identifies Stemness Features Associated with Oncogenic Dedifferentiation. *Cell.* 2018;173(2):338–354.e15.

101. Tan SS, Ahmad I, Bennett HL, Singh L, Nixon C, Seywright M, et al. GRP78 up-regulation is associated with androgen receptor status, Hsp70-Hsp90 client proteins and castrate-resistant prostate cancer. *J Pathol.* 2011;223(1):81–7.
102. Liu Y, Steiniger SCJ, Kim YS, Kaufmann GF, Felding-Habermann B, Janda KD. Mechanistic studies of a peptidic GRP78 ligand for cancer cell-specific drug delivery. *Mol Pharm.* 2007;4(3):435–47.
103. Tsai YL, Zhang Y, Tseng CC, Stanciuskas R, Pinaud F, Lee AS. Characterization and mechanism of stress-induced translocation of 78-kilodalton glucose-regulated protein (GRP78) to the cell surface. *J Biol Chem.* 2015;290(13):8049–64.
104. Roué G, Pérez-Galán P, Mozos A, López-Guerra M, Xargay-Torrent S, Rosich L, et al. The Hsp90 inhibitor IPI-504 overcomes bortezomib resistance in mantle cell lymphoma in vitro and in vivo by down-regulation of the prosurvival ER chaperone BiP/Grp78. *Blood.* 2011;117(4):1270–9.
105. Good Z, Sarno J, Jager A, Samusik N, Aghaeepour N, Simonds EF, et al. Single-cell developmental classification of B cell precursor acute lymphoblastic leukemia at diagnosis reveals predictors of relapse. *Nat Med* [Internet]. 2018 Apr 5;24(4):474–83. Available from: <http://www.nature.com/articles/nm.4505>
106. Jiang Z, Wu D, Lin S, Li P. CD34 and CD38 are prognostic biomarkers for acute B lymphoblastic leukemia. 2016;80–3.
107. Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature.* 2001;410(6824):50–6.
108. J. Prud'homme G. Cancer Stem Cells and Novel Targets for Antitumor Strategies. *Curr Pharm Des.* 2012;18(19).
109. Chiu CC, Lee LY, Li YC, Chen YJ, Lu YC, Li YL, et al. Grp78 as a therapeutic target for refractory head-neck cancer with CD24- CD44+ stemness phenotype. *Cancer Gene Ther.* 2013;20(11):606–15.
110. Ninomiya M, Abe A, Katsumi A, Xu J, Ito M, Arai F, et al. Homing, proliferation and survival sites of human leukemia cells in vivo in immunodeficient mice. *Leukemia.* 2007;21(1):136–42.
111. Tavor S, Petit I, Porozov S, Avigdor A, Dar A, Leider-Trejo L, et al. CXCR4 Regulates Migration and Development of Human Acute Myelogenous Leukemia Stem Cells in Transplanted NOD/SCID Mice. *Cancer Res.* 2004;64(8):2817–24.
112. Jacoby E, Chien CD, Fry TJ. Murine models of acute leukemia: Important tools in current pediatric leukemia research. *Front Oncol.* 2014;4 MAY(May):1–14.

113. Huergo-Zapico L, Gonzalez-Rodriguez AP, Contesti J, Gonzalez E, López-Soto A, Fernandez-Guizan A, et al. Expression of ERp5 and GRP78 on the membrane of chronic lymphocytic leukemia cells: Association with soluble MICA shedding. *Cancer Immunol Immunother.* 2012;61(8):1201–10.
114. Yuan B, Xian R, Ma J, Chen Y, Lin C, Song Y. Isthmin inhibits glioma growth through antiangiogenesis in vivo. *J Neurooncol.* 2012;109(2):245–52.
115. Xiang W, Ke Z, Zhang Y, Ho-Yuet Cheng G, Irwan ID, Sulochana KN, et al. Isthmin is a novel secreted angiogenesis inhibitor that inhibits tumour growth in mice. *J Cell Mol Med.* 2011;15(2):359–74.

